

**Transformation einer argentinischen  
Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L.)  
durch Transfer eines Seneszenz-verzögernden  
Gens zur Verbesserung der Ertragsleistung**

Dissertation

**Eduardo Daniel Souza Canada**

**Transformation einer argentinischen  
Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L.)  
durch Transfer eines Seneszenz-verzögernden  
Gens zur Verbesserung der Ertragsleistung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von  
**Eduardo Daniel Souza Canada**

---

Bayreuth 2012

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit von Januar 2003 bis Januar 2008 am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth unter Betreuung von Prof. Dr. Erwin Beck an der Universität Bayreuth durchgeführt.

Die Arbeit wurde eingereicht am: 02. Februar 2012

Das Rigorosum fand am: 12 Juli 2012

Der Prüfungsausschuss bestand aus:

Prof. em Dr. Dr. hc Erwin Beck (1. Gutachter)

Prof. Dr. Gerhard Rambold (2. Gutachter)

Prof. Dr. Olaf Stemmann (Vorsitz)

Prof. Dr. Angelika Muströph

PD Dr. Stefan Dötterl

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die globalen Herausforderungen in der Landwirtschaft .....	1
1.2	Die Grüne Gentechnik.....	2
1.3	Weizen.....	3
1.4	Genübertragungen in Weizen.....	4
1.4.1	Gewebekultursysteme .....	4
1.4.2	Transformationstechniken .....	6
1.4.3	Osmotische Behandlung.....	7
1.5	Selektion transformierter Individuen .....	8
1.5.1	Selektionsgene für Weizen .....	9
1.5.1.1	Antibiotikaresistenz-Marker .....	9
1.5.1.2	Herbizidresistenz Marker.....	10
1.5.1.3	Transgene Pflanzen ohne Selektionsgene .....	12
1.5.2	Reportergene .....	13
1.5.2.1	Destruktive Nachweissysteme .....	13
1.5.2.2	Nicht destruktive Nachweissysteme .....	14
1.6	Promotoren.....	15
1.7	Nutzgene in der Weizentransformation.....	17
1.7.1	Verbesserung des Nährwerts .....	17
1.7.2	Resistenz gegen biotische Schadfaktoren und abiotische Stressfaktoren .....	18
1.7.3	Seneszenzverzögerung als Strategie der Ertragssteigerung .....	19
1.7.3.1	Pflanzliche Seneszenz.....	19
1.7.3.2	Seneszenz-assoziierte Gene .....	20
1.7.3.3	Molekulargenetische Strategien zur Manipulation der Blattseneszenz.....	21
1.8	Zielsetzung.....	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
2.1	Materialien .....	25
2.1.1	Bakterienstämme .....	25
2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	25
2.1.1.2	Kulturmedium für <i>E. coli</i> -Stämme.....	25
2.1.2	Pflanzenmaterial.....	25
2.1.2.1	Weizen ( <i>Triticum aestivum</i> L.) .....	25
2.1.2.2	Tabak .....	26
2.1.3	Nukleinsäuren.....	26
2.1.3.1	Oligonukleotide .....	26
2.1.3.2	Für die Transformation von Weizen verwendete Plasmide. ....	27
2.1.4	Pflanzenkulturmedien.....	28
2.1.4.1	MS-Medium (Barcelo and Lazzeri, 1995, modifiziert) zur Induktion, Kultur und osmotischen Behandlung von unreifen Embryonen: .....	28

# INHALTSVERZEICHNIS

2.1.4.2	L3-5 Medium (Jähne <i>et al.</i> , 1991; modifiziert) zur Induktion und Kultur von Weizenkallus und osmotischen Behandlung von unreifen Embryonen: .....	29
2.1.4.3	R1-Medium (Murashige und Skoog, 1962, modifiziert; Ahuja <i>et al.</i> , 1982) zur Regeneration aus Weizen-Gewebekulturen: .....	30
2.1.4.4	190-2-Medium (Zhuan <i>et al.</i> , 1984) zur Bewurzelung der Regeneratpflanzen.....	30
2.1.4.5	WH-Medium (Wagner und Hess, 1973) zur sterilen Anzucht von isolierten Weizenembryonen und zur Regeneration aus Weizen-Gewebekulturen: .....	31
2.1.5	Chemikalien und Enzyme.....	31
<b>2.2</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Transformation von <i>Triticum aestivum</i> L. ....	32
2.2.1.1	Anzucht des Pflanzenmaterials .....	32
2.2.1.2	Bestimmung der Getreidewachstumsentwicklung nach der Zadoks Skala .....	32
2.2.1.3	Gewebekulturen .....	34
2.2.1.4	Transformation von Weizen durch Partikelbeschuss .....	35
2.2.2	Isolierung von Nukleinsäuren.....	42
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> :.....	42
2.2.2.2	Extraktion genomischer DNA aus <i>Triticum aestivum</i> L. ....	44
2.2.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Weizen (nach Chomczynski <i>et al.</i> , 1993 verändert) .....	45
2.2.2.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	45
2.2.3	DNA-Modifizierende Reaktionen .....	46
2.2.3.1	Restriktionsspaltung.....	46
2.2.3.2	<i>Sticky end</i> -Ligation .....	46
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten.....	47
2.2.4.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	47
2.2.4.2	Elution von DNA-Fragmenten aus den Agarosegelen.....	47
2.2.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	48
2.2.5.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen (nach Inoue <i>et al.</i> , 1990) .....	48
2.2.5.2	Transformation kompetenter Zellen.....	48
2.2.5.3	Analyse der Transformanten mit der <i>Blue Gel</i> -Methode .....	48
2.2.6	Nachweis der Fremdgene .....	49
2.2.6.1	<i>Southern blot</i> -Analyse (Southern, 1975) .....	49
2.2.6.2	Nichtradioaktive Markierung der Sonden-DNA .....	50
2.2.6.3	Hybridisierung und Nachweis der Hybridisierung .....	50
2.2.7	Nachweis der Fremdgenexpression .....	51
2.2.7.1	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von <i>ipt</i> -Transkript .....	51
2.2.7.2	Nachweis der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität (GUS-Test).....	51
2.2.8	Seneszenz-Induktion .....	53
2.2.8.1	In transienten und transgenen pS40-Gus Pflanzen.....	53
2.2.8.2	In transgenen pS40-IPT und pSG516 Pflanzen .....	53
2.2.9	Chlorophyllbestimmung nach Porra <i>et al.</i> , 1989 .....	53
2.2.10	Cytokinin-Analyse .....	54
2.2.11	Graphiken und Statistische Analyse .....	54
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>56</b>
3.1	Screening von Weizenvarietäten .....	56
3.2	Versuche zur Induktion von Scutellarkallus .....	57
3.2.1	Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche .....	59
3.2.2	Die vorzeitige Keimung unreifer Embryonen .....	61

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.2.3	Regeneration von Pflanzen aus embryogenem Scutellarkallus .....	63
3.2.4	Kultur der Regenerate in Erde .....	66
<b>3.3</b>	<b>Sortenauswahl .....</b>	<b>66</b>
<b>3.4</b>	<b>Der Einfluss des Mediums .....</b>	<b>66</b>
3.4.1	Medien für die Induktion von Scutellarkallus .....	66
3.4.2	Einfluss des Mediums auf die Anzahl der Kalli auf der embryogenen Oberfläche .....	68
3.4.3	Das Medium zur Vermeidung der vorzeitigen Keimung unreifer Embryonen .....	69
3.4.4	Das Medium im Hinblick auf die Regenerationsfähigkeit der Sorte Klein Brujo .....	70
<b>3.5</b>	<b>Konstruktion des Transformationsvektors .....</b>	<b>72</b>
3.5.1	Konstruktion der Nutgencassette .....	72
3.5.1.1	Das Plasmid pS40-IPT .....	72
3.5.2	Überprüfung des Konstrukts mittels Restriktionsanalyse .....	73
3.5.3	Überprüfung des Konstrukts mittels <i>Southern Blot</i> -Analyse .....	76
<b>3.6</b>	<b>Versuche zur Transformation von <i>Triticum aestivum</i> L .....</b>	<b>77</b>
3.6.1	Transfer des <i>uidA</i> -Reportergens .....	77
3.6.1.1	Die transiente Expression des <i>uidA</i> -Gens in pS40-GUS .....	77
3.6.1.2	Transfer des Konstrukts pS40-GUS in die Weizensorten Klein Brujo .....	78
3.6.1.3	Histochemische und Fluoreszenz-Analyse von <i>HvS40</i> -GUS-Pflanzen .....	80
3.6.1.4	Die transiente Expression des <i>uidA</i> -Gens in pSG506 .....	84
3.6.1.5	Transfer des Konstrukts pSG506 in die Weizensorten Klein Brujo .....	85
3.6.1.6	Histochemische und fluorometrische Analyse von pSG506-Pflanzen .....	88
3.6.2	Transfer des Seneszenz-verzögernden Konstrukts pS40-IPT in die Weizensorten Klein Brujo und Bobwhite .....	88
3.6.2.1	Transformation der Sorte Klein Brujo .....	88
3.6.2.2	Transformation der Sorte Bobwhite .....	93
3.6.3	Transfer des Seneszenz-verzögernden Konstrukts pSG516 in die Weizensorten Klein Brujo und Bobwhite .....	96
3.6.3.1	Transformation der Sorte Klein Brujo .....	96
3.6.3.2	Transformation der Sorte Bobwhite .....	98
<b>3.7</b>	<b>Analyse der Regeneratpflanzen .....</b>	<b>100</b>
3.7.1	<i>Southern blot</i> -Analysen in der T <sub>0</sub> .....	100
3.7.2	Nachweis der Expression des <i>ipt</i> -Gens mit reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). .....	101
3.7.3	Überprüfung der Expression übertragener Fremdgene .....	101
<b>3.8</b>	<b>Untersuchungen an T<sub>1</sub>-Pflanzen .....</b>	<b>103</b>
3.8.1	Untersuchung des Vererbungsmodus .....	103
3.8.1.1	Prüfung auf Anwesenheit des <i>ipt</i> -Gens und <i>gfp</i> -Expression im Keimling .....	103
3.8.1.2	Anwesenheit des <i>ipt</i> -Gens und Expression des <i>bar</i> -Gens im Keimling .....	104
3.8.2	Mendelanalysen an der T <sub>1</sub> -Generation .....	105
3.8.3	Chlorophyllgehalt .....	107
3.8.3.1	Abbau des Chlorophylls in den Linien mit dem Konstrukt pSG516 .....	107
3.8.3.2	Abbau des Chlorophylls in den Linien mit dem Konstrukt pS40-IPT .....	108
3.8.4	Das Cytokininmuster der T <sub>1</sub> -Pflanzen .....	109
3.8.4.1	Cytokiningehalte in Transformaten mit dem Plasmid pSG516 .....	110
3.8.4.2	Cytokiningehalte in Transformaten mit dem Plasmid pS40-IPT .....	110

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>3.9 Ertragsleistung der T<sub>1</sub>-Pflanzen</b> .....	<b>111</b>
3.9.1 Zwei Linien mit der Nutzgenskassette pSG516 .....	112
3.9.2 Sechs Linien mit der Nutzgenskassette pS40-IPT .....	112
3.9.2.1 Die Pflanzen der Linien B-153, B-176, B-346 und B-355.....	113
3.9.2.2 Die Pflanzen B-156 und B-175.1 .....	114
<b>3.10 Untersuchung der T<sub>2</sub>-Pflanzen</b> .....	<b>115</b>
3.10.1 Mendel-Analysen der T <sub>2</sub> -Generation.....	115
3.10.2 Das Cytokininmuster der T <sub>2</sub> -Planzen .....	117
3.10.2.1 Cytokiningehalte in Transformaten mit dem Plasmid pSG516.....	117
3.10.2.2 Cytokiningehalte in Transformaten mit dem Plasmid pS40-IPT .....	118
3.10.3 RT-PCR Analyse der T <sub>2</sub> -Pflanzen. ....	119
<b>3.11 Ertragsleistung der T<sub>2</sub>-Pflanzen</b> .....	<b>121</b>
3.11.1 Die Linie Pw-410 mit der Nutzgenskassette pSG516 .....	121
3.11.2 Vier Linien mit der Nutzgenskassette pS40-IPT .....	122
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>124</b>
<b>4.1 Screening von Weizenvarietäten</b> .....	<b>124</b>
<b>4.2 Der Einfluss der Zusammensetzung des Mediums</b> .....	<b>127</b>
<b>4.3 Die Transformationsvektoren</b> .....	<b>128</b>
<b>4.4 Die Transformation von <i>Triticum aestivum</i> L</b> .....	<b>128</b>
4.4.1 Die transiente Expression des <i>uidA</i> -Gens in pS40-GUS und in pSG506 .....	129
4.4.2 Partikelbeschuss von unreifen Embryonen.....	130
4.4.3 Gewebekultur .....	131
<b>4.5 Analyse der Regeneratpflanzen</b> .....	<b>133</b>
4.5.1 Nachweis der <i>HvS40</i> -GUS und <i>SAG12</i> -GUS in transgenen Weizenpflanzen.....	133
4.5.2 Nachweis der Übertragung von Fremdgenen durch <i>Southern blot</i> -Analyse .....	134
<b>4.6 Analyse der Nachkommen transgener Regeneratpflanzen</b> .....	<b>135</b>
4.6.1 Expression des selektierbaren Markierungsgens <i>bar</i> und der Markierungs-Reportergen <i>gfp</i> in der T <sub>1</sub> -, T <sub>2</sub> - und T <sub>3</sub> -Generation .....	135
4.6.2 Expression des Isopentenyltransferase-Gens.....	136
4.6.2.1 Chlorophyllgehalt von T <sub>1</sub> -Pflanzen .....	136
4.6.2.2 Cytokiningehalt in Weizenfahnenblättern.....	137
4.6.2.3 Ertragsleistung der T <sub>2</sub> -Pflanzen .....	140
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>144</b>
<b>5.1 Screening von 22 argentinischen Sommerweizen-varietäten</b> .....	<b>144</b>
<b>5.2 Transformation durch Partikelbeschuss und <i>in vitro</i> Gewebekultur der unreifen Embryonen des Weizens</b> .....	<b>145</b>
.....	145
<b>5.3 Physiologische Effekte der Übertragung des <i>ipt</i>-Gens und der Ertragsleistung</b> .....	<b>147</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>150</b>
<b>6.1</b>	<b>Screening of 22 Argentine summer wheat varieties.....</b>	<b>150</b>
<b>6.2</b>	<b>Transformation by particle bombardment and <i>in vitro</i> tissue culture of immature embryos of wheat.</b>	<b>151</b>
<b>6.3</b>	<b>Physiological effects of the transfer of the <i>ipt</i>-gene and yield performance.....</b>	<b>153</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>156</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>163</b>
<b>9</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>165</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 DIE GLOBALEN HERAUSFORDERUNGEN IN DER LANDWIRTSCHAFT

Eine der zentralen Aufgaben der Landwirtschaft ist die weltweite Ertragssteigerung und -sicherung. Daher steht die Pflanzenzüchtung aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung, ihrer Versorgung mit gesunder Nahrung und Energie sowie dem fortschreitenden Klimawandel in den nächsten 50 Jahren vor enormen globalen Herausforderungen, die einen schnellen Verzicht auf einzelne Technologien nicht erlauben. Diese Herausforderungen sind

- Mehr Menschen: Bis 2050 wird die Weltbevölkerung um 50 Prozent auf mehr als neun Milliarden Menschen anwachsen und in den nächsten 40 Jahren müssen sich die landwirtschaftlichen Erträge nahezu verdoppeln (Grüne Gentechnik, KWS, 2010).

- Weniger Fläche: Die landwirtschaftlich nutzbaren Flächen sind begrenzt und nicht beliebig zu erweitern. Daher wird die pro Kopf verfügbare Ackerfläche weiter abnehmen. Schon heute ist in einigen Regionen wie in Asien, der Landmangel zu einem ernststen Problem geworden. Im globalen Maßstab wird sich die verfügbare Fläche von etwa einem halben Hektar je Einwohner auf weniger als ein Viertel Hektar bis zum Jahr 2025 verringern (Grüne Gentechnik, KWS, 2010).

- Weniger Wasser: Das Wasser ist eine knapper werdende Ressource und die Landwirtschaft ist verantwortlich für etwa zwei Drittel des weltweiten Süßwasserverbrauchs und muss künftig mit weniger Wasser auskommen (Grüne Gentechnik, KWS, 2010).

- Folgen des Klimawandels: Die Landwirtschaft muss sich zunehmend auf Wetterextreme wie Dürreperioden einstellen. Der „Weltklimarat“ (IPCC) erwartet, dass im Jahr 2020 in Afrika 75 bis 220 Millionen Menschen von Dürren und dadurch von Ernteaufschlägen betroffen sein werden. In anderen Regionen ist mit häufigeren Überschwemmungen zu rechnen (Grüne Gentechnik, KWS, 2010).

- Klimaschutz: Auch die Landwirtschaft muss dazu beitragen, den Ausstoß klimarelevanter Gase zu verringern. Außerdem soll Biomasse aus Pflanzen künftig stärker für die Energieerzeugung genutzt werden. Denn anders als fossile Energieträger wachsen Pflanzen stetig nach und ihre Nutzung ist nahezu klimaneutral: Es entweicht die CO<sub>2</sub>-Menge, die in der Vegetationsphase gebunden wurde. Die Ernährungssicherung der Weltbevölkerung ist dabei insbesondere eine Frage der Produktivität. Die Pflanzenzüchtung kann einen wesentlichen Beitrag leisten, die Produktivität der landwirtschaftlichen Flächen zu steigern, denn das Ertragspotenzial vieler Pflanzen ist noch nicht ausgeschöpft. Die Erkenntnisse über

Zusammenhänge und Wechselwirkungen zwischen wichtigen Pflanzeigenschaften und Umweltbedingungen sowie die Erforschung der genetischen Möglichkeiten und physiologischen Prozesse bieten große Chancen auf weitere Produktivitätsfortschritte. Außerdem soll die Landwirtschaft in Zukunft verstärkt nachwachsende Rohstoffe produzieren (Grüne Gentechnik, KWS, 2010).

### **1.2 DIE GRÜNE GENTECHNIK**

Grüne Gentechnik ist der Oberbegriff für eine Reihe von Verfahren, mit denen bestimmte Gene in das Erbgut von Pflanzenzellen eingebracht werden. Erst durch die Gentechnik wurde es möglich, die Veränderung des Erbgutes direkt zu steuern und genetisches Material nicht nur innerhalb einer Art auszutauschen, sondern auch zwischen völlig verschiedenen Organismen. Die Grüne Gentechnik greift so auf neue Eigenschaften zu, die mit klassischer Züchtung nicht zu erreichen wären. Die allgemeinen Ziele der Grünen Gentechnik unterscheiden sich kaum von denjenigen herkömmlicher Pflanzenzüchtung. Meist geht es um eine Verbesserung des Ertragspotentials, der Produktqualität oder eine verbesserte Widerstandsfähigkeit gegen Schädlinge, Krankheiten, Herbizide, Hitze, Trockenheit oder Kälte. Ertragssteigerung kann eine Chance für die Grünen Gentechnik sein (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; 2010).

Seit 1996 haben Landwirte in den USA erstmals gentechnisch veränderte Pflanzen auf ihren Feldern angebaut. 2009 nutzten 14 Millionen Landwirte in 25 Ländern der Welt solche Pflanzen. Die überwiegende Mehrzahl der Betriebe, 13 Millionen, waren Kleinbauern in Entwicklungs- und Schwellenländern. (Grüne Gentechnik, KWS, 2010)

International liegen umfangreiche Erfahrungen mit Freisetzungen von mehr als 100 Arten gentechnisch veränderter Pflanzen vor. Im Jahr 2009 wuchsen sie nach Industrieangaben auf 134 Millionen Hektar. Bezogen auf die weltweite Ackerfläche von circa 1,4 Milliarden Hektar sind das ungefähr 10 Prozent und etwa 2,7 Prozent der fünf Milliarden Hektar landwirtschaftlich genutzter Fläche (Ackerflächen, Dauergrünland und Dauerkulturen) oder fast dem Vierfachen der Gesamtfläche der Bundesrepublik Deutschland. Der weltweite Anbau konzentriert sich auf sechs Länder: USA (48 %, 64,0 von 170,4 Mio. ha), Argentinien (16 %, 21,4 von 32,5 Mio. ha), Brasilien (16 %, 21,3 von 59,5 Mio. ha), Kanada (6 %, 8,4 von 158,7 Mio. ha), Indien (6 %, 8,2 von 45,1 Mio. ha), China (3 %, 3,7 von 140,7 Mio. ha) und sonstige (5 %, 7,2 von 115,5 Mio. ha). Dort wachsen 95 Prozent aller weltweit angebauten gentechnisch veränderten Pflanzen. In Nord- und Südamerika sind das schon 88 %. Die Äcker der EU hingegen sind bisher weitgehend frei von Gentech-Anbau, obwohl in Spanien auf 0,1 % von 12,7 Mio. ha gentechnisch veränderte

Pflanzen ausgebracht werden. (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, 2009)

Der kommerzielle weltweite Anbau beschränkt sich hauptsächlich auf vier Pflanzenarten: Soja (52 %; 69 Mio. ha), Mais (31 %; 42 Mio. ha), Baumwolle (12 %; 16 Mio. ha) und Raps (5 %; 7 Mio. ha). Die auf dem Markt führenden transgenen Eigenschaften sind: Herbizidtoleranz (62 %), Insektenresistenz (15 %) sowie die Kombination von Herbizidtoleranz und Insektenresistenz (21 %) (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, 2009). In der EU entwickelt sich die landwirtschaftliche Nutzung der Grünen Gentechnik zurzeit gegen den weltweiten Trend. Vor allem wegen der Anbauverbote in Frankreich und Deutschland gingen die Anbauflächen für gentechnisch veränderten Bt-Mais 2009 um etwa 15.000 auf nunmehr 94.000 Hektar zurück. Der weitaus größte Teil dieser Flächen liegt in Spanien. Auf Bt-Mais entfallen unverändert 22 Prozent der spanischen Maiserzeugung. Im Jahr 2010 sollen gentechnisch veränderte Kartoffeln auf insgesamt 260 Hektar, verteilt auf Deutschland, Schweden und Tschechien, angebaut werden (Bundesverband Deutscher Pflanzzüchter, 2011). In der EU sind zwei gentechnisch veränderte Pflanzen zum Anbau zugelassen: Der Mais MON 810 des US-Unternehmens Monsanto seit 1998 und März 2010 die Gentech-Kartoffel Amflora der BASF seit 1998.

### 1.3 WEIZEN

Mit der ersten Auslese von Urformen des Weizens im fruchtbaren Zweistromland begann vor etwa 12.000 Jahren die Pflanzenzüchtung. Über Jahrtausende wurden die Werkzeuge der Pflanzenzüchtung weiterentwickelt, um bessere Sorten und hochwertigeres Saatgut zu erzeugen. (Bundesverband Deutscher Pflanzzüchter, 2011)

Weizen ist zusammen mit Mais und Reis das meist angebaute Getreide der Welt. Weizen ist ein perfekter Lieferant von Eiweiß, Kohlenhydraten und Vitamin B. Er wird auf allen Kontinenten mit Ausnahme der Antarktis kultiviert (Die transGEN Datenbank, 2010). Weizen erhält eines der größten (17.000 Mb) und komplexesten Genome unter den pflanzlichen und tierischen Genomen. Das hexaploide Genom besteht aus drei vollständig verschiedenen Genomen: aus *Triticum urartu*, (A), aus *Aegilops speltoides* (B) und aus *Aegilops tauschii* (D), die auf 42 Chromosomenverteilt sind. Es ist 40 Mal größer als das Reis- und acht Mal als Mais-Genom (Gill *et al.*, 2004).

Nach FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Angabe betrug die globale Weizenproduktion in den Jahren 2008/2009 683,8 Millionen Tonnen und der Handel mit

Weizen weltweit (Exporte) erreichte mit 139 Millionen Tonnen eine absoluten Rekordhöhe im gleichen Zeitraum. Die fünf größten und wichtigsten Anbauländer und Exporteure sind Argentinien, Australien, Kanada, die EU und die Vereinigten Staaten von Amerika (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010).

Verbreitet ist vor allem Sommerweizen (*Triticum aestivum*). Das Mehl wird für Brot, vielerlei Backwaren, und Weizenbier verwendet. Auch wird der Rohstoff sowohl für Stärke, Kleie (Ballaststoffe) als auch für Futtermittel benützt. Weizen kann ebenso als Energiepflanze (nachwachsende Rohstoffe) für die Erzeugung von Bioethanol und Wärme dienen. Die Stärke aus Weizenkörnern wird in verschiedenen industriellen Produkten, z.B. in der Papierindustrie verwendet (Die transGEN Datenbank, 2010). Teigwaren werden vor allem mit Hartweizen (*Triticum durum*) hergestellt.

Bei Weizen wird bisher keine gentechnisch veränderte Sorte angebaut. Doch viele Forschergruppen überall auf der Welt beschäftigen sich damit. Die Ziele der Gentechnikforschung am Weizen sind: Verbesserung der Trockentoleranz, Salzresistenz, Herbizidtoleranz, Pilzresistenz und Virusresistenz; ebenso von Produkteigenschaften wie z.B. eine veränderte Zusammensetzung der Inhaltsstoffe aber auch Wachstums- und Ertragsteigerung (Die transGEN Datenbank, 2010).

Freisetzungsversuche mit gentechnisch verändertem Weizen gibt es 419 in USA, 34 in der EU und in anderen Ländern wie Kanada, Argentinien, Japan, China, Australien, Ägypten und der Schweiz (Die transGEN Datenbank, 2010).

### **1.4 GENÜBERTRAGUNGEN IN WEIZEN**

#### **1.4.1 Gewebekultursysteme**

Die Gewebekultur als Grundlage zur Erzeugung transgener Pflanzen trägt auch zur genetischen Verbesserung des Weizens bei. Dabei müssen zuerst verschiedene Strategien zur Etablierung eines geeigneten *in vitro*-Systems geprüft werden.

Obwohl auch in Weizen *in vitro*-Techniken teilweise etabliert und gut untersucht sind, sind viele der Faktoren, die die Bildung von embryonem Kallus und die anschließende Pflanzenregeneration regulieren, bis heute nicht verstanden. Solche Faktoren können das Kulturmedium und die Kulturbedingungen, der Genotyp, das Ausgangsexplantat (Art des Explantates, physiologischer Zustand des Explantates und der Mutterpflanze), sowie deren Interaktionen sein. Diese spielen alle eine wesentliche Rolle bei der erfolgreichen Regeneration und Transformation des Gewebes (Fennell *et al.*, 1996; Rasco-Gaunt *et al.*, 1999).

Zur Induktion von regenerativem Kallus wurden neben unreifen Embryonen als Isolate bzw. Explantate auch unreife Infloreszenzen (Ozias-Akins und Vasil, 1982), Blattbasen (Ahuja *et al.*, 1982), Sproßapikalmeristeme (Wernicke und Milkovits, 1986) sowie Antheren und Mikrosporen (zur Übersicht: Henry und DeBuyser, 1990) eingesetzt. Die Explantate, mit denen die höchste Transformationsrate erhalten worden ist, sind unreife Embryonen (Vasil *et al.*, 1993, Weeks *et al.* 1993, Becker *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1995; Altpeter *et al.*, 1996a; Blechl and Anderson, 1996; Leckband and Lörz, 1998; Jordan, 2000; Huber *et al.*, 2002; Sykorova *et al.*, 2008), isolierte Scutella unreifer Embryonen (Nehra *et al.*, 1994; Barro *et al.*, 1997; Pastori *et al.*, 2001; Rasco-Gaunt *et al.* 2001), embryogene Scutellarkalli (Vasil *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1996; Iser *et al.*, 1999; Fettig and Hess, 1999, Weeks *et al.*, 2000) und aus Mikrosporen entstandene Kalli (Folling and Olesen, 2001). Die Regeneration aus Kallusgewebe verläuft entweder organogenetisch oder über eine somatische Embryogenese bzw. Embryoidbildung (Scott *et al.*, 1990). Der Weg der somatischen Embryogenese bzw. Embryoidbildung wird für Transformationsexperimente bevorzugt, da eine Chimärenbildung aufgrund des unizellulären Ursprungs der somatischen Embryonen unwahrscheinlich ist (Haccius, 1978; Vasil und Vasil, 1982; Vasil, 1987).

Das Entwicklungsstadium der Embryonen spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Bildung von embryogenem Kallus (Sears and Deckard, 1982; Maddock *et al.*, 1983; He *et al.*, 1986; Vasil 1987). Bei sehr jungen oder sehr alten Entwicklungsstadien findet keine Kallusbildung mehr statt. Da das am besten geeignete Entwicklungsstadium vom Weizengenotyp abhängt, ist eine Standardisierung von geeigneten Entwicklungsstadien nicht möglich.

Die Orientierung des Weizenembryos auf dem Kulturmedium bestimmt, aus welchem Organ sich der embryogene Kallus bildet. Befindet sich die axiale Oberfläche im Kontakt mit dem Medium, so bildet sich der Kallus aus dem Scutellum. Werden die Embryonen umgekehrt platziert, so bildet sich der Kallus aus dem Epiblasten (He *et al.*, 1986). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Bildung von embryogenem Kallus durchschnittlich stärker bei scutellarem als bei epiblastischem Kallus ist. Dennoch soll eine unterschiedliche Kallusinduktion der beiden Organe in Abhängigkeit vom Genotyp des Weizenembryos untersucht werden.

Bei den Veröffentlichungen über Weizentransformation der letzten Jahre überwiegt die Verwendung des MS-Mediums (Murashige und Skoog, 1962, in einigen Fällen etwas modifiziert) mit Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an 2,4-D und Saccharose als Induktionsmedium. Auch das L3 Medium mit Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an 2,4-D und Maltose wurde verwendet (Fettig and Hess, 1999; Huber *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden als Ausgangsexplantate unreife Weizen-Embryonen verwendet, da diese zur Erzeugung von embryogenem Kallus am ehesten geeignet sind (Scott *et al.*, 1990).

### 1.4.2 Transformationstechniken

Die Vertreter der *Poaceae* und insbesondere Weizen galten noch lange Zeit nach der ersten erfolgreichen Transformation von Tabak (Fraley *et al.*, 1983; Zambryski *et al.*, 1983) als nicht transformierbar. Die Verbesserung des Weizens durch die Gentechnologie verlangt den Transfer, die Integration und die Expression von Fremdgenen in geeignete regenerierbare Explantate.

Die verfügbaren Technologien und die verwendeten Methoden für die Produktion transgener Getreidearten sind kompliziert, und ihre Leistungsfähigkeit ist gering. Außerdem können verschiedene Sorten derselben Getreideart und sogar verschiedene Explantate derselben Sorte sehr verschiedene Transformationsmethoden erfordern (Danilova, 2007). Zur Erzeugung transgener Weizenpflanzen kann man sich des indirekten Gentransfers und der direkten Übertragung von DNA bedienen. Für die direkte Übertragung kommen die PEG-Technik (Lörz *et al.*, 1985; He *et al.*, 1994), die Elektroporation (Klöti *et al.*, 1993; He *et al.*, 1993; Sorokin *et al.*, 2000), die Silikoncarbidgefasertechnik (Omirulleh *et al.*, 1996; Brisibe *et al.*, 2000), die direkte Pollentechnik (Chong *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1998) und die Partikelbeschuss- oder Mikroprojektilbeschusstechnik (Klein *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1993) in Frage.

Heutzutage haben sich überwiegend zwei Transformationstechniken zur Erzeugung transgener Weizenpflanzen durchgesetzt. Eine davon ist die Partikelbeschusstechnik (Klein *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1993). Mit ihr hatten Vasil *et al.* (1992) die ersten fertilen und stabil transgenen Weizenpflanzen und daher die erste Getreideart über den Beschuss embryogener Kalli erhalten. Dieser biolistische Gentransfer hat mehrere entscheidende Vorteile: Der Beschuss jeder Art Pflanze oder jeden Gewebes ist möglich, die Zellwand als Hauptproblem der meisten Transformationsmethoden wird physikalisch überwunden, alle Genome in der Zelle können grundsätzlich erreicht werden und ein stabiler und transients Gentransfer sind optional. Trotz der Tatsache, dass es nicht möglich ist, die Anzahl der eingefügten DNA-Kopien im Wirtsgenom zu kontrollieren, und die Größe des Gens 10 kb üblicherweise nicht übersteigt, ist seit langer Zeit diese Methode die zuverlässigste Transformationstechnik für die Produktion von fertilen transgenen Weizenpflanzen (Vasil *et al.*, 1992, 1993, Weeks *et al.* 1993, Becker *et al.*, 1994; Nehra *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1995; Altpeter *et al.*, 1996a; Blechl and Anderson, 1996; Ortiz *et al.*, 1996; Pang *et al.*, 1996; Barro *et al.*, 1997; Iser *et al.*, 1999; Fettig and Hess, 1999, Weeks *et al.*, 2000; Pastori *et al.*, 2001; Rasco-Gaunt *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2002; Sykorova *et al.*,

2008; Pereira *et al.*, 2010). Die zweite Technik ist die indirekte Genübertragung über *Agrobacterium tumefaciens*, obwohl einkeimblättrige Pflanzen nicht zum natürlichen Wirtsspektrum von Agrobakterien gehören. Dennoch werden die Zellen einkeimblättriger Pflanzen durch *A. tumefaciens* transformiert (Kumlehn and Hensel, 2009). Cheng *et al.* (1997) haben die ersten stabilen transgenen Weizenpflanzen erhalten, die durch die Inkubation von unreifen Embryonen und embryogener Kalli mit *A. tumefaciens* transformiert wurden. Die Effizienz von gegenwärtig machbaren *Agrobacterium*-basierten Methoden im Weizen (Wu *et al.* 2003, Hu *et al.* 2003 Hensel *et al.* 2009) mit den durch Partikelbeschuss erhaltenen Ergebnissen vergleichbar. Gegenüber den direkten Techniken besitzt die indirekte Vorgehensweise diverse Vorteile: Hierzu gehört beispielsweise, dass in der Regel lediglich eine einzelne Genkopie in die Zelle übertragen wird (Hooykaas und Schilperoort, 1992, Vasil, 1994).

Interessante Ergebnisse wurden durch eine Kombination der Mikroprojektilbeschusstechnik und des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers erreicht. Diese Technologie, "agrolistic", könnte sich effizienter als die Mikroprojektilbeschusstechnik erweisen, weil die Gen-Kopien, die in Zellen übertragen werden, vorhersagbar sein könnten (Hansen and Chilton, 1996). Eine andere Kombination der Techniken ist der Gebrauch der Silikoncarbidgefasertechnik zusammen mit der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation (Singh and Chawla, 1999).

### 1.4.3 Osmotische Behandlung

Beim Gentransfer durch Mikroprojektilbeschuss regulieren grundsätzlich drei Parameter die Übertragungsrates der DNA in das Explantat. Diese sind die Mikroprojektile mit der gefällten DNA, die Beschussparameter und die Variabilitäten des Gewebes. Im Falle des letzten Parameters handelt es sich unter anderem um die Art des Explantats, osmotische Bedingungen des Explantatgewebes sowie der Auxintyp im Medium und dessen Konzentration (Rasco-Gaunt *et al.*, 1999).

Vain *et al.* (1993) haben eine Steigerung der transienten Expression und der stabilen Transformation von Zellen aus Mais Suspensionskulturen mittels einer osmotischen Behandlung vor und nach Beschuss festgestellt. Anschließend wurde von mehreren Arbeitsgruppen gefunden, dass diese Behandlung auch eine Erhöhung der transienten und stabilen Transformation von Embryonenzellen im Weizen erzeugt. Es ist erwähnenswert, dass in den meisten der untersuchten Fälle keine klare Beziehung zwischen transientser und stabiler Transformation festgestellt werden konnte (Patnaik and Khurana, 2001).

Die osmotische Behandlung erzeugt eine Plasmolyse der Gewebezellen. Dadurch wird eine Verminderung der Verletzung der Zellen während des Beschusses ermöglicht (Vain *et al.*, 1993).

Die am häufigsten verwendete osmotische Behandlung ist eine 4-stündige Behandlung vor und eine 16-stündige Behandlung nach Beschuss auf dem Induktionsmedium, dem eine äquimolare Mischung von Mannitol und Sorbitol (je 0,2 M und 0,5 M) oder nur Mannitol (0,4 M oder 1,0 M) zugesetzt werden. Diese Behandlung kennt man als „*short-term high osmotic treatment*“. Bei einer anderen Behandlung unterwirft man das Gewebe einer hohen Zuckerkonzentration (Maltose oder Saccharose) während der gesamten Induktionsperiode (Rasco-Gaunt *et al.*, 1999, 2001: 0,27 M Saccharose; Sparks and Jones, 2009: 0,27 M Saccharose;) oder erhöht die Zuckerkonzentration während der Vor- und Nach- dem Partikelbeschuss von 2 % auf 20 % (Bliffeld *et al.*, 1999) oder von 3 % Saccharose plus 15 % Maltose (Pellegrineschi *et al.*, 2002).

### 1.5 SELEKTION TRANSFORMIERTER INDIVIDUEN

Das DNA-Konstrukt oder Trägersystem (Plasmidvektoren) für die Transformation besteht aus Promotoren, kodierender Region (Selektionsgen, Reportergen und Nutzgen) und der Terminationssequenz. Über das Selektions- oder Reportergen kann man die transgenen Pflanzen vom Wildtyp unterscheiden. Die unter der Kontrolle konstitutiv exprimierender Promotoren stehenden Selektionsgene verleihen den transgenen Zellen, Organen oder Pflanzen Resistenz gegenüber Herbiziden oder Antibiotika. Für Cerealien genießen die Herbizidresistenzen Vorzug vor Antibiotikaresistenzen im Hinblick auf die daraus gewonnen menschlichen Nahrungsmittel. Es wird befürchtet, dass Antibiotica-Resistenzgene durch „horizontalen Gentransfer“ von pathogenen Bakterien aufgenommen werden, die dann nicht mehr bekämpft werden können. Grundsätzlich ist die Aufnahme von DNA unter natürlichen Bedingungen möglich, vor allem dort, wo bereits zersetztes pflanzliches Material auf große Bakterien-Mengen trifft: etwa im Magen-Darm-Trakt von Menschen und Tieren, in der Humusschicht von Böden oder bei Fermentationsvorgängen. Der Einbau von Pflanzengenen in das Genom von Bakterien und deren Expression sind jedoch äußerst seltene Ereignisse. Menschen verzehren täglich mehr als eine Billiarde (1.000.000.000.000.000) „Gene“, die seit Jahrtausenden problemlos verdaut werden. Es gibt keinen triftigen Grund zu der Annahme, dass ein in der Natur vorkommendes Gen, das nicht durch klassische Züchtung, sondern mittels Gentechnik in eine Pflanze übertragen wurde, nicht ebenso problemlos verdaut werden sollte (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; 2010). Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; 2010 [http://www.bvl.bund.de/DE/06\\_Gentechnik/gentechnik\\_node.html](http://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/gentechnik_node.html)

Im Juni 2009 hat die EFSA (*European Food Safety Authority*) einen zusammenfassenden Überblick zur Frage der Verwendung von Antibiotikaresistenz-Markergenen in genetisch veränderten Pflanzen veröffentlicht, der auch ein gemeinsames wissenschaftliches Gutachtens

des GMO-Gremiums und des BIOHAZ-Gremiums enthält. Die Gremien sind zu dem Ergebnis gelangt, dass negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt durch den Transfer der beiden Antibiotikaresistenz-Markergene *nptII* (Kanamycin/Neomycin-Resistenz) und *aadA* (Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz) von GV-Pflanzen auf Bakterien im Zusammenhang mit der Verwendung GV-Pflanzen den derzeitigen Erkenntnissen zufolge unwahrscheinlich sind. In dem Gutachten enthaltene Unwägbarkeiten sind auf eingeschränkte Möglichkeiten zurückzuführen, die u. a. mit der Probenahme und dem Nachweis sowie mit den Anforderungen bei der Einschätzung der Expositionswerte und mit der fehlenden Möglichkeit zusammenhängen, transferierbare Resistenzgene einer bestimmten Quelle zuzuordnen. Zwei Mitglieder des BIOHAZ-Gremiums brachten Minderheitsauffassungen über die Möglichkeit schädlicher Auswirkungen von Antibiotikaresistenz-Markergenen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt zum Ausdruck (*European Food Safety Authority*).

Der „vertikale Gentransfer“ tritt dagegen regelmäßig bei Pflanzen gleichen Verwandtschaftsgrades in der Natur auf. Er ist damit auch für gentechnisch veränderte Pflanzen zu erwarten, daher ist der Einsatz von Herbizidresistenz-Genen als Selektionsmarker für Hafer und Hirse nicht geeignet, weil sie mit ihren jeweiligen wilden Verwandten (Wildhafer und Johnson Gras, *Sorghum halipanse*) leicht hybridisieren können (Vasil, 1994).

Mit Reportergenen können die eingebrachten Gene einfacher erkannt (Danilova, 2007) und auch die Funktionsfähigkeit und die Gewebespezifität eines Promotors beurteilt werden (Lee *et al.*, 1995; Iser, 1995).

### 1.5.1 Selektionsgene für Weizen

Die im Folgenden genannten Gene wurden bereits erfolgreich zur Selektion transgener Weizenpflanzen eingesetzt:

#### 1.5.1.1 Antibiotikaresistenz-Marker

Die Antibiotika Kanamycin, Geneticin (G418), Hygromycin und Paromomycin gehören zu der sog. Aminoglycosidgruppe. Sie wurden häufig in der Getreide-Transformation verwendet. Diese Antibiotika binden an die 30S-Untereinheit des Ribosoms und verhindern somit die Translation in Bakterien und in den Plastiden der Pflanzenzellen (Razzaq *et al.*, 2004).

Nur die Gene, deren Produkte die Phosphorylierung von Aminoglykosid-Antibiotika (Tenover *et al.*, 1989) bewirken, wurden zur Selektion bei der Produktion von transgenen Pflanzen verwendet.

Die Hygromycin-Phosphotransferase, das Produkt des ***hpt*-Gens** aus *E. coli* (Van der Elzen *et al.*, 1985), verleiht Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin. Dieses selektierbare Markierungsgen wurde früher hauptsächlich zur Transformation von Reis eingesetzt (z.B. Shimamoto *et al.*, 1989), konnte aber in jüngster Zeit ebenfalls in Weizen (Ortiz *et al.*, 1996; Permingeat *et al.*, 2003; Chung and Khurana, 2003; Mitic *et al.*, 2004;) übertragen werden. Von Nachteil ist jedoch die hohe Toxizität von Hygromycin.

Das Neomycin-Phosphotransferase II (***npt II*-Gen** aus *E. coli* (Bevan *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983b) vermittelt Resistenz gegenüber den Antibiotika Kanamycin, Geneticin (G418), Paromomycin und Neomycin. Es wurde bereits 1975 in der pflanzlichen Gentechnik eingeführt (Hess, 1975; Hess, 1981). Gramineen besitzen natürlicherweise schon eine hohe Toleranz gegenüber Kanamycin (Nehra *et al.*, 1994), deswegen ist dieses Antibiotikum weniger nützlich bei der Selektion von transformiertem Weizen, Gerste und Reis (Dekeyser *et al.*, 1990; Hauptmann *et al.*, 1988). Dennoch konnten transgene Reis- (Zhang *et al.*, 1988), Mais- (D'Halluin *et al.*, 1992) und Weizenpflanzen (Vasil *et al.*, 1991; Nehra *et al.*, 1994; Viertel *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1997; Haliloglu and Baenziger, 2003; Gopalakrishna *et al.*, 2003) nach Selektion mit Kanamycin erhalten werden. Eine Selektion durch Geneticin führte sogar zu höheren Transformationsraten und einer geringeren Regeneration untransformierter Weizenpflanzen (Nehra *et al.*, 1994) als eine analog durchgeführte Transformation mit dem *bar*-Gen (siehe unten) und einer Selektion durch PPT (Nehra *et al.*, 1994).

### 1.5.1.2 Herbizidresistenz Marker

**Bei den derzeit kommerziell genutzten gentechnisch veränderten Pflanzen ist Herbizidresistenz bei weitem dominierend.**

Herbizidresistente Pflanzen gehören zu einem neuen „System“ zur Unkrautbekämpfung. Dieses besteht aus zwei Komponenten:

1. Einführung eines Gens, das die Pflanzen gegen ein Breitbandherbizid unempfindlich macht.
2. Das zum eingeführten Resistenz-Gen passende Komplementärherbizid, das nach Möglichkeit auf alle Pflanzen wirkt, indem es in den pflanzlichen Grundstoffwechsel eingreift - mit Ausnahme der Pflanzen, die über eine gentechnisch vermittelte Resistenz verfügen.

Sulfonylharnstoffe oder Imidazolinone sind eine Klasse von Breitbandherbiziden, die die Acetolat-Synthase (ALS) in Bakterien, Hefen und Pflanzen hemmen. Das ALS- oder AHAS-Enzym beteiligt sich an der Biosynthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin

und Valin. Durch den Transfer des mutierten **als-Gens** aus Reis wurden gegen diese Herbizide resistente Weizenpflanzen (Ogawa *et al.*, 2008; Kempe *et al.*, 2009) erhalten.

Glyphosat als aktiver Bestandteil des Totalherbizids RoundUp<sup>®</sup> (Monsanto) hemmt die pflanzliche 3-Enolpyruvyl-Shikimat-5-Phosphat-Synthase (EPSPS), und damit die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Resistenz gegen Glyphosat wird durch Änderung der Ziel-Stelle oder durch die Inaktivierung des Herbizids erhalten. Der kombinierte Transfer eines mutierten EPSPS-Gens kodiert durch **aroA-Gens** aus *Agrobacterium tumefaciens* CP4-Stamm (Barry *et al.*, 1992; Kishore *et al.*, 1992) und eines Glyphosat-Oxidoreduktase (**GOX**)-Gens (Barry *et al.*, 1992) führte zu einer Glyphosat-Resistenz in transgenen Weizenpflanzen (Zhou *et al.*, 1995), die auch für die Selektion Verwendung findet (Hu *et al.*, 2003).

Das am weitesten verbreitete Selektionssystem für transgene Getreidepflanzen basiert auf Bialaphos (L-Phosphinothricin), einem natürlichen Antibiotikum von *Streptomyces hygroscopicus* (Ogawa *et al.*, 1973). Bialaphos ist ein Tripeptid aus zwei L-Alaninmolekülen und einer der L-Glutaminsäure verwandten Aminosäure Phosphinothricin (PPT). Der antibiotische Effekt wird durch PPT vermittelt, das die Glutaminsynthetase hemmt, ein Schlüsselenzym bei der Umwandlung von L-Glutamat zu L-Glutamin in Pflanzenzellen. Die Unfähigkeit zur Glutaminsynthese in Pflanzen führt zur Störung des gesamten Aminosäurestoffwechsels und durch Anreicherung von Ammonium zur Hemmung der ATP-Synthese und schließlich zum Zelltod (Tachibana *et al.*, 1986). Phosphinothricin (PPT, Glufosinat) ist die aktive Komponente in den der Totalherbiziden Basta<sup>®</sup> (Hoechst), Liberty<sup>®</sup> (Fa. AgrEvo) und Herbiace<sup>®</sup> (Meiji Seika, Japan).

Die Gene **bar** aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987) bzw. **pat** aus *Streptomyces viridochromogenes* (Strauch *et al.*, 1988; Wohlleben *et al.*, 1988) codieren für das Enzym Phosphinothricin-Acetyltransferase, das PPT und damit Bialaphos durch Acetylierung inaktiviert. Zur Selektion von transgenem Weizen über PPT oder Bialaphos wurde bisher nur das **bar**-Gen verwendet (z.B. Vasil *et al.*, 1992; Vasil *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Nehra *et al.*, 1994; Weeks *et al.*, 1993; Iser *et al.*, 1999; Fettig and Hess, 1999; Huber *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Patnaik and Khurana, 2003; Mitic *et al.*, 2004; Pellegrineschi *et al.*, 2004).

Derzeit sind zwei dieser Herbizid-Resistenzsysteme verbreitet: RoundupReady (Wirkstoff: Glyphosat) und LibertyLink (Wirkstoff: Glufosinat).

Wright *et al.* (2001), Wenck *et al.* (2003) und Gadaleta *et al.* (2008) berichteten über den Einsatz eines nicht auf Antibiotika oder Herbizide gestützten Selektionssystems, das auf dem

Phosphomannose-Isomerasegen *manA* aus *Escherichia coli* basiert. Nur transgene Weizenpflanzen, die die Phosphomannose-Isomerase exprimieren, können das im Medium erhaltene Mannose-6-phosphat, das nicht als Kohlenstoffquelle für die meisten Pflanzen-Sorten genutzt werden kann, als Kohlenhydratquelle einsetzen, indem sie dieses in Fructose-6-phosphat umwandeln. Daher können sich die Zellen, in denen das *manA*-Gen aktiv ist auf Mannosehaltigen Medien gezogen werden.

Weeks (2000) berichtete über die Verwendung von Cyanamid-Hydratase *cah*-Gen als Selektionsmarker für die Weizen Transformation. Das Produkt des *cah*-Gens verleiht dem transformierten Gewebe die Fähigkeit, auf Cyanamid enthaltenden Medien durch Umwandlung Cyanamid in Harnstoff (als Stickstoffquelle) zu wachsen. Nicht resistente Pflanzen sterben bei Applikation von Cyanamid schnell ab.

### 1.5.1.3 Transgene Pflanzen ohne Selektionsgene

Es ist wünschenswert, transgene Pflanzen ohne die Verwendung von Selektionsgenen herzustellen. Einerseits ist die Einführung von zusätzlichen DNA-Sequenzen in Pflanzen zumindest in Deutschland bei der Mehrheit der Verbraucher nicht akzeptiert, andererseits könnte es, wie schon oben angeführt mögliche Umwelt-Auswirkungen aufgrund „vertikalen Gentransfers“ geben. Daher wird die Erzeugung der transgenen Pflanzen ohne Selektionsgene erwogen. Außerdem werden nach Identifizierung der transgenen Zellen die Markergene in der Regel nicht mehr benötigt. Daher gibt es eine Reihe von Forschungsansätzen, entweder den Gentransfer ohne Marker durchzuführen oder die Selektionsgene im Verlauf der Regeneration von Pflanzen aus der Gewebekultur zu entfernen. Für das erste Verfahren ist die PCR-Überprüfung aller regenerierter Pflanzen erforderlich, was nur im Kleinstmaßstab möglich ist; anwendbar ist das markerfreie Verfahren auch, wenn es deutliche phänotypische Unterschiede zwischen den transgenen und nicht-transgenen Pflanzen gibt. Mit einer solchen Methode konnten Parmingeat *et al.* (2003) 23 (2,1 %) transgene Weizenpflanzen von 1106 Explantaten erhalten, die durch die Mikroprojektilbeschusstechnik ohne selektierbares Markierungsgen transformiert wurden. Zweitens können Marker- oder Selektionsgene durch ortsspezifische Rekombination entfernt werden. Ein solches System ist das *cre/loxP*-Rekombinationssystem (Odell *et al.*, 1990), das erfolgreich bei Weizen eingesetzt wurde, um eine multiple Kopienzahl des übertragenen Gens auf eine einzige zu reduzieren (Sriwastrava *et al.*, 1999). Eine dritte Strategie zur Gewinnung von Marker-freiem transgenen Weizen ist die Cotransformation, das heißt die Einbringung des Marker- und des Nutz-Gen auf zwei verschiedenen Vektoren, die dann gleichzeitig durch direkte DNA-Transfer in Zellen eingeführt werden. Obwohl

Cotransformationsfrequenzen über 90 % bei Weizen (Altpeter *et al.*, 1996b; Fettig and Hess, 1999; Scheyhing, 1999; Huber *et al.*, 2002) berichtet wurden, war es schwierig, die beiden eingeführten Gene in den nachfolgenden Generationen wieder zu trennen. Dies ist wahrscheinlich auf die Einfügung von Transgenen in einen einzigen Locus oder in eng miteinander verbundenen Loci zurückzuführen (Altpeter *et al.*, 2005b).

### 1.5.2 Reportergene

Die Reportergene helfen, die eingebrachten Gene einfacher zu erkennen (Danilova, 2007) und auch die Funktionsfähigkeit und die Gewebespezifität eines Promotors zu bewerten (Lee *et al.*, 1995; Iser, 1995).

Die ersten zwei Schritte einer genetischen Transformation sind die Einführung einer Genkassette in die Rezipientenzellen sowie die Expression der eingebrachten Gene. Das Ergebnis dieser Ereignisse kann durch transiente Expression eines eingeführten Reportergens bewertet werden. Diese Expressionsanalysen erfordern keine Insertion des Transgens in das Wirtsgenom, und werden häufig verwendet, um die Gen- oder Promotor-Funktionsfähigkeit und die Gewebespezifität zu bewerten. Das ideale Reportergen kodiert für ein Protein, vorzugsweise mit einer enzymatischen Aktivität mit einem direkten oder indirekten sichtbaren Effekt, der einfach und innerhalb einer angemessenen Zeit (1-48 Stunden) nach der DNA-Einführung zu quantifizieren ist. Es ist auch anzustreben, dass das Reporterprotein eine geringe Hintergrund-Aktivität in Pflanzen zeigt, keinen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung hat, relativ resistent gegen Proteasen ist und über einen breiten Bereich von pH-Werten und Temperaturen stabil ist (Baga *et al.*, 1999). In stabil transformierten Pflanzen wird durch die Aktivität des Reportergens wiederum die Analyse von Induzierbarkeit, Gewebe- oder Stadienspezifität eines Promotors *in situ* möglich (z.B. Schaaf *et al.*, 1995). Bei der Transformation von Gramineen kommt den folgenden Reportergenen eine größere Bedeutung zu:

#### 1.5.2.1 Destruktive Nachweissysteme

Das Chloramphenicol-Acetyltransferasegen (*cat*) aus dem *Escherichia coli* Transposon Tn9 (Fromm *et al.*, 1985) kodiert eine Acetyltransferase welche das Antibioticum Chloramphenicol acetyliert und es dadurch unwirksam macht. Sowohl enzymatische Tests als auch immunochemische Analysen ermöglichen es, die CAT-Aktivität bzw. die Menge des CAT-Proteins zu messen. (Hauptmann *et al.*, 1988 und Chibbar *et al.*, 1991 für Weizen). Allerdings ist der Nachweis der CAT-Aktivität zeitaufwändig und destruktiv.

Das *Escherichia coli* **uidA**- bzw. **gusA**-Gen, kodiert das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase (GUS), das die hydrolytische Spaltung von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure, einem künstlichen Substrat katalysiert. Die dabei freigesetzten Indolylmonomere dimerisieren in Gegenwart von Sauerstoff zum wasserunlöslichen blauen Indigo (Jefferson *et al.*, 1987). Damit kann man das Enzym qualitativ nachweisen und seine Aktivität quantifizieren. Es ist das am häufigsten verwendete Reporter-gen zur Analyse der Promotor-Funktion und –Gewebespezifität in Pflanzen. Bei erfolgreichen Weizen-Transformationsarbeiten ist das *uidA*-Gen bis heute das meistverwendete Reporter-gen (Fettig and Hess, 1999; Permingeat *et al.*, 2003; Mitic *et al.*, 2004; Chung and Khurana, 2003; Oszvald *et al.*, 2008). Die quantitative Analyse erfolgt meist durch einen fluorometrischen Nachweis des 4-Methylumbelliferons, das aus dem Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid freigesetzt wird. Die Nachteile des GUS-Systems sind die destruktive Wirkung des Nachweisverfahrens auf die Zellen, die Tatsache, dass mehrere Pflanzen nennenswerte endogene Glucuronidaseaktivität besitzen, sowie mikrobielle Verunreinigungen, die eine Reporter-genaktivität „vortäuschen“ können (Tör *et al.*, 1992).

Ein **Oxo**-Gen, das für die Oxalat-Oxidase kodiert, wie das Weizen Germin-Gen (Simmonds *et al.*, 2004) als Reporter-gen verwendet werden kann. Die OxO-Aktivität kann durch ein entstehendes, purpurfarbenes Präzipitat, das durch Oxidation von 4-Chloro-1-naphtol in Gegenwart von  $H_2O_2$  entsteht, histochemisch nachgewiesen werden. Der Nachweis der Enzymaktivität ist wiederum sowohl qualitativ als auch quantitativ nutzbar (Duma *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996; Berna and Bernier 1997). Günstig ist, dass die Entfernung von Chlorophyll nicht erforderlich ist.

### 1.5.2.2 Nicht destruktive Nachweissysteme

#### 1.5.2.2.1 Nicht destruktiver Nachweis unter Verwendung eines exogenen Substrats

Das Luciferase-Reporter-gen **luc** aus der Feuerfliege *Photinus pyralis* (Ow *et al.*, 1987) bzw. **lux** aus *Vibrio harveyi* (Koncz *et al.*, 1987) ermöglicht einen sensitiven Nachweis der Aktivität ohne Zerstörung des Gewebes. Bei der Luciferase-katalysierten Oxidation von D(-)-Luciferin (ein externes Substrat) zu Oxiluciferin unter ATP-Verbrauch wird gelb-grünes Licht emittiert, das direkt im Gewebe mit konfokaler Mikroskopie nachweisbar ist. Das **luc**-Gen wurde erfolgreich zur stabilen Transformation von Weizen verwendet (Lonsdale *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 1999).

#### 1.5.2.2.2 Nicht destruktiver Nachweis ohne exogenes Substrat

Das *green fluorescent protein* (**gfp**)-Gen aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* stellt ein dem Luciferase-Gen ähnliches Reportersystem dar (Sheen *et al.*, 1995). Der entscheidende Vorteil

gegenüber dem Luciferase-System besteht darin, dass die Lichtemission des Proteins durch ultraviolette oder blaue Anregung erfolgt und keine exogenen Substrate zugeführt werden müssen. Weiterhin ermöglicht das *gfp*-System eine qualitative und quantitative Expressionsanalyse vom Zeitpunkt der Genübertragung bis zur transgenen Pflanze. Das synthetische grüne fluoreszierende Protein (*GFP*)-Gen wurde von Pang *et al.*, 1996 für transgene Weizenpflanzen verwendet. Das synthetische *gfp*-Gen hat eine 150-fach stärkere Fluoreszenz als das Wildtyp-*gfp*. Jordan (2000) berichtete über die Verwendung eines modifizierten *gfp*-Gens als sichtbarem Marker für den Nachweis von transgenen Weizenpflanzen auf der Grundlage der GFP-Expression allein. Weir *et al.*, (2001) und Huber *et al.*, (2002) verwendeten ebenfalls *gfp* als Reporter-gen in Weizen.

Die Gene *R*, *C1* und *B-peru* aus Mais können kodieren für Anthocyanbildung, und erlauben so wie das *gfp*-System eine einfache optische Analyse der Promotoraktivität (Ludwig *et al.*, 1990). Der farbige Phänotyp ist *in vivo* sichtbar und während der gesamten Pflanzenentwicklung stabil. Dieses Marker-System benötigt einen funktionierenden Anthocyan Biosynthese-Weg in der Wirtspflanze. Es ist für Getreide wie Mais, Gerste und Weizen verwendbar (Olsen *et al.*, 1993; Chawla *et al.*, 1999; Gopalakrishna *et al.*, 2003; Doshi *et al.*, 2007), jedoch wirkt sich Überexpression der Anthocyanbildung negativ auf das Regenerationsverhalten in der Gewebekultur aus (Chawla *et al.*, 1999).

### 1.6 PROMOTOREN

Promotorsequenzen sind der Schlüssel für die räumlichen, zeitlichen und quantitativen Muster der (Trans)genexpression. Dies gilt natürlich auch für stabile Transformanten, in denen das Transgene allgegenwärtig vorhanden ist (Hensel *et al.*, 2011).

Die phänotypische Wirkung eines Transgens ist stark abhängig von der Wahl des verwendeten Promotors. Allerdings hängt das Niveau der Expression vom Zelltyp, Entwicklungsstadium und Umweltbedingungen ab (Hensel *et al.*, 2011). Transgene verhalten sich nicht immer erwartungsgemäß, weil sie nicht zwingend wie natürliche Gene exprimiert werden (Baga *et al.*, 1999). Aufgrund der Komplexität vieler Genome und der Regulation ihrer Expression ist es von Vorteil, Promotoren aus gleichen oder eng verwandten Pflanzenarten für gentechnische Zwecke zu verwenden (Baga *et al.*, 1999). Manche Promotoren aus Monocotyledonen zeigen eine differentielle räumliche oder zeitliche Kontrolle der Expression in verschiedenen Getreidearten (Furtado *et al.*, 2009). Die Promotoren können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die konstitutiven und die gewebsspezifischen (Tab. 1). Die **konstitutiven Promotoren** werden zur Produktion von herbizid-, insekten- oder pathogenresistenten Kulturpflanzen verwendet, in

denen die Expression des Transgens in allen Geweben und Stadien der Pflanzenentwicklung stattfinden muss. Die hocheffizienten Promotoren wurden in der Regel von Genen, die allgemeine zelluläre Prozesse steuern, oder von viralen Genomen isoliert (Baga *et al.*, 1999). Die meisten der **gewebsspezifischen Promotoren** werden im Korn exprimiert (Kumlehn and Hensel, 2009). Durch verschiedene Umweltfaktoren wie Temperaturstress, hypoxische Wachstumsbedingungen oder Pathogenbefall induzierbare Promotoren haben alle das Potenzial für den Einsatz in der Entwicklung von Nutzpflanzen, die gegen diese verschiedenen Stressbedingungen Resistenz zeigen sollen (Baga *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Seneszenz-assoziierten Expression eines Isopentenyl-Transferase (*ipt*)-Gens die Promotoren **SAG12**- aus *Arabidopsis thaliana* (Lohman *et al.*, 1994) und **HvS40**- (*Hordeum vulgare* Seneszenz) der Gerste verwendet. Das **SAG12**-Gen codiert für eine Cysteinprotease. Wichtig ist, dass **SAG12** Seneszenz-spezifisch ist, aber nicht Blatt-spezifisch. Zusätzlich zur Blattseneszenz wird das Gen in anderen seneszenten grünen Geweben und Blütenorganen exprimiert (Gan and Amasino, 1997). Die Expression des **HvS40**-Gens aus Gerste (*Hordeum vulgare*) in Fahnenblättern kann sowohl durch Dunkelheit (Becker und Apel, 1993; Kleber-Janke and Krupinska, 1997) als auch im Zuge der natürlichen Seneszenz und durch Pathogenbefall induziert werden (Krupinska *et al.*, 2002). Die Genexpression von **HvS40** korreliert mit dem Rückgang der photosynthetischen Effizienz (Humbeck *et al.*, 1996) und steht hauptsächlich im Zusammenhang mit dem Abbau der photosynthetischen Leistung, die während der Blattseneszenz stattfindet (Krupinska *et al.*, 2002). Das **HvS40** wurde als Seneszenz-Marker-Gen für Gerste vorgeschlagen.

Zur Verstärkung der Expression der in Konstrukten für Getreide eingesetzten Promotoren werden häufig Intronsequenzen, wie das *shrunken1*-Intron I (Vasil *et al.*, 1989) oder das *adh*-Intron 1 (Callis *et al.*, 1987) aus Mais, oder Enhancer-Sequenzen verwendet. Enhancer gehören zum Bereich der Distanz-unabhängigen Cis-acting-elemente und liegen in der Regel stromaufwärts vom Core-element des Promotors. *Enhancer* wirken über Transkriptionsfaktoren als Regelemente der Transkription. Pflanzliche *Introns* wirken meist post-transkriptionell über eine Erhöhung der translationalen Aktivität der mRNA (Callis *et al.*, 1987; Mascarenhas *et al.*, 1990). Die Markierungs-/Reportergene, die in dieser Arbeit angewendet wurden, enthalten drei Introns. Der *Ubiquitin*-Promotor mit Exon und Intron (Christensen *et al.*, 1992) aus *Zea mays* sowie das Intron des ST-LS1-Gen aus *Solanum tuberosum* (Eckes *et al.*, 1986) und das Intron des 70 kD Hitzeschockprotein (HSP70) aus *Zea mays* zur Verstärkung des *CaMV 35S*-Promotors. Während das ST-LS1-Intron dazu dient, die Expression des Gens in Prokaryoten wie

Agrobakterien zu verhindern, handelt es sich bei dem HSP 70-Intron um ein translationelles Enhancerelement.

**Tab. 1: Überblick über die Promotoren, die in der vorliegenden Arbeit und auch schon früher in Weizen verwendet wurden.**

Promotor (Herkunft)	Referenz	Bemerkung
<i>Ubi-1</i> (Mais <i>UBIQUITIN-1</i> )	Huber <i>et al.</i> , 2002	Konstitutive BAR-Expression mit konstant hohem Niveau der Genexpression in jungen metabolisch aktiven Geweben und Pollen
<i>CaMV 35S</i> (Cauliflower Mosaic Virus)	Huber <i>et al.</i> , 2002	Konstitutive <i>gfp</i> -Expression. Bis zu 100-fach geringere Aktivität in Getreiden (Fromm <i>et al.</i> , 1985; Hauptmann <i>et al.</i> , 1987) verglichen mit Tabak
<i>SAG12</i> ( <i>Arabidopsis</i> )	Sykorova <i>et al.</i> , 2008	Seneszenz-assoziiert in Weizen-Fahnenblättern.

Leader-Sequenzen und Polyadenylierung verbessern die Translation. Studien an Eukaryonten haben gezeigt, dass Stabilität und Export der mRNA aus dem Kern und die Translations-Effizienz durch die 5' nicht-codierenden *Leader*-Sequenzen in 5'-Position und die ebenfalls nicht-codierenden Terminationssequenzen am 3'-Ende der mRNA beeinflusst wird. Die Weizen *Em 5' Leader*-Sequenz erhöhte die Genexpression in Reis-Protoplasten um das Zehnfache, wenn sie zwischen dem *CaMV 35S*-Promotor und dem Reporter *gusA* platziert wurde (Marcotte *et al.*, 1989).

## 1.7 NUTZGENE IN DER WEIZENTRANSFORMATION

Die Ziele der gentechnischen Verbesserung von Weizen sind mit denen der konventionellen Züchtung identisch: Qualitätsverbesserung und Ertragssteigerung stehen im Vordergrund.

### 1.7.1 Verbesserung des Nährwerts

Zusätzlich zum Brennwert ist Weizen mit seinem hohen Eiweißgehalt eine wichtige Eiweißquelle für die menschlichen Ernährung: Reis, Mais und Weizen liefern mehr als 60 % der Kalorien und Proteine für unser tägliches Leben (Gill *et al.*, 2004). Wichtige Ziele der Weizen-Gentechnik sind die Erhöhung der Kornqualität hinsichtlich des Eiweißgehalts, des Gehalts an essentiellen Aminosäuren wie Lysin und Tryptophan, der Erhöhung der hochmolekularen (HMW) Glutenine für die Brotherstellung und die Modifizierung der Stärke-Zusammensetzung (Patnaik and Khurana, 2001; Godwin *et al.*, 2009).

Zur Verwendung als Beimischung im Tierfutter wurde zur Verbesserung der Verdaulichkeit und der Verfügbarkeit von Phosphat und Mineralien das Phytase-Gen *phyA* aus *Aspergillus niger* in Weizen übertragen (Brinch-Pedersen *et al.*, 2000).

### 1.7.2 Resistenz gegen biotische Schadfaktoren und abiotische Stressfaktoren

Die Bekämpfung von Schädlingen und Pathogenen ist stark auf Chemikalien angewiesen. Trotz einer deutlichen Steigerung des Pestizideinsatzes sind Ernteverluste in den letzten 40 Jahren nicht signifikant zurückgegangen (Oerke, 2006). Weizen ist durch verschiedene Pathogene, wie Viren, Bakterien und Pilze, sowie durch Schädlinge wie Insekten und Nematoden bedroht (Vasil, 1994, Oerke, 2006).

Dieser Umstand erfordert die Erzeugung von Kultursorten mit erhöhter Resistenz gegenüber diesen Schadorganismen sowohl durch konventionelle Züchtung als auch durch gentechnischen Transfer von Nutzgenen. Zu diesen zählen Gene, die für **PR-Proteine** (*pathogenesis-related proteins*) kodieren und in Pflanzen als Reaktion auf mikrobielle Krankheitserreger oder Schadinsekten induziert werden (Muthukrishnan *et al.*, 2001). Der Transfer eines Trypsin-Inhibitor- (**BTI-CMe**) Gens aus Gerste, (Altpeter *et al.*, 1999) und eines Lectin-Agglutinin- (**gna**) Gens aus *Galanthus nivalis* (Stoger *et al.*, 1999) in Weizen führte in beiden Fällen zu einer erhöhten Resistenz gegen Schadinsekten (Altpeter *et al.*, 1999, Stoger *et al.*, 1999). Strategien gegen phytopathogene Pilzinfektionen verursachte Krankheiten, auf die die meisten Ernteverluste zurückzuführen sind, wurden in Weizen mit unterschiedlichem Erfolg angewandt (Leckband und Lörz, 1998; Fettig and Hess, 1999; Chen *et al.*, 1999; Bliffeld *et al.*, 1999; Clausen *et al.* 2000; Pellegrineschi *et al.*, 2001; Altpeter *et al.*, 2005b). Auch Virus-Infektionen verursachen große Ertragsverluste (Burrows *et al.*, 2009). So konnten transgene Weizenpflanzen erzeugt werden, die eine hohe Resistenz gegen das Gersten Strichelmosaik-Virus (BSMV) zeigten (Zhang *et al.*, 2001).

Dürre ist einer der wichtigsten abiotischen Stressfaktoren, der gravierende Verluste in der Landwirtschaft hervorruft. Verschiedene gentechnische Methoden zur Verbesserung der Trockenheitstoleranz in Weizen wurden publiziert (Sahrawat *et al.*, 2003, Pellegrineschi *et al.*, 2004, Gruszka Vendruscolo *et al.*, 2007).

### 1.7.3 Seneszenzverzögerung als Strategie der Ertragssteigerung

#### 1.7.3.1 Pflanzliche Seneszenz

Im Pflanzenreich kann man vier verschiedene Seneszenz-Typen unterscheiden: (1) Monokarpische Seneszenz bedeutet das Absterben der ganzen Pflanze nach der Frucht- und Samenreife (Nooden *et al.*, 1997), wobei bei den annualen Pflanzen wie Getreiden die Remobilisierung aus seneszierenden Blättern (Source) den größten Teil der Nährstoffe für die Endosperm Bildung (Sink) liefert (Feller and Kleist 1986). (2) Polykarpische Seneszenz: Unter diesen Typ fallen die ausdauernden Stauden, Sträucher und Bäume mit einer periodischen und in der Regel synchronen Seneszenz und Abszission der Blätter (z.B. Laubbäume im herbstlichen Blattfall); (3) Sequenzielle Seneszenz der Blattorgane: Zu diesem Typ gehört die Blattalterung vieler Nadelbäume, aber auch die von Phytomer zu Phytomer fortschreitende Seneszenz der älteren Blattorgane bei monokarpischen Pflanzen („Stockwerk-Seneszenz“) und (4) Seneszenz der gesamten oberirdischen Pflanzenteile: Zu diesem Typ rechnet man die Kryptophyten, die ihre Erneuerungsknospen unter der Erdoberfläche tragen (Rhizomgeophyten, Zwiebelgeophyten, Schopfer und Brennicke, 2010).

Blattseneszenz ist der letzte Abschnitt der Blattentwicklung und ein hoch koordinierter und komplexer Prozess, der als programmierter Zelltod (PCD = programmed cell death) beschrieben wird. Der programmierte Zelltod kann die ganze Pflanze oder nur einzelne Organe betreffen (Quirino *et al.*, 2000, Dangl *et al.*, 2000). In Getreiden scheint die Seneszenz auf der Ebene der einzelnen Blätter induziert zu werden (Gregersen *et al.*, 2008); sie geht von den Mesophyllzellen aus (Lim *et al.*, 2007). Sie unterliegt aber dem Einfluss vieler Umweltfaktoren (Dürre, extreme Temperaturen, Nährstoff-Mangel, Beschattung und Infektion durch Pathogene). Ein wichtiger Seneszenzfaktor ist der oxidative Stress, der die Alterung sowohl auslösen als auch fördern kann (Beck und Scheibe, 2003; Mittler *et al.* 2011). Endogen kann die Seneszenz durch Alterung oder durch das Umschalten von der vegetativen auf die reproduktive Entwicklung ausgelöst werden, wobei Phytohormone eine große Rolle spielen. Auxin, Cytokinine und Gibberelline nehmen in ihrer Wirkung ab, Abscisinsäure und Ethylen, und wohl auch Jasmonate dagegen zu (zur Übersicht: Smart, 1994; Gan und Amasino, 1996, Lim *et al.*, 2007). Während der Seneszenz kommt es durch Genexpression zu geordneten Veränderungen im Metabolismus und in der Zellstruktur. Sie kann in drei Stadien unterteilt werden. (1) Die **Initiationsphase** der Seneszenz verbunden mit Wachstumsstopp (Hensel *et al.* 1993). (2) In der darauf folgenden **Reorganisationsphase** bleiben Zellkern und Mitochondrien, die essentiell für die Expression Seneszenz-induzierter Gene sind funktionell (Lim *et al.*, 2007). Der Grundstoffwechsel bleibt aber bis zum Zelltod erhalten, um den Abbau von Makromolekülen (Stärke, Proteinen,

Chlorophyll und Nukleinsäuren) und den Export von Abbauprodukten und Mineralstoffen ins Phloem zu gewährleisten (Gregersen et al., 2008). Die frühesten strukturellen Änderungen finden in den Chloroplasten statt, durch Auflösung der Grana und Bildung von Plastoglobuli. Photosynthese wird durch den Katabolismus abgelöst (Gan and Amasino, 1997). Eine geeignete Methode zur Verfolgung der Chloroplasten-Seneszenz ist die Messung des Chlorophyll-Verlusts und der photochemischen Effizienz (Lim *et al.*, 2007). Da der Antennenkomplex von Photosystem II relativ viel Chlorophyll b enthält, äußert sich der Abbau der Antennen zunächst in einer Verschiebung des Chlorophyll-*a/b*-Verhältnisses zugunsten von Chlorophyll *a* (Schopfer und Brennicke, 2010). Entsprechend ihres Proteinanteils in der Pflanzenzelle ist der Abbau der Photosyntheseproteine wohl das wichtigste Ereignis der Seneszenz, wobei eine Verlagerung der stickstoffhaltigen Abbauprodukte hauptsächlich in das Korn stattfindet (Gregersen et al., 2008). Beim kleinkörnigen Getreide wie Gerste, Weizen und Reis kann bis zu 90 % des aus den alternden Pflanzenteilen exportierten Stickstoffs in das Korn transportiert werden. Die Reorganisationsphase ist bis zu einem bestimmten Zeitpunkt (*point of no return*) reversibel (Kleber-Janke and Krupinska 1997, Thomas & Donnison 2000). (3) Die **Endphase** führt letztlich zum Tod des seneszierenden Organs (Pennell and Lamb 1997, Dangl *et al.*, 2000).

### 1.7.3.2 Seneszenz-assoziierte Gene

Während der Seneszenz wird die Expression Seneszenz-assoziiierter Gene (SAGs) induziert oder verstärkt (Lim *et al.*, 2007). Die funktionelle Diversität der SAGs spricht für eine Feinregulation der verschiedenen zellulären Aktivitäten zur kontrollierten Steuerung der Abbauprozesse (Quirino *et al.*, 2000). Mit Hilfe der Microarray-Technik sind mehr als 800 Gene identifiziert worden, die während der Seneszenz in einem regulatorischen hochkomplexen Netzwerk exprimiert werden. (Lim *et al.*, 2007).

Die SAGs werden in zwei Klassen eingeteilt. Klasse I repräsentiert seneszenzspezifische SAGs, deren mRNAs nur während der Seneszenz auftreten. *SAG12*- und *HvS40*-Gen gehören zu dieser Klasse. Die Klasse II besteht aus SAGs, die bereits früh in der Blattentwicklung nachweisbar sind, d.h. eine basale Expression aufweisen, die sich während der Seneszenz erhöht. Die Analyse der SAG Promotorsequenz hat ergeben, dass die Regulierung der SAG Expression multifaktoriell ist, d.h. dass die verschiedenen SAGs keine gemeinsamen Steuerelemente (*cis*-Elemente) in ihren Promotorregionen haben (Gan and Amasino, 1997). Auch sind einige SAGs für potenzielle regulatorische Faktoren gefunden worden, die Komponenten der Signal-Wahrnehmung und -Transduktion sind, wie Transkriptionsfaktoren und Rezeptor-ähnliche Kinasen (Lim *et al.*, 2007).

In der Analyse des Transkriptoms von Weizen-Fahnenblättern wurden insgesamt einige hundert Gene gefunden, die während der Seneszenz hochreguliert sind (Kajimura *et al.*, 2010). Unter diesen Genen konnten 140 funktionell zugeordnet werden (Gregersen *et al.*, 2008). Sie sind vor allem an abbauenden Prozessen, regulatorischen Prozessen, Stress-Reaktionen, Transport und Sekundärstoffwechsel beteiligt. Ein Vergleich der Genexpressions-Muster zwischen abiotische und biotische Stress-Reaktionen und Blattseneszenz zeigt zahlreiche Übereinstimmungen (Lim *et al.*, 2007; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

### 1.7.3.3 Molekulargenetische Strategien zur Manipulation der Blattseneszenz

Die Blätter mit verzögerter Seneszenz oder "stay green"-Phänotyp haben eine längere aktive Photosyntheseperiode und es wurde eine positive Korrelation zwischen Chlorophyll-Gehalt (oder visuelle Seneszenz) und Kornertrag sowie dem Gesamt-Stickstoff-Gehalt des Korns gefunden (Gregersen *et al.*, 2008). Zhang *et al.* (2006) zeigten, dass eine ertragreiche Weizensorte einen verzögerten Abbau der Komponenten des photosynthetischen Apparates hat. Daher gilt Verzögerung des Seneszenz-Phänotyps als ein Zuchtziel. Wenn durch gezielte Zucht oder genetische Manipulationen die Verlängerung der Zeit bis zur Reife erreicht werden kann, könnte die Produktivität vermutlich angehoben werden (Gregersen *et al.*, 2008). Es ist offensichtlich, dass es eine genetische Grundlage für Variationen in Zeitablauf und Rate der Blattseneszenz in Weizen gibt, jedoch ist die Manipulation des Seneszenz-Prozesses sehr komplex (Gregersen *et al.*, 2008). Ein anderes Dilemma, das gelöst werden muss, ist die verzögerte Stickstoff-Remobilisierung und der damit geringere Ernte-Index (Gregersen *et al.*, 2008), obwohl die verzögerte Seneszenz grundsätzlich zu einem hohen Kornertrag führen kann.

Die Reaktion auf Veränderung der Umwelt, sowie die Entwicklung einer Pflanze wird durch Hormone in komplexer Weise gesteuert. Hormonelle Steuerung spielt in allen Phasen der Blattseneszenz eine wichtige Rolle (Lim *et al.*, 2007). Stark involviert sind hierbei die Cytokinine, die entscheidend bei der Regulierung der Proliferation und Differenzierung von Zellen von Pflanzen sind. Sie sind auch an verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen in Pflanzen beteiligt, wie z.B. die Verzögerung der Seneszenz und Ertragssteigerung (Sakakibara, 2006). Generell werden die Cytokinin-Biosynthese und -Homöostase fein durch eine interne Kontrolle und externe Faktoren wie andere Phytohormone und anorganische Stickstoffquellen gesteuert (Sakakibara, 2006). Sie werden im Zytosol und den Plastiden synthetisiert und besitzen verschiedene Wirkorte in der Pflanze (Sakakibara, 2006). Plastiden sind die wichtigsten subzellulären Kompartimente der *de novo* Cytokininbiosynthese (Sakakibara, 2006). Weit verbreitete natürliche isoprenoide Cytokinine sind N<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)-

Adenin (iP), *trans*-Zeatin (tZ), *cis*-Zeatin (cZ) und dihydrozeatin (DZ). Unter ihnen sind die wichtigsten Derivate tZ und iP sowie deren glykosidische Konjugate. Je nach Pflanzenart, Gewebe und Entwicklungsstadium variieren sie stark (Sakakibara, 2006). Die biologisch aktiven Cytokinine werden von Cytokinin-Oxidasen/Dehydrogenasen (CKXs) und durch Konjugation mit Zuckerresten durch Glykosyltransferasen (UGTs) inaktiviert (Werner and Schmülling, 2009). In Übereinstimmung mit dem physiologischen Erkenntnis, dass die Cytokininkonzentration während der Blattseneszenz sinkt, haben molekulargenetische Analysen ergeben, dass die beteiligten Gene der Cytokininsynthese, eine Cytokininsynthase und eine Adenosinphosphat Isopentenyl-Transferase (IPT), herunterreguliert und dagegen die Cytokinin-Oxidase hochreguliert wurde in seneszenten Blättern (Lim *et al.*, 2007).

Die Gabe von exogenen Cytokininern verzögert die Blattseneszenz (Lim *et al.*, 2007). In vielen Pflanzenarten steigt die Konzentration an Ethylen während der Blattseneszenz (Lim *et al.*, 2007). Deshalb versuchen Züchtungsstrategien entweder die Produktion der Seneszenz-verzögernden Cytokinine zu steigern oder die Bildung oder Wirkung des Seneszenz-induzierenden Ethylens zu verringern (Gan and Amasino, 1997). In der Cytokininbiosynthese wird der erste und limitierende Schritt durch die IPTs (Isopentenyl-Transferasen) katalysiert, die je nach den Substraten als Adenosin-Phosphat-IPTs oder tRNA-IPTs bezeichnet werden (Werner and Schmülling, 2009). Die ATP/ADP-IPTs sind für die Synthese von iP-Cytokininern und *trans*-Zeatinen (tZ) in *Arabidopsis* verantwortlich (Werner and Schmülling, 2009), wohingegen *Cis*-Zeatin (cZ)-Cytokinine, die in einigen Pflanzenarten dominierende Cytokinin-metaboliten sind, in *Arabidopsis* ausschließlich durch tRNA-IPTs synthetisiert werden (Werner and Schmülling, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines Isopentenyl-Transferase (*ipt*)-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* seneszenzverzögernd in transgenen Pflanzen wirkte (Estruch *et al.*, 1991). Bei einer konstitutiven Überexpression ist jedoch problematisch, dass zu hohe Cytokinin-Konzentrationen in transgenen Pflanzen auch zu unerwünschten Nebeneffekten wie z.B. Bruch der apikalen Dominanz und verminderter Wurzelbildung führen können. Erst durch die Verwendung geeigneter Genkonstrukte konnte dieses Problem umgangen werden. Der **SAG12**-Promotor ist hoch seneszenzspezifisch und aktiviert die Expression von IPT erst zu Beginn der Seneszenz, aber bevor der „*point of no return*“ erreicht ist. Die durch verstärkte Cytokininbildung verzögerte Seneszenz resultiert wiederum in einer verminderten Aktivität des Seneszenz-spezifischen Promotors, was eine Überproduktion der Cytokinine verhindert. So bildet sich eine autoregulatorische Schleife. Da eine exogene Cytokinin-Behandlung die Blattseneszenz in einer Vielzahl von einkeim- und zweikeimblättrige Pflanzenarten verlangsamen kann, könnte die Strategie der autoregulatorischen Produktion der Cytokinine das

Potenzial haben, die Seneszenz in einem breiten Spektrum an Pflanzen zu verzögern (Gan und Amasino, 1995). So führte der Transfer eines *ipt*-Gens unter der Kontrolle des *SAG12*-Promotors zu einer deutlichen Verzögerung der Blattseneszenz und einer vermehrten Blüten-, Biomasse- und Samenproduktion in transgenem Tabak (Gan and Amasino, 1995) und Reis (Lin *et al.*, 2002). In Salat (McCabe *et al.*, 2001), Brokkoli (Che *et al.*, 2001) und Weizen (Xi *et al.*, 2004a, b und Sykorova *et al.*, 2008) kam es nur zur Verzögerung der Blattseneszenz. In Mais wurde keine Verzögerung der Blattseneszenz, allerdings entwickelten sich beide Blüten in jedem Ährchen (Young *et al.*, 2004).

### 1.8 ZIELSETZUNG

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Regeneration von argentinischen Weizenpflanzen, wozu geeignete argentinische Genotypen hinsichtlich ihrer Kallusbildung und anschließender Regeneration zur ganzen Pflanze durch ein Screening von Weizenvarietäten untersucht werden sollten. Am Ende musste überprüft werden, ob die erhaltenen Regenerate fertil sind. Die argentinischen Sorten sind Standardsorten in meiner Heimat und wurden von der staatlichen INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) und zwei privaten Saatzuchtfirmen (Criadores Klein S.A. und José Buck S.A.) zur Verfügung gestellt.

Das zweite Ziel war, mit dem Nutzen transformierte Pflanzen zu erhalten. Die bestehenden Transformationssysteme sind arbeitsintensiv und zeitaufwendig und für die im ersten Teil ausgewählte argentinische Weizensorte (Klein Brujo) existierte kein auf Partikelbeschusstechnik basierendes Transformationssystem. Deswegen wurde in dieser Arbeit versucht, ein besseres Transformationsprotokoll für das gewählte Kultivar zu etablieren.

Das dritte Ziel war der Versuch, den Seneszenz-Prozess zu verzögern, um höhere Korn-Erträge erreichen zu können. Dazu sollte durch die Übertragung eines Isopentenyl-Transferase-Gens mit Hilfe der Partikelbeschusstechnik die Cytokininbiosynthese in Weizen (*Triticum aestivum* L.) beeinflusst werden. Hierzu sollte die proteincodierende Region des Isopentenyl-Transferase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt werden.

Über den Einsatz eines entsprechenden Promotors sollten zwei Zielsetzungen verfolgt werden:

Einerseits sollte es nach Transfer mit Hilfe des *uidA*-Gens überprüft werden, ob der *HvS40*-Promotor, der ein seneszenzspezifischer Promotor aus Gerste ist und daher aus der näheren Verwandtschaft von Weizen stammt, auch in Weizen funktionsfähig ist. Hierzu sollte die transiente und stabile Expression des Gens ermittelt und mit dem Expressionsprofil des Promotors in Gerste verglichen werden. Andererseits sollte der *HvS40*-Promotor und das Isopentenyltransferasegen in einem Transformationsvektor kombiniert werden. Anschließend sollte nach der Gewinnung transgener Pflanzen untersucht werden, ob das

Konstrukt einen Einfluss auf die Blattseneszenz über die verstärkte Biosynthese von Cytokinin, und als Konsequenz davon wiederum auf die Ertragsleistung der Weizenpflanzen hat. Parallel dazu sollte auch das *SAG12-ipt* Konstrukt eingesetzt werden. Der *SAG12*-Promotor aus *Arabidopsis* ist ebenfalls ein seneszenzspezifischer Promotor, mit dem schon Getreide wie Reis (Lin *et al.*, 2002), Mais (Young *et al.*, 2004) und Weizen (Sykorova *et al.*, 2008) transformiert wurden.

Um die genannten Ziele verwirklichen und bewerten zu können, war es erforderlich, eine entsprechend große Zahl an transgenen Weizen zu erzeugen. Hierbei wurden als Rezipienten eine gut transformierbare argentinische Sommerweizenvarietät und eine Modell-Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L. Bobwhite) verwendet. Um die Auswirkungen der Genübertragung auf die Physiologie zu untersuchen, mussten der Cytokiningehalt, der Chlorophyllgehalt sowie die Biomasse- und Kornproduktion derjenigen Pflanzen mit der höchsten Fremdgenexpression getestet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIALIEN

#### 2.1.1 Bakterienstämme

##### 2.1.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan 1983)

Genotyp: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup> *phoA supE44* $\lambda$ <sup>-</sup> *thi-1 gyrA96 relA1*

##### 2.1.1.2 Kulturmedium für *E. coli*-Stämme

10 g LB Broth (DUCHEFA) wurden in 0,5 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst; Agar (bei Festmedium) 8 g/l; pH 8.0.

Nach dem Autoklavieren des Mediums (121 °C, 2 bar, 20 min) wurde Ampicillin in entsprechender Konzentration zugegeben.

#### 2.1.2 Pflanzenmaterial

##### 2.1.2.1 Weizen (*Triticum aestivum* L.)

Zu den Experimenten dieser Arbeit wurden 23, davon 22 argentinische und eine Modell-Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L. Bobwhite SH 98 26) herangezogen. Tab. 2 gibt einen kurzen Überblick über die verwendeten Kultivare.

Keimung und Anzucht der Spenderpflanzen erfolgten ganzjährig im Gewächshaus in 10 Liter Plastikgefäßen, in die je 30 Karyopsen ausgesät wurden. Als Substrat diente ein Gemisch aus 70 % Kompost und 30 % Lehm. Die Mindesttemperatur betrug 20 °C und die Mindestbeleuchtungsstärke 180  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in Pflanzenhöhe, die durch eine Zusatzbeleuchtung mit Quecksilberdampf lampen gewährleistet wurde. Zur wöchentlichen Düngung wurde der Volldünger „GabiPlus“ (N/P/K = 12/8/11) verwendet. Pflanzenschutzmaßnahmen wurden im Bedarfsfall mit Netzschwefel 80WP (Stähler Agrochemie GmbH & Co, Stade) gegen echten Mehltau und Spritzungen mit Pirimor<sup>®</sup> (ICI, Frankfurt) und Spruzit<sup>®</sup> (Neudorff GmbH, Emmerthal) gegen saugende Insekten durchgeführt.

**Tab. 2: Bezugsquellen der eingesetzten Sommerweizenvarietäten.**

<b>Namen der Weizenvarietäten</b>	<b>Saatgutzüchter</b>
1-Buck Charrua (BCh)	<b>José Buck S.A.</b>
2-Buck Poncho (BP)	<b>José Buck S.A.</b>
3-Klein Cobre (KC)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
4-Klein Pegaso (KP)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
5-Klein Cacique (KCa)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
6-Klein Don Enrique (KDE)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
7-Klein Brujo (KB)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
8-Klein Escorpión (KE)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
9-Klein Volcan (KV)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
10-Klein Dragon (KD)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
11-Klein Estrella (KEs)	<b>Criadores Klein S.A.</b>
12-Printa Oasis (PO)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
13-Printa Elite (PE)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
14-Don Ernesto Inta (DEI)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
15-Printa Imperial (PI)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
16-Printa Alazán (PA)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
17-Printa Granar (PG)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
18-Printa Federal (PF)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
19-Inta Huen-pan (IH)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
20-Printa Puntal (PP)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
21-PrintaBonaerense Remodón (PBR)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
22-Printa Cauquen. (PC)	<b>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria</b>
23-129 Bobwhite SH 98 26 (Bw)	<b>CIMMYT, El Batán, Mexiko</b>

#### 2.1.2.2 Tabak

*Nicotiana tabacum* cv. **Wisconsin 38** mit *SAG12:GUS* und *SAG12:IPT* (Gan and Amasino 1997) wurden als Positivkontrolle bei der Analyse transgener Weizenpflanzen verwendet. Sie wurden von Richard Amasino (Universität Madison) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.3 Nukleinsäuren

##### 2.1.3.1 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion wurden von der Firma Metabion-International AG und MWG-Biotech AG bezogen.

Primer für das *uidA*-Gens/ PCR-Produkt-Größe: 400 bp

Primer *uidA* 1 (21mer): 5'-GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG-3'

Schmelzpunkt lt. Hersteller: 61,8 °C

Primer *uidA* 2 (20mer): 5'-TGG ATC CCG GCA TAG TTA AA-3'.

Schmelzpunkt lt. Hersteller: 55,3 °C

Primer für das Isopentenyl-Transferase (*ipt*)-Gens/ PCR-Produkt-Größe: 730 bp

Primer *ipt* 1 (19mer): 5'-ACC CAT GGA CCT GCA TCT A-3'.

Schmelzpunkt lt. Hersteller: 57,3 °C

Primer *ipt* 2 (22mer): 5'-GGA GCT CAG GGC TGG CGT AAC C-3'

Schmelzpunkt lt. Hersteller: 69,6 °C

2.1.3.2 Für die Transformation von Weizen verwendete Plasmide.

In Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Plasmide, die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen.

Die Plasmide **pS40-GUS** (Abb. 14) und **pSG506** sind jeweils ein Derivat des Vektors pBluescript II SK- und des Vektors pUC 18 und enthalten das aus *E. coli* (Jefferson *et al.*, 1987) stammende *uidA*- (bzw. *gusA*-) Gen, jeweils unter der Kontrolle des in Pflanzen induzierbar exprimierten *HvS40*-Promotors der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) (Becker and Apel (1993)) und des SAG12-Promotors aus *Arabidopsis thaliana* (Lohman *et al.*, 1994).

Das Plasmid **pGFPBAR** (Abb. 19) besitzt neben dem selektierbaren Markierungsgen *bar* die synthetische proteincodierende S65T-*gfp*-Region (Pang *et al.*, 1996). Das *bar*-Gen stammt aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987) und steht unter der Kontrolle des in Pflanzen konstitutiv exprimierten *Ubiquitin*-Promotors mit Exon und Intron (Christensen *et al.*, 1992) aus *Zea mays*. Die S65T-*gfp*-Region enthält das Intron des ST-LS1-Gens (codiert für eine Komponente des wasseroxidierenden Komplexes des Photosystems II) aus *Solanum tuberosum* (Eckes *et al.*, 1986) aus dem Vektor pMON30049 (Pang *et al.*, 1996), unter der Kontrolle eines in Pflanzen konstitutiv exprimierten *CaMV 35S*-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus. Dem *CaMV 35S*-Promotor nachgeschaltet ist das Intron des 70 kD Hitzeschockproteins (HSP70) aus *Zea mays*. Während das ST-LS1-Intron dazu dient, die Expression des Gens in Prokaryoten zu verhindern, handelt es sich bei dem HSP 70-Intron um ein translationelles Enhancerelement. Als Terminator für beide Konstrukte dient die Terminationssequenz des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Das Plasmid **pSG516** (Abb. 14) ist ein Derivat des Vektors pUC 18 und enthält das Isopentenyltransferase (*ipt*)-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens* (Li *et al.*, 1992) unter der

Kontrolle des in Pflanzen bei Seneszenz induzierten SAG12-Promotor aus *Arabidopsis thaliana* (Lohman *et al.*, 1994).

**Tab. 3: Übersicht über die Plasmide, die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen.**

Plasmid	Resistenz ([mg x l <sup>-1</sup> ])	Größe [kb]	Verwendungszweck	Referenz
pS40-GUS	Ampicillin [100]	8,4	Transformation/ Konstruktion	Krupsinska <i>et al.</i> , 2002
pSG506	Ampicillin [100]	7,6	Transformation	Gan and Amasino, 1995
pGFPBAR	Ampicillin [100]	8,8	Transformation	Huber und Hess, 2002
pSG516	Ampicillin [100]	5,9	Transformation/ Konstruktion	Gan and Amasino, 1995
pS40-IPT	Ampicillin [100]	5,7	Transformation	diese Arbeit

#### 2.1.4 Pflanzenkulturmedien

2.1.4.1 MS-Medium (Barcelo and Lazzeri, 1995, modifiziert) zur Induktion, Kultur von Weizenkallus und osmotischen Behandlung von unreifen Embryonen:

Zusammensetzung pro Liter:

<b>Makroelemente:</b>	1900 mg KNO <sub>3</sub> ; 1650 mg NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ; 440 mg CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 370 mg MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 170 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Mikroelemente:</b>	19,9 mg MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 8,6 mg ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 6,3 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,83 mg KJ; 0,25 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,025 mg CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O; 0,025 mg CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
<b>Fe-EDTA:</b>	37,3 mg Na <sub>2</sub> EDTA; 27,8 mg FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
<b>Vitamine:</b>	100 mg myo-Inosit; 0,1 mg Thiamin HCl; 0,5 mg Nicotinsäure; 0,5 mg Pyridoxin HCl; 2 mg Glycin
<b>Aminosäuren:</b>	750 mg Glutamin; 150 mg Prolin; 100 mg Asparagin
<b>Phytohormone:</b>	1 mg (= 5 µM) und 2 mg (= 10 µM) 2,4-D
<b>Kohlenhydrate</b>	30 g und 90 g Maltose
<b>Verfestigungsmittel</b>	8 g Plantagar (Duchefa)
<b>BASTA® (Hoechst):</b>	fallweise 4,0 mg Phosphinothricin (PPT) aus einer BASTA®-Stammlösung von 200 g x l <sup>-1</sup> PPT, vor dem Sterilfiltrieren zugegeben
<b>Mannit</b>	91,08 g (=0,5 M)
<b>pH:</b>	5.8 (vor der Sterilfiltration mit NaOH)

Sowohl die Mengen der folgenden Mikroelemente  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (0,118 statt 0,07 mM),  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (0,053 statt 0,036 mM),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,102 statt 0,100) als auch der Aminosäuren (für jede doppelt Menge) wurden modifiziert. Als Kohlenhydrat wurde Maltose statt Saccharose verwendet. Die Komponenten des Mediums wurden doppelt konzentriert sterilfiltriert (Media Cap, Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ , Microgon) und vor dem Gießen zur Verfestigung im Verhältnis 1:1 mit einer aufgekochten und auf ca. 50 °C abgekühlten Plantagar-Lösung gemischt. Der Bestandteil Mannit wurde in osmotische Behandlung Medien bei Transformation von Weizen durch Partikelbeschuss verwendet. Zur Bestimmung des Einflusses von Osmolarität des MS-Mediums auf in vitro Kultur und Transformation, wurden Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen von Maltose (3 %, und 9 %) getestet. Das MS-Medium, das 30 oder 90 g Maltose enthält, wurde je nachdem M3 oder M9 genannt.

2.1.4.2 L3-5 Medium (Jähne *et al.*, 1991; modifiziert) zur Induktion und Kultur von Weizenkallus und osmotischen Behandlung von unreifen Embryonen:

Zusammensetzung pro Liter:

<b>Makroelemente:</b>	1750 mg $\text{KNO}_3$ ; 450 mg $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 350 mg $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 200 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 200 mg $\text{NH}_4\text{NO}_3$
<b>Mikroelemente:</b>	18,95 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 9,23 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 5 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,75 mg KJ; 0,25 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 mg $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
<b>Fe-EDTA:</b>	37,3 mg $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 27,8 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
<b>Vitamine:</b>	100 mg myo-Inosit; 10 mg Thiamin HCl; 1 mg Ascorbinsäure; 1 mg Nicotinsäure; 1 mg p-Aminobenzoesäure; 1 mg Pyridoxin HCl; 0,5 mg Ca-Pantothenat; 0,5 mg Cholinchlorid; 0,2 mg Folsäure; 0,1 mg Riboflavin; 0,005 mg Biotin
<b>Aminosäuren:</b>	750 mg Glutamin; 150 mg Prolin; 100 mg Asparagin
<b>Organische Säuren:</b>	10 mg Äpfelsäure; 10 mg Citronensäure; 10 mg Fumarsäure; 5 mg Natriumpyruvat
<b>Kohlenhydrate:</b>	125 mg Cellobiose; 125 mg Fructose; 125 mg Mannose; 125 mg Rhamnose; 125 mg Ribose; 125 mg Xylose; 30 g Maltose
<b>Phytohormone:</b>	1 mg (= 5 $\mu\text{M}$ ) 2,4-D
<b>Verfestigungsmittel</b>	2 g Gelrite <sup>®</sup> (Roth):
<b>BASTA<sup>®</sup> (Hoechst):</b>	fallweise 4,0 mg Phosphinothricin (PPT) aus einer BASTA <sup>®</sup> -Stammlösung von 200 g $\times \text{l}^{-1}$ PPT, vor dem Sterilfiltrieren zugegeben
<b>pH:</b>	5.8

Die Komponenten des Mediums wurden doppelt konzentriert sterilfiltriert (Media Cap, Porengröße 0,2 µm, Microgon) und vor dem Gießen zur Verfestigung im Verhältnis 1:1 mit einer aufgekochten und auf ca. 50 °C abgekühlten Gelrite-Lösung gemischt.

2.1.4.3 R1-Medium (Murashige und Skoog, 1962, modifiziert; Ahuja *et al.*, 1982) zur Regeneration aus Weizen-Gewebekulturen:

Zusammensetzung pro Liter:

<b>Makroelemente:</b>	1,9 g KNO <sub>3</sub> ; 1,65 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ; 440 mg CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 370 mg MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 170 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Mikroelemente:</b>	16,9 mg MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 8,6 mg ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 6,3 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,83 mg KJ; 0,25 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,025 mg CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O; 0,025 mg CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
<b>Fe-EDTA:</b>	37,3 mg Na <sub>2</sub> EDTA; 27,8 mg FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
<b>Vitamine:</b>	100 mg myo-Inosit; 10 mg Thiamin HCl; 1 mg Nicotinsäure; 1 mg Pyridoxin-HCl (nach Gamborg <i>et al.</i> , 1968)
<b>Kohlenhydrate:</b>	30 g Maltose
<b>Phytohormone:</b>	0,5 mg (= 2,22 µM) BAP; 0,05 mg (= 0,25 µM) NAA
<b>Gelrite:</b>	2 g
<b>BASTA®:</b>	4,0 mg Phosphinothricin (PPT) aus einer BASTA®-Stammlösung von 200 g x l <sup>-1</sup> PPT, vor dem Autoklavieren zugegeben
<b>pH:</b>	5.8 (vor dem Autoklavieren (121 °C, bar, 20 min))

Das Gelrite wurde doppelt konzentriert unter Erwärmen gelöst, mit dem doppelt konzentrierten Medium gemischt und autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min).

2.1.4.4 190-2-Medium (Zhuan *et al.*, 1984) zur Bewurzelung der Regeneratpflanzen

Zusammensetzung pro Liter:

<b>Makroelemente:</b>	1 g KNO <sub>3</sub> ; 300 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 200 mg MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 200 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 100 mg Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O; 40 mg KCl
<b>Mikroelemente:</b>	6 mg MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 3 mg ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 3 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,5 mg KJ
<b>Fe-EDTA:</b>	37,3 mg Na <sub>2</sub> EDTA; 27,8 mg FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
<b>Vitamine:</b>	100 mg myo-Inosit; 1 mg Thiamin HCl; 0,5 mg Pyridoxin HCl; 0,5 mg Nicotinsäure
<b>Aminosäuren:</b>	2 mg Glycin
<b>Kohlenhydrate:</b>	30 g Saccharose
<b>Verfestigungsmittel</b>	2 g Gelrite® (Roth):
<b>Aktivkohle:</b>	10 g

**pH:** 6.0 (vor dem autoklavieren (121 °C, bar, 20 min))

2.1.4.5 WH-Medium (Wagner und Hess, 1973) zur sterilen Anzucht von isolierten Weizenembryonen und zur Regeneration aus Weizen-Gewebekulturen:

Zusammensetzung pro Liter:

<b>Makroelemente:</b>	500mg Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O; 125mg KNO <sub>3</sub> ; 125 mg MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 125 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Mikroelemente:</b>	3 mg MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 0,5 mg ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 0,5 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,025 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,025 mg CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
<b>Fe-EDTA:</b>	37,3 mg Na <sub>2</sub> EDTA; 27,8 mg FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
<b>Vitamine:</b>	500 mg myo-Inosit; 0,250 mg Thiamin HCl; 1,25 mg Nicotinsäure; 0,250 mg Pyridoxin-HCl; 0,250 mg Riboflavin; 0,250 mg Ca-Pantothenat
<b>Kohlenhydrate:</b>	20 g Saccharose
<b>Phytohormone:</b>	0,100 mg (= 0,57 µM) Indoleessigsäure
<b>Caseinhydrolysat</b>	500,000 mg
<b>Aminosäuren</b>	7,5 mg Glycin
<b>Verfestigungsmittel</b>	8 g Plantagar (Duchefa):
<b>BASTA®:</b>	fallweise 4,0 mg, Phosphinothricin (PPT) aus einer BASTA®-Stammlösung von 200 g x l <sup>-1</sup> PPT, vor dem Autoklavieren zugegeben
<b>pH:</b>	5.8 (vor dem Autoklavieren (121 °C, bar, 20 min))

### 2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Duchefa, Fluka, Fermentas, Merck, Roth, oder Sigma bezogen.

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Transformation von *TRITICUM AESTIVUM* L.

#### 2.2.1.1 Anzucht des Pflanzenmaterials

Die Keimung und Anzucht der Weizenpflanzen erfolgte ganzjährig im Gewächshaus. Pro 10 Liter Plastikgefäß wurden 30 Karyopsen ausgesät. Das Substrat war Einheitserde (50 % Torf, 40 % Kompost und 10 % Sand) und wurde ungedüngt steril gedämpft, anschließend mit Langzeitdünger (N/P/K = 15/10/10) gemischt. Der pH-Wert war 6,5. Eine Zusatzbeleuchtung mit Quecksilberdampflampen gewährte für das ganze Jahr eine Mindestbeleuchtungsstärke von  $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in Pflanzenhöhe. Die Mindesttemperatur betrug 20 °C. Im Bedarfsfall wurde mit Netzschwefel 80WP (Stähler Agrochemie GmbH & Co, Stade) gegen echten Mehltau gespritzt. Saugende Insekten wurden mit Pirimor<sup>®</sup> (ICI, Frankfurt) und Spruzit<sup>®</sup> (Neudorff GmbH, Emmerthal) bekämpft.

#### 2.2.1.2 Bestimmung der Getreidewachstumsentwicklung nach der Zadoks Skala

Zur Verfolgung der Weizen Ontogenese wurde die Zadoks Skala (Zadoks *et al.*, 1974) verwendet. Sie ist die umfassendste Skala und am einfachsten zu verwenden. Sie beschreibt alle Stufen des Getreidewachstumszyklus und beruht auf einem dezimalen Code von 10 bis 99, der verschiedene Aspekte der Pflanzenentwicklung berücksichtigt (Tab.9).

Die Bestimmung der Entwicklungsstadien mit der Zadoks Skala war eine zuverlässigere und praktischere Methode als die Tage nach der Blütezeit zu kontrollieren, wie es in vorangegangenen Arbeiten zu diesem Thema üblich war (Ozias-Akins und Vasil, 1982; Redway *et al.*, 1990; Varshney and Altpeter, 2001; Keresa *et al.*, 2003, Özgen *et al.*, 1998; Viertel *et al.*, 1998; Talukder *et al.*, 2004; Dagüstü, 2008). Die Methode „Tage nach der Blütezeit“ ist nicht sehr genau und ist stark vom Genotyp und den Bedingungen im Gewächshaus abhängig (Scott *et al.*, 1990).

**Tab. 4: Zadoks Skala (Zadoks *et al.*, 1974)**

Code	Description	Code	Description
<b>0 Germination</b>			
0.0	Dry seed	38	Flag leaf ligule just visible
0.1	Start of imbibition	39	Flag leaf ligule just visible

## MATERIAL UND METHODEN

---

0.2	Imbibition complete	<b>4.0</b>	<b>Booting</b>
0.3	Radicle emerged from seed	41	Flag leaf sheath extending
0.4	Coleoptile emerged from seed	43	Boots just visible and swollen
0.5	Leaf just at coleoptile tip	45	Boots swollen
<b>1.0</b>	<b>Seedling growth</b>	47	Flag leaf sheath opening
10	First leaf through coleoptile	49	First awns visible
11	1 leaf unfolded	<b>5.0</b>	<b>Ear emergence</b>
12	2 leaves unfolded	51	First spikelet of ear just visible
13	3 leaves unfolded	53	One-fourth of ear visible
14	4 leaves unfolded	55	One-half of ear emerged
15	5 leaves unfolded	57	Three-fourths of ear emerged
16	6 leaves unfolded	59	Emergence of ear complete
17	7 leaves unfolded	<b>6.0</b>	<b>Flowering</b>
18	8 leaves unfolded	61	Beginning of flowering
19	9 leaves or more unfolded	65	Flowering half-way complete
<b>2.0</b>	<b>Tillering</b>	69	Flowering complete
20	Main shoot only	<b>7.0</b>	<b>Milk development</b>
21	Main shoot and 1 tiller	71	Seed water ripe
22	Main shoot and 2 tillers	73	Early milk
23	Main shoot and 3 tillers	75	Medium milk
24	Main shoot and 4 tillers	77	Late milk
25	Main shoot and 5 tillers	<b>8.0</b>	<b>Dough development</b>
26	Main shoot and 6 tillers	83	Early dough (fingernail impression not held)
27	Main shoot and 7 tillers	85	Soft dough
28	Main shoot and 8 tillers	87	Hard dough
29	Main shoot and 9 or more tillers	<b>9.0</b>	<b>Ripening</b>

<b>3.0 Stem elongation</b>	91	Seed hard (difficult to divide with thumbnail)
30 Pseudo-stem erection	92	Seed hard (cannot dent with thumbnail)
31 1 <sup>st</sup> node detectable	93	Seed loosening in daytime
32 2 <sup>nd</sup> node detectable	94	Seed over-ripe; straw dead and collapsing
33 3 <sup>rd</sup> node detectable	95	Seed dormant
34 4* node detectable	96	Viable seed giving 50 % germination
35 5 <sup>th</sup> node detectable	97	Seed not dormant
36 6 <sup>th</sup> node detectable	98	Secondary dormancy induced
37 Flag leaf just visible	99	Secondary dormancy lost

### 2.2.1.3 Gewebekulturen

#### 2.2.1.3.1 Isolierung und Kultur unreifer Embryonen

Zur Kultur unreifer Weizenembryonen wurden unreife Karyopsen herangezogen. Verschiedene Methoden werden verwendet, um das Entwicklungsstadium von Embryos zu bestimmen. Eine genauere Methode, um die Korn-Ontogenese zu erkennen, ist es, die morphologischen Merkmale des Kornes nach der Zadoks-Skala (Tab. 4) zu überprüfen. Die entspelzten Karyopsen wurden 15 min in einer 25 %igen „Domestos-Stammlösung“ oberflächensterilisiert und anschließend 4 mal in sterilem Wasser gewaschen. Unreife Embryonen wurden unter dem Stereomikroskop präpariert, indem die Karyopse oberhalb des Embryos aufgeschnitten und dieser unter leichtem Druck mit dem Skalpell auf die Spitze der Karyopse freigelegt wurde. Die so präparierten unreifen Embryonen wurden zur Kallusinduktion mit der embryonalen Achse nach unten auf MS- oder L3-5-Medium (siehe 2.2.3.3.1/2) gelegt. Ihr Potenzial zur Bildung embryogener Kalli wurde nach drei Wochen geprüft.

Domestos-Stammlösung: 10,5 % [v/v] NaOCl; 0,3 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 10 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) NaOH.

#### 2.2.1.3.2 Entwicklungsstadien der unreifen Embryonen während des Screenings

Während des Screenings der 22 Weizenvarietäten wurde mit zwei Arten von Ausgangsembryonen gearbeitet, die sich in Embryolänge und Länge des Scutellums

unterschieden (Tab. 5). Die Entwicklungsstadien entsprechen den Entwicklungsstufen II für H und IV für B nach He *et al.* (1986).

In dieser Phase wurde als Kulturmedium das L3-5-Medium (Jähne, 1991) verwendet, welches 2,4-D enthält, ein synthetisches Auxin. Die präparierten unreifen Embryonen wurden zur Kallusinduktion drei Wochen bei 25 °C und Dunkelheit kultiviert.

Für die Regeneration wurde Kallus nicht älter als drei Wochen verwendet. Die Subkultur erfolgte auf R1-Medium (Murashige und Skoog, 1962, modifiziert, Ahuja *et al.*; 1982). Hierbei wurde die Sprossbildung des embryogenen Kallus ausgewertet.

**Tab. 5: Entwicklungsstadien der Weizenembryonen**

Entwicklungsstadium	Embryolänge	Scutellumlänge	Scutellumaussehen
H	≅ 1,54	≅ 1,30	Durchsichtig
W	≅ 2,23	≅ 2	Undurchsichtig

#### 2.2.1.3.3 Embryokultur („embryo rescue“)

Die Kultur von Weizenembryonen wurde bei Karyopsen mit schwach entwickeltem Endosperm durchgeführt („embryo rescue“) und um Analysen des Endosperms ohne den Verlust der Nachkommenpflanze durchführen zu können. Karyopsen von transgenen Weizenpflanzen wurden wie unter 2.2.1.3.1 oberflächensterilisiert (Sterilisationsdauer: 60 min) und gewaschen. Nach erfolgter Quellung im letzten Waschwasser (4 h) wurde der Embryo mit einem Schnitt vor dem Scutellum von der Karyopse getrennt und auf WH-Medium (s. 2.1.4.5) in Replikaschalen ausgelegt. Die gekeimten Embryonen wurden nach fünf Tagen auf ein Bewurzelungsmedium (s. 2.1.4.4) in 1000 ml Glasgefäßen umgesetzt und nach weiteren fünf Tagen in Erde überführt. Die Pflanzen wurden dazu in Plastiktöpfe (Ø: 9 cm) mit gesiebter autoklavierter Einheitserde gesetzt. Die Akklimation erfolgte unter einer durchsichtigen Plastiktüte zunächst für 2 Tage im Kulturschrank (25 °C, 16 h Photoperiode), dann im Gewächshaus, wo nach zwei weiteren Tagen die Plastiktüte entfernt wurde.

#### 2.2.1.4 Transformation von Weizen durch Partikelbeschuss

##### 2.2.1.4.1 Aufbereitung und Sterilisierung der Mikroprojekte

Es wurden 60 mg Goldpartikel (Durchmesser 0,6 und 1 µm; BioRAD) in 70 % Ethanol aufgenommen und 10 min geschüttelt. Nach Abzentrifugieren (ca. 10 s) in der Tischzentrifuge

wurde der Überstand verworfen und die Goldpartikel dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden diese in 1 ml einer 50 %igen Glycerinlösung aufgenommen.

### 2.2.1.4.2 *Beladung der Mikroprojekte*

In 50  $\mu$ l homogenisierter Goldsuspension wurden je 5  $\mu$ l DNA-Lösung (Konzentration 1  $\mu$ g/  $\mu$ l), pipettiert und 1 min gründlich durchmischt und auf Eis gestellt. Durch die gleichzeitige Zugabe von 20  $\mu$ l einer 0,1 M Spermidinlösung und 50  $\mu$ l einer 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde die Fällung der DNA erreicht. Diese Suspension wurde 6 min vorsichtig durchmischt und anschließend 20 min bei RT inkubiert (Jordan, 2000) und danach kurz abzentrifugiert. Der entstandene Niederschlag wurde zweimal mit 250  $\mu$ l 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und in 72  $\mu$ l 98 % [v/v] Ethanol aufgenommen. Pro Beschuss wurden 6  $\mu$ l (0,8  $\mu$ g Plasmid-DNA, 250  $\mu$ g Gold) der Suspension eingesetzt.

### 2.2.1.4.3 *Vorbereitung der Makroprojekte*

Die Makroprojekte wurden 1 h in 70% [v/v] Ethanol oberflächensterilisiert, getrocknet und in die dafür vorgesehenen Halterungen eingesetzt. Die 6  $\mu$ l Gold-DNA-Suspension (bei Kontrollen Gold-Suspension) wurde in die Mitte der Makroprojekte aufgetropft und die Trocknung der Goldsuspension unter Sterilbank abgewartet.

### 2.2.1.4.4 *Partikelbeschuss*

Sämtliche Transformationsexperimente wurden mit der Partikelbeschusstechnik (Sanford et al., 1993) durchgeführt. Die Apparatur (PDS-1000/He, Russel-Kikkert, 1993) sowie alle Zubehörteile wurden von der Firma BioRad, München, bezogen. Das Vakuum betrug 27 Zoll Quecksilbersäule. Dies entspricht einem Unterdruck von circa 915 hpa. Der Beschussdruck wurde durch *Rupture Disks* der Sollwerte 900 und 1350 psi (ca. 60000 und 87000 hpa) reguliert. Helium der Reinheit 4.6 wurde für den Beschuss verwendet. Die Abstände zwischen Zielgewebe und *Stopping Screen* betragen 6,5; 9,5 und 12,5 cm (zur Vereinfachung im Folgenden als Abstände 6, 9 und 12 bezeichnet), zwischen Makroprojektil und *Stopping Screen* ca. 3 mm und zwischen *Rupture Disks* und Makroprojektil ca. 10 mm.

### 2.2.1.4.5 *Partikelbeschuss von unreifen Embryonen*

Pro Beschuss wurden zwischen 25 und 30 unreife Embryonen präpariert und zur Kallusinduktion auf M3, M9 oder L3-5-Medium ausgelegt. In Tabelle 6, 7 und 8 gibt eine Übersicht über die Behandlungen zur Optimierung der Transformationseffizienzen, die während die Cotransformation immer die pGFPBAR zuerst mit pS40-GUS und pSG506 und danach mit den

## MATERIAL UND METHODEN

pS40-IPT und pSG516 ausprobiert wurden. Als osmotische Behandlung wurden die Embryonen auf frisches Kallusinduktionsmedium mit 0,5 M Mannit umgesetzt. Diese osmotische Behandlung wurde für 4 bis 5 h vor und für 16 h nach dem Partikelbeschuss aufrechterhalten.

Zur weiteren Kultur wurden die Embryonen auf frisches Kallusinduktionsmedium ohne Mannit überführt. Nach drei Wochen auf dem Induktionsmedium begann die Selektion auf dem Regenerationsmedium mit 4 mg/l PPT. Bei Bedarf wurden noch 2-3 Wochen auf dem Bewurzelungsmedium weiterkultiviert.

**Tab. 6: Überblick über die Transformationsversuchen mit den Plasmiden pGFPBAR und pS40-GUS. „O.o.B“.: Ohne osmotische Behandlung.**

Medium	Transformations- variante	Kallusinduktions- anfang (Vorkultur) (in Stunde)	Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter (cm)	Beschussdruck (psi) / Durchmesser-Goldpartikel (µm)
L3-5	1	0 (O.o.B.)	6	1350 / 1,0
	2		9	
	3	0	6	
	4		9	
	5	20	6	
	6		9	
	7	72	6	
	8		9	
	9	96	6	
	10		9	
	11	120	6	
	12		9	
M 3	13	0 (O.o.B.)	6	1350 / 1,0
	14		9	
	15	0	6	
	16		9	
	17	20	6	
	18		9	
	19	72	6	
	20		9	
	21	96	6	
	22		9	
	23	120	6	
	24		9	

MATERIAL UND METHODEN

M 9	25	0 (O.o.B.)	6	1350 / 1,0
	26		9	
	27	0	6	
	28		9	
	29	20	6	
	30		9	
	31	72	6	
	32		9	
	33	96	6	
	34		9	
	35	120	6	
	36		9	

Tab. 7: Überblick über die Transformationsversuchen mit den Plasmide pGFPBAR und pSG506.

Medium	Transformations- variante	Kallusinductions- anfang (Vorkultur) (in Stunde)	Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter (cm)	Beschussdruck (psi) / Durchmesser-Goldpartikel (µm)
M 3	1	96	6	1350 / 1,0
	2		9	
	3		12	
M 9	4	96	6	1350 / 1,0
	5		9	
	6		12	

Tab. 8: Überblick über die Transformationsversuchen mit den Plasmide pGFPBAR, pS40-IPT und pSG516.

Medium	Transformations- variante	Kallusinductions- anfang (Vorkultur) (in Stunde)	Durchmesser- Goldpartikel µm	Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter (cm)	Beschussdruck (psi)
M 3	1	96	1,0	6	900
	2			9	
	3			12	
	4			6	
	5			9	
	6			12	

## MATERIAL UND METHODEN

	7			6	
	8		0,6	9	
M 9	9	96		12	
	10			6	900
	11		1,0	9	
	12			12	
	13			6	
	14		0,6	9	
M 3	15	96		12	
	16			6	1350
	17		1,0	9	
	18			12	
	19			6	
	20		0,6	9	
M 9	21	96		12	
	22			6	1350
	23		1,0	9	
	24			12	

### 2.2.1.4.6 Dokumentation der Fluoreszenzanalyse hinsichtlich der *gfp*-Expression

Die transiente und stabile Expression des *gfp*-Gens wurde mit einem GFP-Scope (Leica MZFLIII), dessen Anregungsfilter BP 490-550 nm (Leica), visualisiert und mit einer CCD-Kamera (Zeiss Axio Cam) und dem gleichnamigen Computerprogramm dokumentiert.

### 2.2.1.4.7 Gewebekulturstrategie (von der Selektion des Kallus bis zur *Ex vitro*-Kultur)

Entsprechend früheren Arbeiten (Scheyhing, 1999; Fettig, 1999, Huber 2002), sollten unreife Embryonen oder Kalli nach Partikelbeschuss sowohl auf dem Induktionsmedium als auch auf dem Regenerationsmedium mit verschiedenen Konzentrationen an Phosphinothricin (PPT) selektiert werden.

Der Einsatz des *gfp*-Gens als Reporter-/selektierbares Markierungsgen ermöglicht es, das transformierte Gewebe während der ganzen Pflanzenentwicklung mikroskopisch zu verfolgen. So konnte man diejenigen Kalli, die schon stabile *gfp*-Expressionen zeigten, ungefähr zwei Wochen nach Beschuss identifizieren.

In den Tabellen 5, 6 und 7 beschriebenen Ansätzen wurden die Kalli jedoch auf ein Induktionsmedium ohne Phosphinothricin gezogen, so dass es während dieser Phase-K (Abb. 1) keinen Selektionsdruck für die Kalli gab. Zwischen acht und zehn Tag nach dem Beschluss wurden die Scutellarkalli mit stabiler *gfp*-Expression bewertet und gekennzeichnet. Nach drei Wochen zeigten manche Kalli auf diesem Medium schon kleine Sprosse; sie wurden je nach *gfp*-Expression in drei Gruppen unterteilt. Gruppe A enthielt Kalli und Sprosse mit stabiler *gfp*-Expression, in Gruppe B kamen Kalli und Sprosse, die *gfp*-Expressionen hatten, aber diese am Ende der Phase-K verloren hatten und in Gruppe C befanden sich Kalli und Sprosse ohne jegliche *gfp*-Expression (Abbildung 1).

Die Kalli der Gruppen A und B entwickelten sich in Petrischalen drei Wochen lang auf Regenerationsmedium (R1 oder WH) ohne PPT (Phase R). Danach wurden Sprosse der Gruppe A einzeln in Schnappdeckelgläser mit dem gleichen Medium (Phase-S) überführt und für weitere drei Wochen kultiviert. Diejenigen Sprosse, die keine *gfp*-Expressionen mehr zeigten und alle entwickelten Sprosse der Gruppe B, wurden in Schnappdeckelgläser mit dem gleichen Medium aber jetzt mit PPT kultiviert (Phase-T).

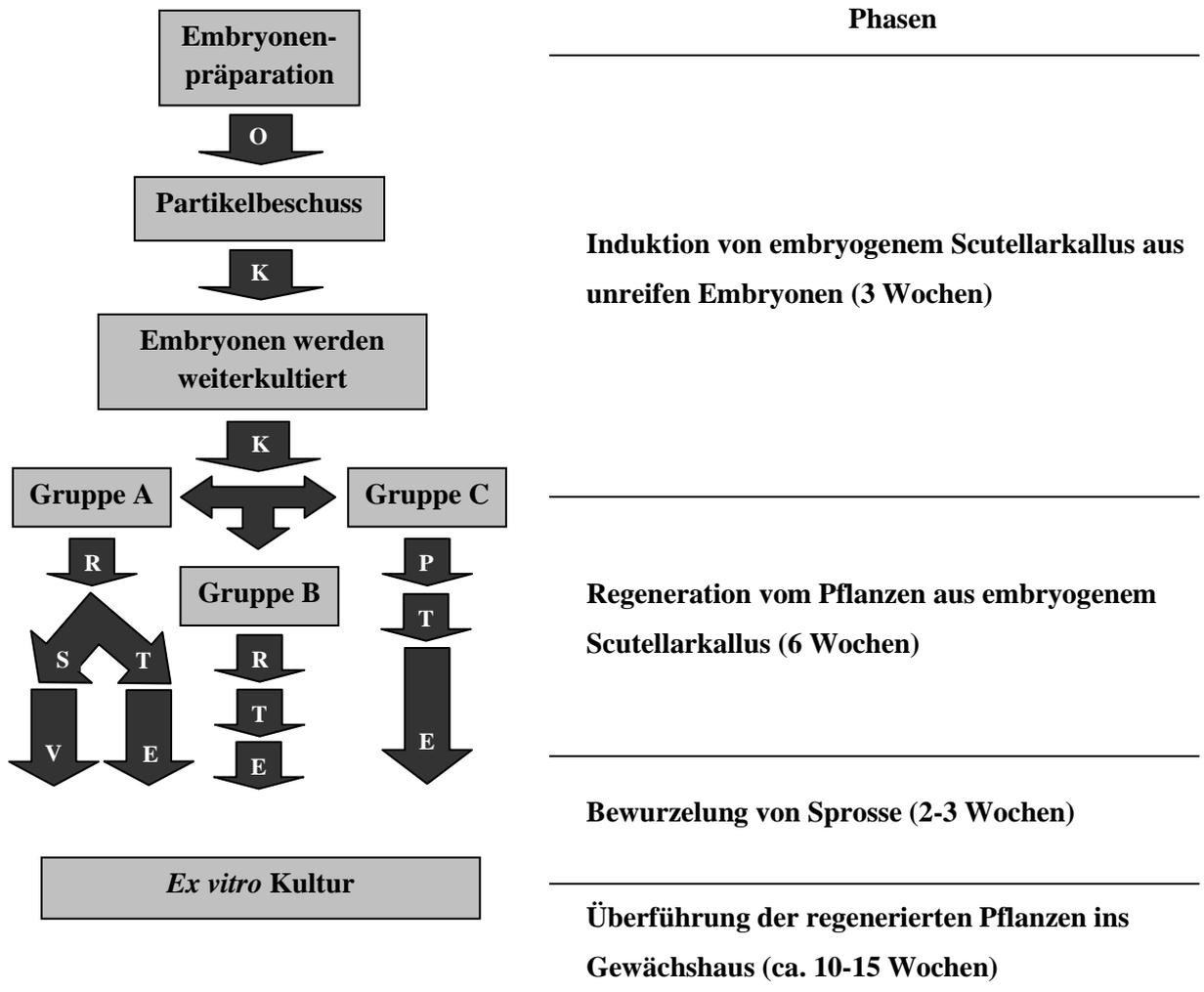
In der nächsten Phase wurden die Sprosse nach sechs Wochen auf R1 oder WH-Medium, entweder direkt in Erde gepflanzt, wenn sie schon ein gutes Wurzelsystem entwickelt hatten, oder zur Bewurzelung in ein Glasgefäß mit 190-2-Medium ohne PPT für GFP-positiven Sprosse (Phase-V) gegeben. Die GFP-negativen Sprosse wurden in ein Glasgefäß mit 190-2-Medium mit PPT (Phase-E) überführt. Anschließend wurden die Pflanzen, die ein gut ausgebildetes Wurzelsystem hatten, nach zwei bis drei Wochen in Erde gesetzt.

Die Kalli und Sprosse der Gruppe C wurden in Petrischalen drei Wochen lang auf dem Regenerationsmedium (R1 oder WH) nicht vereinzelt mit PPT weitergezogen (Phase-P). Dann wurden die Sprosse drei Wochen lang in Schnappdeckelgläser mit dem gleichen Medium (Phase-T) gesetzt. Nach der Überführung der überlebenden in Glasgefäße wurden die Sprosse für ein bis zwei Wochen auf PPT-haltigem 190-2-Bewurzelungsmedium kultiviert (Phase-E).

#### 2.2.1.4.8 **Ex vitro**-Kultur der Regeneratpflanzen

Regeneratpflanzen mit gut entwickeltem Wurzelsystem wurden in Plastiktöpfe mit gedämpfter Einheitserde gesetzt und unter lichtdurchlässigen Plastiktüten als Verdunstungsschutz für weitere drei Tage, wie oben erwähnt, kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen ins Gewächshaus überführt und dort weitere 3 Tage unter den Plastikhüllen belassen. Anschließend erfolgte die Kultur wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

Die Pflanzen der Gruppen B und C, die die Behandlung mit PPT überlebt hatten, wurden in Erde (*ex vitro*-Kultur) überführt und nach 2 und 3 Wochen nochmals mit einer BASTA-Lösung (3 mM PPT) 3 Mal mit einem Intervall von 6-7 Tage besprüht.



**Abb. 1: Gewebekulturstrategie.** O: Osmotische Behandlung mit 0,5 M Mannit: 4 h vor bzw. 16 h nach dem Beschuss, nach 0, 20, 72, 96 und 120 Stunden des Anfangs der Scutellarkallusinduktion (Vorkultur). Phase-K: 3 Wochen Kalluskultur ohne PPT. Phase-R: 3 Wochen Regeneration ohne PPT in Petri Schalen. Phase-S: Regeneration ohne PPT 3 Wochen in Schnappdeckelgläsern. Phase-P: 3 Wochen Regeneration mit PPT in Petri Schalen. Phase-T: Regeneration mit PPT, 3 Wochen in Schnappdeckelgläsern. Phase-V: 0-1-2 Wochen Bewurzelung ohne PPT. Phase-E: 0-1-2 Wochen Bewurzelung mit PPT. Der Zeitraum der *in vitro* Kultur beträgt zwischen Embryonenpräparation und *ex-vitro* Kultur je nachdem 63, 77 oder 84 Tage.

## 2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*:

#### 2.2.2.1.1 *Maxipräparation nach Sambrook et al., 1989*

Zehn Mikroliter einer Bakterienkultur in Glycerin oder einer Vorkultur des benötigten Bakterienstammes wurden in 50 ml LB-Medium mit Antibiotikum ( $100 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ ) gegeben und über Nacht bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  geschüttelt.

Aus 40 ml der über Nacht gewachsenen Kultur wurden die Bakterien abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor A-4-44, Eppendorf) und der Niederschlag in 1 ml Lösung I resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1,3 ml Lösung II und einer Inkubation von 5 min auf Eis. Durch Neutralisation mit 1,15 ml eiskalter Lösung III wurde die Lyse abgestoppt; danach wurde weitere 10 min auf Eis inkubiert, um Proteine und chromosomale DNA zu präzipitieren, während die Plasmid-DNA in der Lösung blieb. Durch Zugabe von 1,35 ml Lösung IV und einer erneuten 10-min Inkubation auf Eis wurde dieser Vorgang verstärkt. Die Abtrennung des Niederschlags erfolgte durch Zentrifugation (15000 rpm, 20 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor A-4-44, Eppendorf).

Der Überstand wurde in frische, sterile Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest, sowie 20 ml vergälltem, 96 % [v/v] Ethanol (RT) vermischt und zentrifugiert (10000 rpm, 30 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor A-4-44, Eppendorf). Die ausgefällte und sedimentierte Plasmid-DNA wurde im Vakuum bei RT getrocknet und in 600  $\mu\text{l}$  Lösung V aufgenommen, mit 12  $\mu\text{l}$  RNase-Lösung versetzt und 20 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt und zur Entfernung von Proteinresten einer Phenolextraktion unterworfen. Hierzu wurde die Lösung mit 400  $\mu\text{l}$  Phenol versetzt und gemischt, anschließend die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die obere, wässrige Phase mit der DNA wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, mit 400  $\mu\text{l}$  einer 1:1 [v/v] Mischung Phenol/Chloroform versetzt und wie oben beschrieben weiter behandelt. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 400  $\mu\text{l}$  Chloroform wie oben beschrieben behandelt. Wieder wurde die wässrige Phase in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 1 ml (dies entsprach dem 2,5fachen Volumen) absolutem Ethanol (RT) bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  für mindestens 20 min gefällt. Es folgte eine Zentrifugation (14000 rpm, 15 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11, Eppendorf,) und das Aufnehmen des Niederschlags in 20  $\mu\text{l}$  Lösung V.

Die Plasmid-DNA wurde durch erneute Zugabe des 2,5-fachen Volumens an eiskaltem Ethanol gefällt, was durch die Zugabe von bis zu 200  $\mu\text{l}$  Lösung VI und anschließende Anpassung der

Ethanolmenge erleichtert werden konnte. Nach Waschen des Niederschlags mit 70 % [v/v]Ethanol (RT), wurde kurz (2 min) abzentrifugiert; nach Trocknung des Präzipitats im Vakuum wurde die DNA in 150 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Lösungen:

Lösung I: 25 mM Tris/HCl; 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 50 mM Glucose; pH 8.0; autoklaviert

Lösung II: 0,2 N NaOH; 1 % SDS (w/v); vor Gebrauch aus Stammlösungen frisch anzusetzen

Lösung III: 5 M Kaliumacetat; pH 4.8; autoklaviert

Lösung IV: 10 M Ammoniumacetat; autoklaviert

Lösung V: 10 mM Tris/HCl; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8.0; autoklaviert

Lösung VI: 0,3 M Natriumacetat; autoklaviert

RNase-Lösung: 10 mg x ml<sup>-1</sup> DNase-freie, pankreatische RNase wurden in 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 15 mM NaCl gelöst; die Lösung wurde für 15 min auf 100 °C erhitzt, dann langsam abgekühlt; die RNase-Lösung wurde in 1ml Aliquots portioniert und bei -20 °C gelagert.

Phenol: Geschmolzenes Phenol, 0,1 % (w/v) Hydroxychinolin und 0,2 % [v/v] Mercaptoethanol wurden mit dem gleichen Volumen an Trispuffer (1 M Tris/HCl; 0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8.0) gemischt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (GS-3 Rotor, 5000 rpm, 10 min) beschleunigt. Die Phenolphase wurde zweimal mit 1/10 Trispuffer ausgeschüttelt und dann in Schnappdeckelgläser überführt, mit Phenolpuffer überschichtet und bei -20 °C aufbewahrt.

Chloroform: Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis 24 : 1 [v/v]

Phenol/Chloroform: Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol = 25 : 24 : 1 [v/v]

#### 2.2.2.1.2 Minipräparation nach Sambrook und Russel, (modifiziert)

Die Minipräparation wurde nach Sambrook und Russell zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* durchgeführt (Sambrook und Russell, in: *Molecular Cloning*, 2001, S. 1.32 - 1.34, verändert).

Von einer über Nacht gewachsenen 3-ml-Kultur wurden 1,5 ml in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und 2 min zentrifugiert (10000 rpm, 4 °C, Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11, Eppendorf). Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Niederschlag in 100 µl Aufschlusslösung resuspendiert und ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, um die Proteine der lysierten Bakterien aus der wässrigen Phase zu entfernen. Nach ca. halbminütigem intensiven Mischen wurde die Emulsion zentrifugiert (10000 rpm, 4 °C, 1 min, Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11, Eppendorf) und die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Dieser wurde das 2,5-fache Volumen an eiskaltem Ethanol (96 % [v/v])) zugegeben und die DNA 20 min bei -20 °C gefällt. Durch anschließende

Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C, Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11, Eppendorf) bildete die ausgefällte DNA dann einen Niederschlag, der nach Verwerfen des Überstandes in 1 ml Ethanol (70 % [v/v]) gewaschen, dann 15-20 min an der Luft getrocknet und in 15 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen wurde.

Da in dem Isolat noch die bakterielle RNA enthalten war, wurde nachfolgenden Restriktionsansätzen immer RNase zugesetzt.

### Lösung

Aufschlußlösung      50 mM Tris/HCl, pH 8.0; 2,5 mM LiCl; 62,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 4 % (w/v) Triton X-100

#### 2.2.2.2 Extraktion genomischer DNA aus *Triticum aestivum* L.

Zur Isolierung genomischer DNA wurden 100 bis 200 mg Weizenfahnenblätter in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammen mit drei Edelstahlkugeln (Durchmesser ca. 1 mm) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung des Pflanzengewebes in einer Kugelmühle bei Maximalgeschwindigkeit (3 min). Die Einsätze der Kugelmühle wurden dabei in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Nach Zugabe von 1330 µl vorgewärmten (65 °C) Extraktionspuffer pro Reaktionsgefäß wurden diese kräftig durchgemischt und 10-15 min bei 65 °C, vorzugsweise bei Intervallschütteln, inkubiert. Nach kurzem Abkühlen (1 min) bei Raumtemperatur wurden 650 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1[v/v]) zugegeben und diese 5 min lang durchmischt. Nach Zentrifugation (2 min, RT, 14000 rpm) wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine RNase-Behandlung mit 10 µl RNase (10 µg/µl in TE-Puffer) für 10-20 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 700µl Isopropanol 2 min bei RT. Nach Zentrifugation (5-10 min, RT, 14000 rpm) wurde der Überstand entfernt, 1 ml Waschpuffer zugegeben und nach 5 min gut gemischt. Bei Raumtemperatur wurde 2 min lang bei 14000 rpm nochmals abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands erfolgte ein letzter Waschschritt durch Zugabe von 2 ml Ethanol (70 % [v/v]) und eine nochmalige Zentrifugation (2 min, RT, 14000 rpm). Der gewonnene Niederschlag wurde nach Trocknung bei Raumtemperatur in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen.

### Lösungen

Extraktionspuffer: Für    10 ml-1M Tris-HCl, pH 7,5; 13,8 ml-5 M NaCl; 10 ml-0,5 M EDTA, pH 8.0; 66,2 ml

100 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Waschpuffer	76% [v/v] Ethanol; 10 mM Ammoniumacetat.

### 2.2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Weizen (nach Chomczynski *et al.*, 1993 verändert)

Kleingeschnittenes, frisches oder bei -80 °C eingefrorenes Blattmaterial vom Fahnenblatt wurde (ca. 100-200 mg) in 2 ml Eppendorfgefäße (runter Boden) gegeben. Anschließend wurden drei Edelmetallkugeln pro Probe (fünf Proben pro (2x) Halter) zugegeben und in einen Kugelmühlenhalter gesteckt und beide in flüssigem Stickstoff gefroren. Danach wurde der Halter in die Kugelmühle eingespannt und fest zugezogen. Die Kugelmühle mit den Proben wurde bei Maximalgeschwindigkeit für 3 min in Betrieb genommen. Anschließend wurde nach Zugabe von 10facher Menge Extraktionspuffer 1 min durchgemischt, 5 min bei RT inkubiert und wieder 1 min durchgemischt. Zu den lysierten Zellen wurde 0,2 ml Chloroform/1 ml Extraktionspuffer zugegeben. Das Eppendorfgefäß wurde für 20 s. per Hand heftig geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Nach einer 15 min Zentrifugation (12000 rpm, 4 °C, Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11, Eppendorf) erhielt man drei Phasen: die obere farblose Phase, in der sich die Gesamt-RNA befindet, eine mittlere Interphase, die Proteine enthält und eine untere Phenol/Chloroform-Phase. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol gefällt und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer 10 min Zentrifugation (12000 rpm, 4 °C, Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11, Eppendorf) wurde die RNA mit 75 % Ethanol/DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurde diese 5 min (13000 rpm, RT, 5804 R, Rotor F 45-30-11, Eppendorf) erneut zentrifugiert, getrocknet und in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

#### Lösung

Extraktionspuffer:	9,5 g Guanidinthiocyanat; 3,1 g Ammoniumthiocyanat; 3,34 ml-3M Natriumacetat, pH
Für 100 ml	5,0; 5 ml-Glycerin (100%); 38 ml Phenol pH 5-6; ergänzen mit DEPC-H <sub>2</sub> O

### 2.2.2.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

#### 2.2.2.4.1 Photometrische Bestimmung

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA- oder RNA wurden wässrige DNA- bzw. RNA-Lösungen hergestellt, die dann spektralphotometrisch (Spektralphotometer DU-650, Beckman) quantifiziert wurden.

#### 2.2.2.4.2 Bestimmung durch Vergleich mit DNA-Mengen-Standard

Die Konzentration kleiner Mengen an DNA (z.B. geschnittene PCR-Produkte für eine Klonierung) wurde durch eine Abschätzung der DNA-Konzentration über die Fluoreszenz von gebundenem Ethidiumbromid bestimmt, indem die Fluoreszenzintensität der Fragmentbande auf einem Agarosegel mit den entsprechenden Banden des Größenstandards (GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)) verglichen wurde. Jede Bande enthält eine definierte Menge an DNA.

### 2.2.3 DNA-Modifizierende Reaktionen

#### 2.2.3.1 Restriktionsspaltung

Sowohl zur Spaltung von Plasmid-DNA (1 Unit pro  $\mu\text{g}$  DNA) als auch zur Spaltung von genomischer Pflanzen-DNA (0,32 Units pro  $\mu\text{g}$  DNA) wurden normalkonzentrierte (10 Units  $\mu\text{l}^{-1}$ ) Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas und gelegentlich New England Biolabs eingesetzt. Die Reaktion wurde in dem jeweils mitgelieferten und firmenseitig empfohlenen Puffersystem für 2-16 h bei 37 °C für Plasmid-DNA und 14-18 h bei 37 °C für genomischer Pflanzen-DNA durchgeführt. Zur Spaltung genomischer Pflanzen-DNA wurden zusätzlich ca. 2 Units RNase T<sub>1</sub> pro  $\mu\text{g}$  DNA verwendet.

#### 2.2.3.2 Sticky end-Ligation

Zur Ligation wurde mit einem Vektor: Insert-Verhältnis zwischen 1:1 und 1:3 im Reaktionsansatz gearbeitet. Die eingesetzte DNA-Menge lag im Bereich 50 bis 300 ng. Um die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen kohäsiver Enden zu lösen, wurde die DNA 5 min bei 42 °C inkubiert. Es wurden 2  $\mu\text{l}$  Ligasepuffer und 2  $\mu\text{l}$  50% PEG Lösung zugegeben, der Ansatz mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase versetzt. Die Reaktion erfolgte bei 16 °C über Nacht. Anschließend wurde die Reaktion durch 10 min Inkubation bei 65 °C im Wasserbad abgestoppt.

Lösungen:

T4-DNA-Ligase	1 u x $\mu\text{l}^{-1}$ ; -20 °C (Fermentas)
Ligasepuffer (10fach konzentriert)	(Fermentas)
50% PEG	50% (w/v) polyethylene glycol 4000

## 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten

### 2.2.4.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Nukleinsäuren entsprechend ihres Molekulargewichts wurden Agarosegele (0,8 % [w/v]; 1,0 % [w/v]) verwendet, denen zur Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht 0,2 µg x ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg x ml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>) zugesetzt worden waren. Die Nukleinsäurelösungen wurden im Verhältnis 1:10 mit Probenpuffer vermischt, um sie so auf das Gel aufzutragen zu können. Zur Identifizierung spezifischer Fragmente wurde der GeneRuler 1 kb DNA-Längenstandard der Firma Fermentas verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 13V/cm (50 bis 100 mA) durchgeführt. Sollten DNA-Fragmente >500 bp analysiert werden, wurden Gele mit höheren Agarosekonzentrationen verwendet (bis zu 2,0 % (w/v) Zum Einsatz kam in diesem Falle außerdem ein 100 bp-Längenstandard (Fermentas).

Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte nach beendeter Trennung der Fragmente photographisch unter UV-Licht ( $\lambda=306$  nm Image Master<sup>®</sup> VDS, Pharmacia Biotech)

Lösungen:

Agaroselösung	0,8 %, 0,1 % oder 2,0 % Seakem <sup>®</sup> LE Agarose (Biowhittaker Molecular Applications) in TAE-Puffer; 0,2 µg µl <sup>-1</sup> Ethidiumbromid
50 x TAE-Puffer	242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA
Probenpuffer	50% [v/v] Glycerin; 49,5% [v/v] TAE-Puffer; 0,5% [w/v] Bromphenolblau

### 2.2.4.2 Elution von DNA-Fragmenten aus den Agarosegelen

Um DNA-Fragmente zu gewinnen, wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel isoliert. Dazu wurde die DNA nach der Elektrophorese nach Ethidiumbromidfärbung auf einem Leuchtschirm visualisiert und die gewünschten DNA-Banden mit möglichst scharf ausgeschnitten. Zur Gewinnung der DNA aus dem Agarosegel wurde eine Variation der „Freeze and Squeeze“ Methode verwendet. Dazu wurde die ausgeschnittene Bande (in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß) mit einem Glaspistill (vorher mit Ethanol abgeflammt) zerstoßen und mit gleichem Volumen Phenol überschichtet. Im Anschluss wurde das Gemisch in flüssigem Stickstoff kurz durchgefroren. Nach gründlichem Mischen wurde für 15 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor F 45-30-11, Eppendorf) und der die DNA enthaltende Überstand abgenommen. Die schwerere Agarose verblieb dabei in der unteren Phenolphase. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und mit Isopropanol ausgefällt. Nach dem

Waschen des Niederschlags mit 70 % [v/v] Ethanol wurde der Niederschlag getrocknet und in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.5 Transformation von *ESCHERICHIA COLI*

#### 2.2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen (nach Inoue *et al.*, 1990)

25 ml LB-Medium (DUCHEFA) wurde in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie des betreffenden *E. coli* DH5α-Stammes angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 für 6 bis 8 Stunden bei 37 °C und 200 UpM geschüttelt. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C, Kühlzentrifuge 5804 R, Rotor A-4-44, Eppendorf). Das Zellpellet wurde in 80 ml TB-Puffer (auf Eis gekühlt) aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden vorsichtig in 20 ml TB-Puffer (0 °C) resuspendiert und langsam unter leichtem Schwenken mit 1,5 ml DMSO versetzt. Nach einer 10-min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte bei -70 °C.

Lösungen und Geräte:

LB-Medium Broth 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) Tryton; 171,1 mM NaCl; pH 7,5 autoklaviert

TB-Puffer: Für 1lt 10,8 g MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O; 2,20 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 18,65g KCl; 20 ml Pipes (0,5M, pH 6); zu. 1lt H<sub>2</sub>O sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert

Spektrophotometer Beckman, DU-650

#### 2.2.5.2 Transformation kompetenter Zellen

Zur Transformation wurden pro Ansatz 200 µl tiefgefrorener kompetenter Zellen (siehe 2.2.5.1) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes (siehe 2.2.3.2) erfolgte für 30 min eine Inkubation bei 0 °C. Die Aufnahme der DNA in die Bakterienzellen wurde durch eine Hitzeschockbehandlung für 90 Sekunden bei 42°C erreicht. Anschließend wurde für etwa 1-2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurden die Zellen bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und 80-100 UpM geschüttelt. 100 µl eines jeden Ansatzes wurden nachfolgend auf selektive Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.5.3 Analyse der Transformanten mit der *Blue Gel*-Methode

Zur Kontrolle der Transformation wurde die Blaugelmethode verwendet.

Eine Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und in 20 µl TE-RNase suspendiert; von der Suspension wurde ein Kontrollausstrich auf eine LB-Platte mit 50 µg/ml Ampicillin gemacht, 10 µl *blue gel juice* wurden zugegeben, der Ansatz wurde kurz geschüttelt und 30 min bei 65 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Bei einer Größe des Inserts ab etwa 1 kb ließen sich Kolonien, die Vektoren ohne das gewünschte Insert trugen, leicht von Kolonien mit rekombinanten Plasmiden unterscheiden. Von diesen wurden Minipräparationen und anschließend Kontrollrestriktionen angefertigt.

Lösungen:

TE-RNase                    10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

*Blue gel juice*            5% (w/v) SDS; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 25% [v/v] Glycerin; in TE lösen.

### 2.2.6        **Nachweis der Fremdgene**

#### 2.2.6.1     *Southern blot*-Analyse (Southern, 1975)

Nach Restriktionsspaltung und gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente wurde im Agarosegel ohne Depurinierung der DNA entweder ein neutraler oder alkalischer Transfer auf eine Nylonmembran durchgeführt.

##### 2.2.6.1.1   *Neutraler Transfer*

Zur Denaturierung wurde die DNA für 45 min in Denaturierungslösung sanft geschüttelt. Nach dem kurzen Waschen des Agarosegels in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> wurde dieses zur Neutralisierung für 30 min in 10 Volumina Neutralisierungspuffer I eingeweicht, nach Erneuerung des Puffers wurde 15 min weiter geschüttelt. Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Nylonmembran (BiodyneB/Plus<sup>TM</sup> und Amersham Hybond<sup>TM</sup>-N) erfolgte durch Kapillarkräfte (20 x SSC-Puffer) unter nicht denaturierenden Bedingungen über Nacht bei RT. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Neutralisierung und Entfernung von Salzen für 5 min in 2x SSC-Puffer gespült. Entweder durch eine UV-Bestrahlung bei 302 nm mit einer Energiemenge von 120 mJ oder 2 Stunden Backen bei 80 °C wurde die DNA an die Membran gebunden. Die Membran wurde bis zu ihrer Verwendung in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

Lösungen:

Denaturierungslösung    1,5 M HCl; 0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer I   1 M Tris (pH 7,4); 1,5 M NaCl

Transferpuffer            20 x SSC(3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat, pH 7,0)

### 2.2.6.1.2 *Alkalischer Transfer*

Das Prinzip des alkalischen Transfers war ähnlich zu dem des neutralen Transfers wie in 2.2.6.1 beschrieben.

Es gab folgende Unterschiede: Die Denaturierung der DNA fand für 15 min in dem alkalischen Transferpuffer statt. Danach wurde 20 min lang in frischem alkalischem Transferpuffer weiter geschüttelt. Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Nylonmembran erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Die Membran wurde zur Neutralisierung und zur Entfernung von Salzen für 15 min in Neutralisierungspuffer II gespült.

Lösungen:

Alkalischer Transferpuffer	0,4 N NaOH; 1 M NaCl
Neutralisierungspuffer II	0,5 M Tris-HCl (pH 7,2); 1 M NaCl

### 2.2.6.2 *Nichtradioaktive Markierung der Sonden-DNA*

#### 2.2.6.2.1 *PCR Markierung von DNA-Sonden*

Die PCR-Markierung wurde als eine Methode zur Herstellung von Biotin-markierten Sonden verwendet. Bei der PCR von pS40-IPT oder pSG516 wurde 40 % des dTTP durch Biotin-11-dUTP ersetzt.

#### 2.2.6.2.2 *DNA-Markierung nach Feinberg und Vogelstein, 1984 (modifiziert)*

Die Markierung von Sonden-DNA erfolgte in Form einer Markierung mit Biotin-11-dUTP unter Verwendung des Biotin DecaLabel™ DNA Labeling Kit der Firma Fermentas. Die DNA war das PCR-Produkt des pS40-IPT Plasmides, das aus dem Agarosegel eluiert (2.2.4.2) worden war. Das Gesamtvolumen eines jeden Markierungsansatzes betrug 50 µl. Die Zusammensetzung und Inkubationsdauer eines Markierungsansatzes entsprachen den Herstellerempfehlungen. Nach erfolgter Markierung wurde die Sonden-DNA direkt für die Hybridisierung verwendet oder bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die Markierungseffizienz (nach Roche Applied Science) bestimmt.

#### 2.2.6.3 *Hybridisierung und Nachweis der Hybridisierung*

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran 45 min in Prähybridisierungslösung (Drehofen) bei 40 °C geschwenkt. Anschließend wurde die denaturierte Biotin-markierte-

Sonden-DNA zugegeben. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte dann für 18 bis 20 h, ebenfalls bei 50 °C.

Zur Entfernung nicht spezifisch gebundener oder freier Sonden-DNA wurde die Nylonmembran nach der Hybridisierung für 10 min bei RT in Waschlösung I geschwenkt. Danach wurde die Membran in vorgewärmter Waschlösung II in einer Hybridisierungsröhre bei 60 °C im Drehofen gewaschen.

Lösungen:

Prähybridisierungslösung: DIG Easy Hyb der Firma Roche

Waschlösung I: 2x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

Waschlösung II: 0,5x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

Der Biotin-spezifische enzymgekoppelte Antikörper war ein Streptavidin-AP Conjugat von der Firma Novagen. Nach einer immunologischen Detektion nach der Methode von „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (chemilumineszenz Detektion mit CSPD)“ erfolgte der Nachweis der Hybridisierung mit Hilfe von auf die Membran aufgelegten Röntgenfilmen (Kodak X-OMAT AR). Die Exposition dauerte je nach Stärke der Chemilumineszenz zwischen 20 min und fünf Tagen.

### 2.2.7 Nachweis der Fremdgenexpression

#### 2.2.7.1 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von *ipt*-Transkript

Zuerst wurde aus der mRNA, die sich in 1 µg Gesamt-RNA (2.2.2.3) befand, cDNA nach der *Revert H Minus Reverse Transcriptase* (Fermentas) Methode hergestellt. Die entstandene cDNA wurde als Template für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Primer-*ipt* (2.1.3.1) verwendet.

#### 2.2.7.2 Nachweis der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität (GUS-Test)

##### 2.2.7.2.1 Histochemischer Nachweis

Der histochemische Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität erfolgte ab 16 h nach dem Beschuss von der Hälfte der Organe (Blätter, Stängel, Wurzeln, Blüten und Körner) jeweils in verschiedenen Entwicklungsstadien und nach der Seneszenzinduktion der anderen Hälfte (2.2.8.1). Die Lösung wurde durch ein kurzes Anlegen von Vakuum in die Blätter infiltriert;

dann wurde zwei Tage lang in der Färbelösung bei 37 °C inkubiert und anschließend unter dem Stereomikroskop (Stemi SV 11, Zeiss) ausgewertet. Das Material wurde vor der Auswertung zur Entfernung von Chlorophyll für ein bis zwei Tage bei 37 °C mit 70 % [v/v] EtOH behandelt.

Lösung

Färbelösung: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronid Cyclohexylammoniumsalz (Biosynth, Staad/Schweiz); 0,5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]; 0,5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]; pH 7.0

### 2.2.7.2.2 Fluorometrischer Nachweis

Kleingeschnittenes Blattmaterial von Weizen- (50-100 mg) oder Tabakpflanzen (100-200 mg) wurde in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff übergossen, mit einem Pistill pulverisiert und in ein Eppendorfgefäß mit 80 µl Extraktionspuffer überführt. Nachdem durch eine Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 10000 min<sup>-1</sup>, 10 min) die Blattreste sedimentiert worden waren, wurde der Überstand (= Protein-Rohextrakt) in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Protein-Konzentration unter Verwendung des BioRad Protein Assay Farbstoff-Konzentrats nach Bradford (1976) bestimmt.

Ein Aliquot des Protein-Rohextrakts, in dem 50 µg Gesamtproteine gelöst vorlagen, wurde mit Reaktionspuffer auf Eis auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Die Enzymreaktion wurde durch eine Inkubation bei 37 °C im Wasserbad gestartet. Die Probenahme erfolgte nach jeweils 0, 15, 30 und 60 min, indem 100 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und in ein mit 900 µl Stoppuffern vorbereitetes Eppendorfgefäß gegeben wurden. Anschließend wurde die Konzentration des freigesetzten 4-Methylumbelliferons (MU) im Mini-Fluorometer TKO 100 (Hofer) bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm bestimmt. Die Einstellung des mechanischen Nullpunkts erfolgte mit Stoppuffer, die Kalibrierung auf den Skalenwert 500 mit einer 100 nM Lösung von MU in Stoppuffer. Die Enzymaktivität wurde in pmol freigesetztes MU pro mg Protein und Minute angegeben.

Lösungen

Extraktionspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,0; 10 mM Dithiothreitol (DTT);  
1 mM EDTA; 0,1 % [w/v] Laurylsarcosin; 0,1 % [w/v] Triton X-100

Reaktionspuffer: 1 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (vorgelöst in Dimethylformamid) in Extraktionspuffer

Stoppuffer: 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

2.2.8 **Seneszenz-Induktion**

2.2.8.1 In transienten und transgenen pS40-Gus Pflanzen

Vor dem Nachweis der transienten Expression des *uidA*-Gens wurde jeweils die Hälfte der verschiedenen Weizen-Organen nach dem Beschuss für vier Tage bei RT in Dunkelheit in einer Lösung von 0,1 mM Methyljasmonat inkubiert, um die Seneszenz zu induzieren.

Die transgene Weizenfahnenblätter sowie der Wildtyp wurden zur Induktion der Seneszenz verschiedenen Behandlungen unterworfen (Tab. 9).

**Tab. 9: Überblick über die Behandlungen, welchen die jungen Blätter unterworfen wurden.**

Behandlung	Bezeichnung
4 Tage dunkel Inkubation	Dunkelheit
4 Tage dunkel Inkubation + 4 Tage dunkel Inkubation mit 1 mM Abscisinsäure (ABA)	ABA + Dunkelheit
Nach Ernten mit ABA + Licht/Dunkel (16/8 h)	ABA + Licht/Dunkel (16/8 h)
4 Tage dunkel Inkubation, nachdem sie durch ein Spritze verletzt wurden	Verwundung

2.2.8.2 In transgenen pS40-IPT und pSG516 Pflanzen

Die frisch voll entwickelten abgeschnittenen Fahnenblätter sowohl von transgenen als auch von Wildtyp-Weizenpflanzen wurden jeweils sofort in ein Schnappdeckelglas mit 1,5 ml Wasser gegeben.

Parallel dazu um den Einfluss des Benzylaminopurin (BAP), ein synthetisches Cytokinin, zu beobachten, wurden voll entwickelte abgeschnittene Fahnenblätter von Wildtyp-Weizenpflanzen jeweils in ein Schnappdeckelglas mit 1,5 ml (22,2 µM) BAP-Lösung gegeben.

Das Glas wurde mit Parafilm mit 3-5 Löchern bedeckt und in einer Klimakammer sieben bis zehn Tage bei 22 °C, 50 % relativer Luftfeuchtigkeit und 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit aufbewahrt.

2.2.9 **Chlorophyllbestimmung nach Porra *et al.*, 1989**

Die Chlorophyllextraktion wurde von den voll entwickelten abgeschnittenen Fahnenblättern am Anfang sowie nach sieben bis zehn Tagen am Ende des Experiments durchgeführt. Dazu wurden Blattscheiben mit 0,196 cm<sup>2</sup> Fläche mittels eines Korkbohrers gestanzt, und anschließend mit 995 µl N,N-Dimethylformamid (DMF, Fluka) bei 4 °C über Nacht extrahiert. Die Absorption (A) des Überstandes wurde bei den Wellenlängen 646,8 nm, 663,8 nm und 750 nm photometrisch

bestimmt (Lamda 2, Perkin Elmer, UV/Vis Spectrometer, Überlingen). Die Berechnung der Konzentrationen der Chlorophylle *a* und *b* in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  erfolgte nach Porra *et al.* (1989).

### 2.2.10 Cytokinin-Analyse

Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Hormongehalt der Proben entspricht der Menge der direkt an die verwendeten Antikörper (AK) bindenden Cytokinine. Es wurden dabei die biologisch aktiven Cytokinine (Werner *et al.* 2001) – also die freien Basen und die Ribosidfraktion – detektiert. Aufgrund der z.B. bei Peters *et al.* (2000) oder Schaz (2003) beschriebenen Kreuzreaktivität der eingesetzten AK können auch Konjugate, allerdings viel schwächer gebunden und detektiert werden.

Die Analysengang zur Bestimmung des Cytokinin bestand aus drei Phasen, die Extraktion, die Aufreinigung und die Cytokinin-Bestimmung (Kompetitiven ELISA) (Abb. 2) und wurde nach der beschriebenen Methode von Heppner (2009) durchgeführt. Das Anfangsmaterial war 1 - 3,5 g frischen Weizenblättern der transgenen und Wildtyp-Pflanzen, die sich in den Wachstumsstadien 73 bis 83 nach der Zadoks Skala (Tab. 4) befanden.

### 2.2.11 Graphiken und Statistische Analyse

Die Graphiken wurden mit dem Programm SigmaPlot 10 und die Vektorkarten wurden mit dem Programm SimVector 3.0 angefertigt.

Alle statistischen Tests wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 13 durchgeführt. Der Kruskal Wallis (KW)-Test wurde für nicht parametrische Daten sowie ONE WAY ANOVA für parametrische Daten eingesetzt, um mehr als zwei Stichproben miteinander zu vergleichen. Die *post-hoc* Tests wurden verwendet, um herauszufinden, ob sich zwei Stichproben voneinander signifikant unterscheiden. Die *post-hoc* Tests wurden bei parametrischen Daten vom Statistikprogramm durchgeführt. Bei nicht parametrischen Daten wurde ein Mann-Whitney U-Test mit zwei Messungen angewandt. Anschließend wurde die errechnete Signifikanz mit dem manuell korrigierten Wert (Bonferroni-Korrektur nach Holm) verglichen.

Der Mehrfeldertest wurde für Häufigkeitsdaten eingesetzt. Zum *post-hoc* Vergleich wurde anschließend ein Vierfeldertest mit Bonferroni-Korrektur nach Holm durchgeführt.

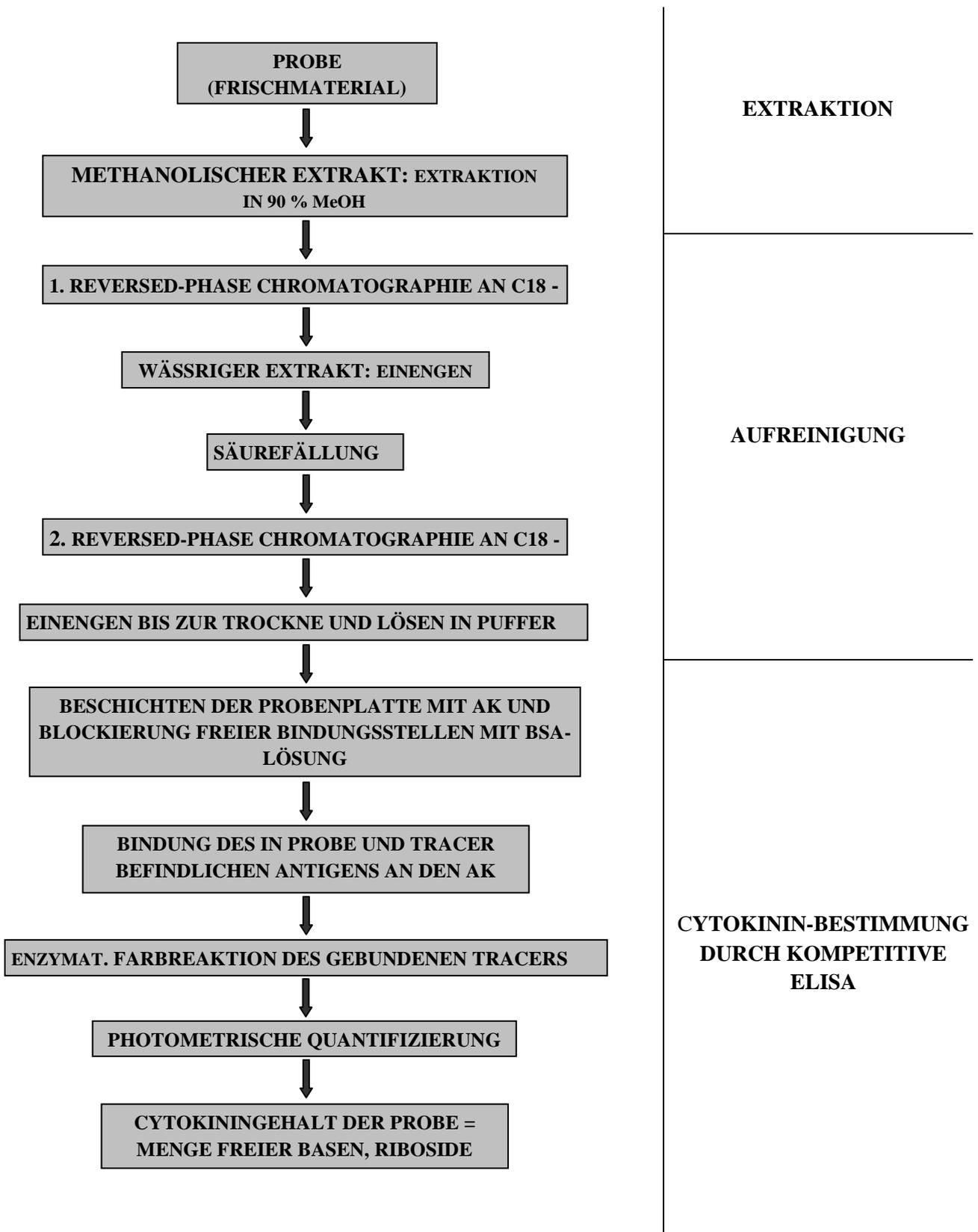


Abb. 2: Analysengang zur Bestimmung des Cytokinin

### 3 ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zuerst eine Untersuchung von 22 argentinischen Weizenvarietäten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kallusbildung aus Embryonen und anschließender Regeneration ganzer Pflanzen durchzuführen. Danach sollte ein Gen für Isopentenyl-Transferase aus *Agrobacterium tumefaciens* in die argentinische Sommerweizen Varietät Klein Brujo und in die amerikanische Sommerweizenvarietät Bobwhite übertragen werden. Das Gen sollte unter der Kontrolle des seneszenzinduzierten *HvS40*-Promotors (Krupinska *et al.* 2002) aus *Hordeum vulgare* und des ebenfalls seneszenzinduzierten *SAG12*-Promotors (Gan & Amasino 1995) aus *Arabidopsis thaliana* exprimiert werden, um die Biosynthese der Cytokinine in alternden Weizenblättern zu fördern, in der Hoffnung, damit die Blattseneszenz, insbesondere des Fahnenblattes zu verzögern. Im optimalen Fall könnte dies zu einer Ertragssteigerung führen.

In einem Vorversuch wurde die Funktionsfähigkeit dieser Promotoren in Weizen überprüft. Dazu wurde das *uidA*-Gen für  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) als Reportergen verwendet.

Als Reporter/selektierbares Markierungsgen wurde ein modifiziertes *gfp* pGFPBAR (Huber, 2002) verwendet, das unter der Kontrolle eines verstärkten *CaMV 35S*-Promotors (Pang *et al.*, 1996) steht. Als weiteres Markergen wurde das PPT-Resistenzgen *bar* unter der Kontrolle des Mais *Ubiquitin*-Promotors (Christensen und Quail, 1996) eingesetzt.

Als weitere Vorarbeiten standen die Konstruktion einer Kassette aus *HvS40*-Promotor und *ipt*-Gen, sowie die Optimierung des Transformations- und Regenerationssystems auf dem Programm, da die sehr niedrigen Transformationseffizienzen noch immer ein zentrales Problem der Gentechnik am Weizen sind.

#### 3.1 SCREENING VON WEIZENVARIETÄTEN

Eine effektive Gewebekultur als Grundlage für die Erzeugung transgener Pflanzen ist zur genetischen Verbesserung des Weizens unabdingbar. Dafür müssen zuerst verschiedene Strategien zur Etablierung eines geeigneten *in vitro*-Systems geprüft werden.

Da ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Transformation von argentinischem Weizen war, wurden zuerst geeignete argentinische Genotypen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kallusbildung und anschließenden Regeneration ganzer Pflanzen untersucht.

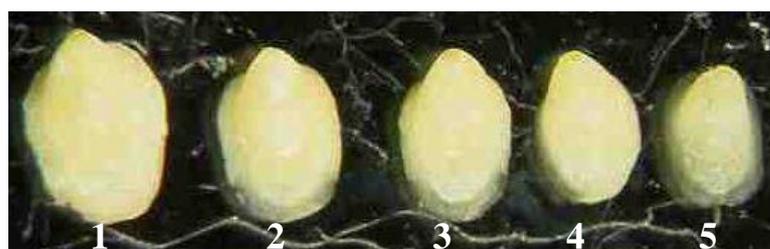
Schließlich wurde überprüft, ob die erhaltenen Regenerate fertil waren.

**3.2 VERSUCHE ZUR INDUKTION VON SCUTELLARKALLUS**

Das ideale Entwicklungsstadium der Embryonen ist etwa zwölf Tage nach der Anthese; bei sehr frühen oder späten Entwicklungsstadien findet keine Bildung von embryogenem Kallus mehr statt. Allerdings kann sich dieser Zeitraum, abhängig vom Genotyp auch geringfügig verschieben (Ozias-Akins 1982; Maddock *et al.*, 1983). Die Bestimmung ihrer Entwicklungsstadien wurde mit der Zadoks Skala durchgeführt. Die Methode „Tage nach der Blütezeit“ ist nicht sehr genau und ist stark vom Genotyp und den Bedingungen im Gewächshaus abhängig (Scott *et al.*, 1990). Geprüft wurde auch der Prozentsatz der Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche.

Ein wichtiges Element für den Erfolg der Kallusbildung ist die Konzentration von 2,4-D. Eine hohe Konzentration unterdrückt das vorzeitige Auskeimen der unreifen Embryonen („*precocious germination*“), verursacht aber andererseits den Abbau der embryogenen Kapazität des Kallus. Bei zu niedriger 2,4-D Konzentration bildet sich aber weder aus dem Scutellum (Ozias-Akins 1982; Maddock 1983), noch aus dem Epiblasten (He 1986) ein Kallus. Da viele Autoren gute Erfolge mit Konzentrationen von 1 - 2 mg 2,4-D/l erzielt hatten (Ozias-Akis, Lörz, Fettig, Huber), wurde diese Konzentration auch in dieser Arbeit verwendet.

Mit der Kombination von zwei Entwicklungsstadien H und B, (H entspricht die Phase 73-76 und B entspricht die Phase 77-83 der Zadoks Skala (Abb. 3)) und zwei 2,4-D Konzentrationen konnten vier verschiedene Behandlungen mit jeder der argentinischen Weizensorten durchgeführt werden (Tab. 10).



**Abb. 3: Fünf verschiedene Entwicklungsstadien unreifer Weizenembryonen. Nr. 1 and 2 das Stadium W, 3-5 repräsentieren das Stadium H.**

**Tab. 10: Mit den Buchstaben A bis D wurden die Kombinationen der Entwicklungsstadien mit den 2,4-D-Konzentrationen gekennzeichnet.**

Entwicklungsstadium	Embryolänge (mm)	Scutellum-Länge (mm) / Aussehen	2,4-D [mg/l]	
			1 mg/l	2 mg/l
<b>H</b>	≅ 1,54	≅ 1,30 / Durchsichtig	<b>A</b>	<b>C</b>
<b>W</b>	≅ 2,23	≅ 2 / Undurchsichtig	<b>B</b>	<b>D</b>

Tabelle 11 zeigt die Induktionsraten von embryogenem Kallus aus dem Scutellum unreifer Embryonen bei den vier verschiedenen Behandlungen.

Insgesamt wurden hierfür 10091 unreife Embryonen verwendet: Bei der Behandlung A erreichten vier Sorten (4; 7; 10 und 20) und bei der Behandlung C zwei Sorten (15 und 20) Induktionsraten über 80 %. Bei der Behandlung B bildete keine der 22 Sorten auf mehr als 50 % der Scutellum-Oberfläche embryogene Kalli. Bei der Behandlung D erreichte mit Ausnahme von drei Sorten (14; 17 und 18, deren Scutellarkallus jeweils 53,7 %; 53,2 % und 89,3 % der Oberfläche ausmachten), keine die 50 %-Marke.

Bei den Behandlungen A und C bildeten - außer Printa Elite - alle Sorten Scutellarkalli, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Der Unterschied der Scutellarkallus-Induktionsrate zwischen Behandlung A und B war 3,6-fach, zwischen C und D 2,4-fach, zwischen A und C 1,1-fach sowie 0,7-fach zwischen B und D. Bei den Behandlungen B und D gab es dagegen bei mehreren Sorten Misserfolge: In sechs Fällen bei der Behandlung B (Sorten 2; 3; 8; 13; 15 und 22) und in drei Fällen bei D (13; 15 und 16). Die Sorte Printa Elite bildete überhaupt keinen Scutellarkallus unter den vier Bedingungen.

Durch einen Mehrfeldertest wurde ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 1017,5$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den vier Behandlung gefunden. Der *post-hoc* Vergleich zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen A und B, C und D, A und C sowie den Behandlungen B und D.

**Tab. 11: Übersicht über die Häufigkeit der Scutellarkallus-Induktionsrate von 22 argentinischen Weizensorte bei den 4 Behandlungen A, B, C und D. Die hervorgehobenen Zahlen entsprechen jeweils den maximalen Induktionsraten für jede Behandlungsvariante. U.E (Unreife Embryonen), S.I. (Scutellarkallus Induktionsrate in Prozenten).**

Behandlung	A		B		C		D	
	U.E. Anzahl	S.I. (%)	U.E. Anzahl	S.I. (%)	U.E. Anzahl	S.I. (%)	U.E. Anzahl	S.I. (%)
Sorte								
1- BCh.	137	62,0	79	<b>46,8</b>	120	48,3	87	35,7
2- BP.	144	59,7	50	0	106	43,6	95	9,4
3- KC.	122	20,5	80	0	164	10,1	101	8,6
4- KP.	118	84,7	157	19,1	84	48,8	150	10,7
5- KCa.	81	19,8	82	23,2	115	40,7	195	11,8
6- KDE.	187	38,5	197	32	138	18,2	109	26,4
7- KB.	165	84,8	128	33,6	153	72,5	92	35,9
8- KE.	51	31,4	86	0	44	45,5	143	2,8
9- KV.	186	68,3	215	8,8	96	63,3	110	15,4

## ERGEBNISSE

10- KD.	119	<b>85,7</b>	131	31,3	64	76,1	102	29,4
11- KEs.	147	64,6	280	22,1	47	61,5	114	1,8
12- PO.	119	27,7	197	7,1	97	58	143	4,7
13- PE.	81	0	137	0	51	0	86	0
14- DEL.	182	57,1	128	13,3	117	55,6	58	53,7
15- PI.	47	53,2	54	0	44	<b>86,4</b>	86	0
16- PA.	80	33,8	63	28,6	61	29,6	80	0
17- PG.	143	58,7	138	16,7	114	66,7	94	53,2
18- PF.	83	78,3	240	5,0	70	58,6	103	<b>89,3</b>
19- IH.	89	32,6	130	11,1	128	13,2	120	10
20- PP.	109	80,4	74	14,9	97	72,6	211	1,2
21- PBR.	91	46,2	202	2,9	130	64,5	100	25
22- PC.	130	31,5	40	0	78	30,8	95	10,5
Mittelwert ± SD	-	52,7 ± 23,5	-	14,4 ± 13,7	-	48,4 ± 23,2	-	19,8 ± 22,6
Insgesamt	2611	-	2888	-	2118	-	2474	-

### 3.2.1 Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche

Nach drei Wochen Zellkultur wurde das Ausmaß der Kallusproliferation in 4 Stufen prozentual bonitiert (1<25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%, Abb. 4).

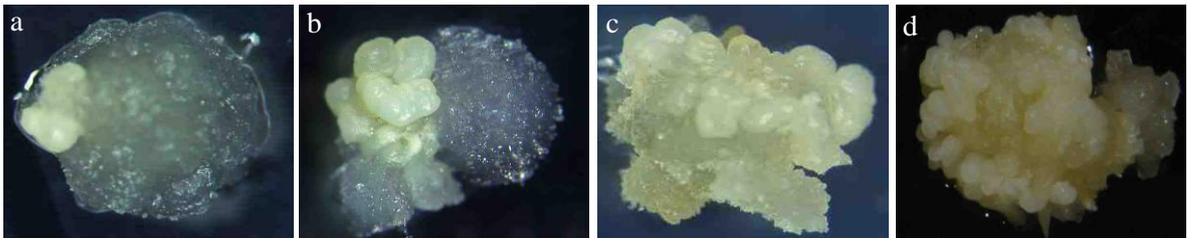
Insgesamt wurden 2618 unreife Embryonen untersucht. Bei der Behandlung A, die von 30 % bis 84,4 % Kallusproliferation reichte, fielen von insgesamt 22 nur zwei Sorten (7 und 10) in die Kategorie 4 (Kallusproliferation auf 76 bis 100 % der Scutellumoberfläche), elf Sorten (1; 3; 4; 8; 15; 16; 18; 19; 21 und 22) proliferierten auf 26 -50 % der Scutellumoberfläche (Kategorie 2) und der Rest (2; 5; 6; 9; 11; 12; 14; 17 und 20) fiel in die Kategorie 3. Bei der Behandlung B, die von 0 % bis 63,3 % reichte, fielen von insgesamt 17 Sorten 13 in die Kategorie 2 (1; 4; 5; 6; 7; 9; 11; 12; 18; 19; 20 und 21) und 4 Sorten in die Kategorie 3 (10; 14; 16 und 17). Nach der Behandlung C, die von 25 % bis 71,2 % reichte, fiel von insgesamt 21 Sorten eine in die niedrigste Kategorie 1 (8), 6 Sorten waren der Kategorie 2 zuzuordnen (1; 2; 3; 5; 19 und 22) und der Rest der Kategorie 3 (4; 6; 7; 9; 10; 11; 12; 14; 15; 16; 17; 18; 20 und 21). Nach der Behandlung D, die von 25 % bis 54,5 % reichte, gehörten zwei Sorten in die Kategorie 1 (8 und 22), 15 zur Kategorie 2 (1-7; 9-12 und 18-21) und zwei zur Kategorie 3 (14 und 17).

Der Mehrfeldertest zeigte, dass es einen höchstsignifikanten Unterschied ( $X^2 = 60$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den vier Behandlungen gab. Der *post-hoc* Vergleich zeigte eine signifikante Differenz zwischen den Behandlungen A und B sowie den Behandlungen C und D. Es gab eine

## ERGEBNISSE

signifikante Korrelation zwischen der Scutellarkallus-Induktionsrate und der Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche in den Behandlungen A ( $r = 0,56^{**}$ ) sowie C ( $r = 0,47^*$ ). Tabelle 12 veranschaulicht die Ergebnisse aus den 4 Behandlungen im Detail.

Wie bereits festgestellt, bildete die Sorte Prointa Elite überhaupt keinen Scutellarkallus.



**Abb. 4:** Bonitierungskategorien für die Kallusproliferation aus der Scutellum-oberfläche. a- Kategorie 1; b- Kategorie 2; c- Kategorie 3 und d- Kategorie 4.

**Tab. 12:** Übersicht über die Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche von unreifen Embryonen von den 22 argentinischen Weizensorte, nach den vier Behandlungsvarianten. Fett gedruckte Zahlen entsprechen jeweils der maximalen Kallusproliferation nach jeder Behandlungsweise. (P.O.: Proliferation der Oberfläche)

Behandlung	A		B		C		D	
	Anzahl Kalli	P. O. (%)						
Sorte								
1- BCh.	85	39	36	34	16	48	34	33,3
2- BP.	69	55	0	0	17	49	30	45
3- KC.	12	31	0	0	39	38,9	30	35
4- KP.	43	50	11	34,1	41	50,6	30	30
5- KCa.	16	52	19	38	24	43	29	39
6- KDE.	33	52	14	41,1	10	55	32	32,1
7- KB.	64	77,0	13	40,4	50	<b>71,2</b>	28	48,2
8- KE.	12	30,0	0	0	10	25	30	25
9- KV.	120	52,1	36	33,3	47	63,3	36	33,3
10- KD.	90	<b>84,4</b>	28	58,9	35	67,9	27	49,1
11- KEs.	95	53,9	62	45,6	24	63,5	42	37,5
12- PO.	26	59,6	14	31,3	21	56,0	32	37,5
13- PE.	0	0	0	0	0	0	0	0
14- DEL.	32	63,3	17	52,9	53	69,3	22	<b>54,5</b>
15- PI.	25	38	0	0	38	39,5	0	0
16- PA.	7	42,9	18	62,5	18	43,8	0	0
17- PG.	45	55,6	15	<b>63,3</b>	76	57,2	50	67

## ERGEBNISSE

18- PF.	32	46,9	22	37,5	23	56,5	39	37,9
19- IH.	29	50,0	28	43,75	27	35,7	24	31,3
20- PP.	104	65,4	11	40,9	85	50,9	31	50
21- PBR.	5	40	33	33,3	22	47,7	20	43,8
22- PC.	10	30	0	0	21	39,6	24	25
Mittelwert ± SD	-	48,6 ± 17,7	-	31,4 ± 21,6	-	48,7 ± 16,0	-	34,3 ± 17,1
Insgesamt	954	-	377	-	697	-	590	-

### 3.2.2 Die vorzeitige Keimung unreifer Embryonen

Der Spross der isolierten und auf Nährmedien kultivierten unreifen Embryonen keimt häufig vorzeitig aus. Dies ist unerwünscht, weil es den Embryo vom Medium abhebt (die Kultivierung erfolgt ja mit der embryonalen Achse, also dem Spross, nach unten) und so die Hormon- und Nährstoffversorgung der Kalli unterbrechen könnte. Die Häufigkeit der vorzeitigen Keimung steigt erwartungsgemäß mit dem Alter der Embryonen an und ist allgemein höher, wenn diese mit der axialen Seite aufs Medium gelegt werden (He, 1988).

Die Ansichten über die optimale Konzentration von 2,4-D für die Kallusbildung bei gleichzeitiger Hemmung der vorzeitigen Keimung differieren je nach Autor: Ozias-Akins and Vasil (1982; 1983) und He *et al.* (1986) schlagen 2 mg/l vor, während Maddock *et al.* (1983) von 1 mg/l als der optimalen Konzentration ausgehen. Zwar wächst der Kallus besser bei höheren Konzentrationen (2,5 oder 5 mg/l), aber die Regenerationsfähigkeit von Pflanzen vermindert sich.

Deshalb wurde in dieser Arbeit neben der Kallusbildung auch die Anfälligkeit der 22 Sorten für vorzeitige Keimung untersucht. Die Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse für die vier verschiedenen Behandlungsweisen. Insgesamt wurden 10091 unreife Embryonen untersucht.

Je jünger die unreifen Embryonen waren und je höher die 2,4-D Konzentration im Medium war, desto geringer war die Tendenz zur verfrühten Keimung.

Die unreifen Embryonen von Prointa Elite (Sorte 13) bildeten zwar keine embryogenen Kalli, aber einige zeigten vorzeitige Keimung

Durch einen Mehrfeldertest wurde ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 985,7$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den vier Behandlungen herausgefunden. Der *post-hoc* Vergleich zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen A und B, C und D, A und C sowie den Behandlungen B und D. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Entwicklungsstadium H weniger zur vorzeitigen Keimung neigte als das Entwicklungsstadium W. Die höhere Konzentration an 2,4-D

ERGEBNISSE

(2 mg/l) zeigte in beiden Entwicklungsstadien eine bessere Wirkung. Es gab eine negative, geringfügige Korrelation zwischen der Scutellarkallus-Induktionsrate und der vorzeitige Keimung unreifer Embryonen.

**Tab. 13: Übersicht über die Häufigkeit der vorzeitigen Keimung unreifer Embryonen von 22 argentinischen Weizensorte in Abhängigkeit von den Behandlungen. Die fett gedruckten Zahlen entsprechen den maximalen Werten jeder Behandlungsweise. U.E (Unreife Embryonen), v. Keim. (verfrühte Keimung in %).**

Behandlung	A		B		C		D	
Sorte	U.E. Anzahl	v. Keim. (%)						
1- BCh.	137	0	79	0	120	0	87	31,0
2- BP.	144	6,3	50	66,0	106	0	95	5,7
3- KC.	122	23,8	80	27,5	164	0	101	6,9
4- KP.	118	3,4	157	27,0	84	0	150	23,2
5- KCa.	81	14,8	82	25,6	115	0	195	7,9
6- KDE.	187	4,8	197	9,6	138	0	109	15,1
7- KB.	165	0,6	128	36,7	153	2,5	92	25,0
8- KE.	51	23,5	86	72,1	44	9,1	143	86,1
9- KV.	186	8,1	215	34,1	96	0	110	7,7
10- KD.	119	5,9	131	29,0	64	0	102	29,4
11- KEs.	147	9,5	280	37,1	47	5,1	114	43,0
12- PO.	119	4,2	197	48,2	97	5,8	143	48,8
13- PE.	81	<b>32,1</b>	137	37,2	51	<b>31,4</b>	86	23,3
14- DEI.	182	21,4	128	65,6	117	0	58	0
15- PI.	47	19,2	54	50,0	44	0	86	0
16- PA.	80	21,5	63	0	61	11,1	80	0
17- PG.	143	7,7	138	14,0	114	4,4	94	0
18- PF.	83	2,4	240	67,5	70	0	103	2,9
19- IH.	89	2,3	130	29,2	128	9,4	120	0
20- PP.	109	23,9	74	<b>78,4</b>	97	26,8	211	<b>97,7</b>
21- PBR.	91	8,8	202	28,4	130	12,9	100	37,5
22- PC.	130	6,9	40	67,5	78	12,8	95	36,8
Mittelwert ± SD		11,4 ± 9,4		38,7 ± 23,1		6,0 ± 8,8		24,0 ± 26,9
Insgesamt	2611	-	2888	-	2118	-	2474	-

### 3.2.3 **Regeneration von Pflanzen aus embryogenem Scutellarkallus**

Sorten und Behandlungen, bei denen keine embryogenen Kalli entstanden, sind hier nicht berücksichtigt (z.B. die ganze Sorte 13 oder die Sorte 2, Behandlung B).

Für die Regeneration von Weizenpflanzen wurden Kalli von 21 Sorten verwendet, die nicht älter als drei Wochen waren. Die Subkultur erfolgte auf R1-Medium (Murashige und Skoog, 1962, modifiziert nach Ahuja *et al.*; 1982). Dann wurden die Regenerationsraten (Tab.14) und die Anzahl der gebildeten Sprosse pro Kallus (Tab. 15) ausgewertet.

Für diesen Versuch wurden insgesamt 2862 embryogene Scutellarkalli verwendet (Tab. 14).

Nach den Behandlungen A und C haben alle Sorten auf unterschiedliche Weise Pflänzchen regeneriert, wogegen bei den Behandlungen B und D manche Sorten keine Sprossen bildeten.

Mit Ausnahme der Sorte 5 (Behandlung A) regenerierten alle anderen Sorten zu Pflänzchen aus den Scutellarkalli mit mehr als 50 %, manche sogar mit 100 %, wie die Sorten 7, 19 und 21. Bei Behandlung C blieben nur drei Sorten (1, 10 und 11) unter 50 % Regenerationshäufigkeit, aber keine erreichte 100 %.

13 von 14 Sorten bei Behandlung B und 14 von 18 Sorten bei Behandlung D zeigten eine Regenerationshäufigkeit von über 50 %. Die Sorten 7, 9 und 12 bei Behandlung B und die Sorten 7 und 9 bei Behandlung D wiesen sogar eine Regenerationshäufigkeit um 100% auf.

Aber es gab zwei Sorten (5 und 18) bei Behandlung B und eine Sorte (6) bei Behandlung D, die niemals Sprosse bildeten.

Durch einen Mehrfeldertest zeigte sich ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 139,8$ ;  $p < 0,001$ ) der Regenerationshäufigkeit zwischen den vier Behandlungen. Der *post-hoc* Vergleich wies signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen A und B, C und D sowie den Behandlungen A und C auf. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen der Scutellarkallus-Induktionsrate und der Regenerationshäufigkeit.

Der Prozentsatz der Kultureffizienz (Anzahl regenerierter Kalli/Anzahl verwendeter unreifer Embryonen x 100) hat zwischen bzw. innerhalb der Sorten variiert. Die Sorte 7 erreichte mit 84,8 % die höchste Kultureffizienz bei der Behandlung A. Bei den Behandlungen B und D hingegen befanden sich die niedrigsten Werte (Tabelle 14) zwischen den vier Behandlungen. Bei der Kultureffizienz wurde durch einen Mehrfeldertest ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 1095,4$ ;  $p < 0,001$ ) herausgefunden. Der *post-hoc* Vergleich zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen A und B, C und D, A und C sowie den Behandlungen B und D.

ERGEBNISSE

**Tab. 14: Übersicht über die Regenerationshäufigkeit aus Scutellarkalli von 21 argentinischen Weizensorte nach den vier Behandlungsvarianten A, B, C und D (Tab. 10). Die fett gedruckten Zahlen entsprechen der maximalen und minimalen Regenerationsrate je Behandlung. SK. (Scutellarkallus), RR. (Regenerationsrate aus Scutellarkalli in Prozent), K.E. (Kultureffizienz).**

Behandlung	A			B			C			D		
Sorte	SK. Anzahl	RR. (%)	K.E. (%)	SK. Anzahl	RR. (%)	K.E. (%)	SK. Anzahl	RR. (%)	K.E. (%)	SK. Anzahl	RR. (%)	K.E. (%)
1- BCh.	65	93,3	57,8	37	73,6	<b>34,4</b>	58	93,7	45,3	31	74,2	26,5
2- BP.	67	77,7	46,4	0	-	-	46	57,9	25,2	9	55,5	5,2
3- KC.	25	61,3	12,6	0	-	-	17	57,6	<b>5,8</b>	9	48	4,1
4- KP.	89	72,5	61,4	30	60	11,5	34	64,7	31,6	16	72,5	7,8
5- KCa.	16	<b>46,4</b>	<b>9,2</b>	19	<b>0</b>	<b>0,0</b>	47	68	27,7	23	12,5	1,5
6- KDE.	45	73,3	28,2	50	66,6	21,3	25	68	12,4	29	<b>0</b>	<b>0,0</b>
7- KB.	103	<b>100</b>	<b>84,8</b>	43	<b>100</b>	33,6	98	76,3	55,3	33	<b>100</b>	35,9
8- KE.	16	78,8	24,7	0	-	-	20	65	29,6	4	50	1,4
9- KV.	100	96,3	65,8	19	<b>100</b>	8,8	46	<b>95,2</b>	60,3	17	<b>100</b>	15,4
10- KD.	75	97	83,1	31	74,2	23,2	34	<b>30</b>	22,8	18	42,9	12,6
11- KEs.	96	54,3	35,1	58	8,6	1,9	29	37,9	23,3	2	25,8	0,5
12- PO.	33	94,44	26,2	14	<b>100</b>	7,1	42	72,7	42,2	7	56,3	2,6
13- PE.	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	0
14- DEI.	101	92,3	52,7	17	81,2	10,8	42	91,7	51,0	31	87,1	46,8
15- PI.	25	88,6	47,1	0	-	-	25	64	55,3	0	-	-
16- PA.	27	85,7	29,0	18	56,3	16,1	18	88,8	26,3	0	-	-
17- PG.	75	65,7	38,6	23	56,2	9,4	56	66,5	44,4	48	52,9	28,1
18- PF.	58	93,1	72,9	12	<b>0</b>	<b>0,0</b>	32	83,3	48,8	78	66,6	<b>59,5</b>
19- IH.	29	<b>100</b>	32,6	15	65,5	7,3	17	75	9,9	12	57,1	5,7
20- PP.	81	85,5	68,7	21	95,2	14,2	45	83,9	<b>60,9</b>	3	80,6	1,0
21- PBR.	42	<b>100</b>	46,2	6	82,3	2,4	82	93,5	60,3	25	80	20,0
22- PC.	39	92,3	29,1	0	-	-	24	79,1	24,4	10	66,6	7,0
Mittelwert ± SD	-	83,3 ± 15,8	45,3 ± 21,8	-	63,7 ± 33,8	12,6 ± 10,8	-	72,0 ± 17,4	36,3 ± 17,4	-	59,4 ± 29,2	14,1 ± 17,1
Insgesamt	1207	-	-	413	-	-	837	-	-	405	-	-

In Tabelle 15 zeigten die Sorte Klein Brujo (7) und Klein Dragon (10) bezüglich der Sprossbildung bei der Behandlung A mit 9,5 der höchsten Anzahl der gebildeten Sprosse pro Kallus. Die Sorte Klein Cacique (5) hatte mit 1,8 den niedrigsten Wert.

ERGEBNISSE

Bei der Behandlung B lagen die Werte zwischen 1,6 (Sorte 1) und 7,6 (Sorte 7), ebenso wie nach der Behandlung C (1,6 mit Sorte 14 und 7,6 mit Sorte 20), und nach der Behandlung D zwischen 1,7 (Sorte 1) und 6,0 (Sorte 20). Zwischen den Behandlungen gab es keinen signifikanten Unterschied (K-W-Test:  $X^2= 57,37$   $p=7,3$ ). Es wurde kein Zusammenhang zwischen Sprossbildung und Regenerationsrate sowie zwischen Sprossbildung und Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche gefunden.

**Tab. 15: Übersicht über den Mittelwert der Sprossbildung aus embryogenem Kallus von 21 argentinischen Weizensorte nach den vier Behandlungsvarianten (Tab. 10). Die fett gedruckten Zahlen entsprechen der maximalen und minimalen Spross-Anzahl bei jeder Behandlungsvariante. Scut. K. (Scutellarkallus).**

Behandlung	A		B		C		D	
Sorte	Scut. K. Anzahl	Sprosse Anzahl						
1- BCh.	65	2,1	37	1,6	58	2,7	31	1,7
2- BP.	67	7,9	0	-	46	5,6	9	4,4
3- KC.	25	5,3	0	-	17	5,3	9	2,9
4- KP.	89	2,9	30	2,6	34	5	16	1,8
5- KCa.	16	<b>1,8</b>	19	<b>0</b>	47	2	23	2
6- KDE.	45	6,1	50	6	25	6,4	29	<b>0</b>
7- KB.	103	<b>9,5</b>	43	7,6	98	5,6	33	5
8- KE.	16	7,5	0	-	20	6,6	4	4,6
9- KV.	100	6,8	19	4,2	46	8,3	17	6,4
10- KD.	75	<b>9,5</b>	31	4,5	34	1,7	18	4,8
11- KEs.	96	5,7	58	3,3	29	4,9	2	4,8
12- PO.	33	3,8	14	3,3	42	3,4	7	3,3
13- PE.	0	-	0	-	0	-	0	-
14- DEL.	101	5,8	17	2	42	<b>1,6</b>	31	1,8
15- PI.	25	3,7	0	-	25	3,4	0	-
16- PA.	27	2,3	18	2	18	2,3	0	-
17- PG.	75	2,5	23	1,8	56	3,6	48	3,1
18- PF.	58	5,6	12	<b>0</b>	32	2,3	78	3,2
19- IH.	29	2,3	15	3,1	17	2	12	2,2
20- PP.	81	8,0	21	<b>7,4</b>	45	<b>7,6</b>	3	<b>6,0</b>
21- PBR.	42	2,9	6	6	82	2,1	25	2,4
22- PC.	39	4,2	0	-	24	3,4	10	2,4
Mittelwert ± SD	-	5,1 ± 2,5	-	3,5 ± 2,3	-	4,1 ± 2,0	-	3,1 ± 1,8
Insgesamt	1207	-	413	-	837	-	405	-

### 3.2.4 Kultur der Regenerate in Erde

Alle *in vitro* bewurzelten Regenerate konnten erfolgreich in Erdkultur genommen werden. Abbildung 5 zeigt den gesamten Verlauf der Regeneration *in vitro* (Abb. 5, a-c) und in Erde (Abb. 5 d, e). Sprosse, die schon auf R1-Medium *in vitro* eine kräftige Wurzel entwickelt hatten, wurden direkt in Erde eingesetzt. Diejenigen, die eine schwache oder keine Wurzel gebildet hatten, wurden auf Bewurzelungsmedium (190-2-Medium) überführt. Auch diese entwickelten sich zu morphologisch normalen, fertilen Pflanzen.

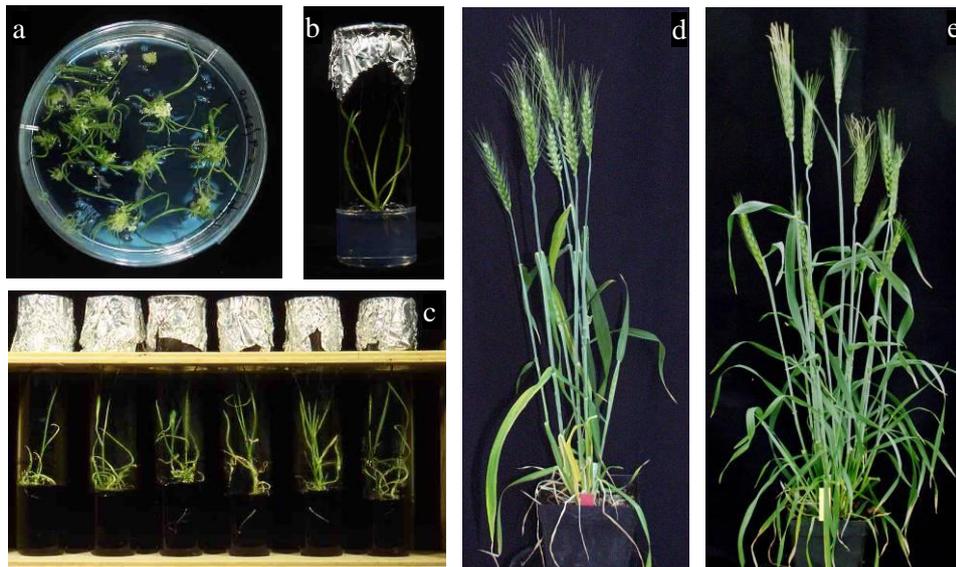


Abb. 5: *In vitro* Regeneration von Weizen. (a) Regeneration auf R1-Medium, (b) weiterer Verlauf der Regeneration im Schnappdeckelgefäß, (c) Bewurzelung auf 190-2-Medium (d) Regenerate im Gewächshaus, Versuchspflanze der Varietät Brujo und (e) aus den Samen gezogene Kontrollpflanze derselben Sorte.

## 3.3 SORTENAUSWAHL

Für die Übertragung eines Gens in eine argentinische Sommerweizenvariätet wurde die Sorte Klein Brujo ausgewählt, weil sie eine die besten Ergebnisse in den Behandlungsvarianten A und C erzielte: Bei der Scutellarkallus Induktionsrate (84,8 % bzw. 72,5 %), bei Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche (77 % bzw. 71,2 %) und bei Regenerationshäufigkeit aus Scutellarkalli (100 % bzw. 76,3 %), bei der Anzahl der gebildeten Sprosse pro Kallus 9,5 wurden die höchsten und bei der vorzeitigen Keimung (0,6 % bzw. 2,5%) die niedrigsten Werte erhalten.

## 3.4 DER EINFLUSS DES MEDIUMS

### 3.4.1 Medien für die Induktion von Scutellarkallus

Zum Vergleich der Induktionsfähigkeit von Scutellarkallus der 22 Weizenvarietäten wurde routinemäßig das L3-5-Medium (Jähne *et al.*, 1991; modifiziert) verwendet. In neueren Arbeiten

zur Transformation von Weizen wurde jedoch häufiger MS-Medium (Murashige und Skoog 1962, in einigen Fällen modifiziert) als Induktionsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an 2,4-D, Saccharose und Maltose verwendet (Ortiz *et al.*, 1996; Barro *et al.*, 1999, 1998; Rasco-Gaunt *et al.*, 1999; Alvarez, 2000; Jordan, 2000; Varshney and Altpeter, 2001).

Für die Wahl des optimalen Mediums wurden zwei Medien auf MS-Basis (Barcelo und Lazzeri, 1995, modifiziert) mit je zwei Kombinationen von Maltose- und 2,4-D-Konzentrationen, sowie das L3-5 Medium, dessen Maltose- und 2,4-D-Konzentration den Behandlungen A bzw. C entspricht, geprüft. Insgesamt wurden also sechs Medien getestet (Tab. 16). Versuchsobjekt waren unreife Embryonen der Sorte Klein Brujo im Entwicklungsstadium H. Hierbei wurden die zwei Konzentrationen von 2,4-D innerhalb jedes Mediums verglichen. Anschließend wurden sowohl die 1 mg/l 2,4-D als auch die 2 mg/l 2,4-D Konzentrationen der drei Medien untereinander verglichen.

**Tab. 16: Überblick über die Bezeichnung der sechs Medien**

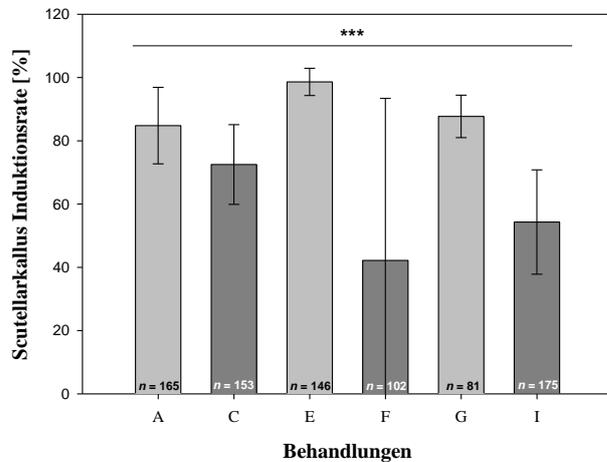
		Medien					
		L3-5		M3		M9	
		Auxin 2,4-D.		Auxin 2,4-D.		Auxin 2,4-D.	
		1 mg/l	2 mg/l	1 mg/l	2 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
Maltose	3 g/l	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	-	-
	9 g/l	-	-	-	-	<b>G</b>	<b>I</b>

Abbildung 6 zeigt die Induktionsraten von embryogenem Kallus aus dem Scutellum unreifer Embryonen für die sechs Varianten des Mediums.

Für diesen Versuch wurden insgesamt 822 unreife Embryonen verwendet. Bei Verwendung der Medien A, C, E, F, G und I lag die durchschnittliche Scutellarkallus-Induktionsrate bei **84,8 ± 12,1 %; 72,5 ± 12,6 %; 98,6 ± 4,3 %; 42,2 ± 51,3 %; 87,7 ± 6,7 %** und **54,3 ± 16,5 %**. Die Medien E bzw. F ergaben die höchste bzw. die geringste Induktionsrate.

Durch einen Mehrfeldertest wurde ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 151,2$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den sechs Behandlung herausgefunden. Der *post-hoc* Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen E und F sowie G und I. Signifikante Differenzen zeigten sich hinsichtlich der Auxinkonzentration zwischen den Behandlungen A und E, E und G sowie zwischen C und F bzw. C und I. Über 80 % der Scutellarkallus Induktionsrate

wurden mit den Medien A, E und G erhalten. Dies sind die drei Medien, deren Konzentration



**Abb. 6: Vergleich der Scutellarkallus Induktionsrate (Mittelwert  $\pm$  SD) bei den sechs Behandlungsvarianten (A, C, F, G, H und I) von unreifen Weizenembryonen im Entwicklungsstadium H, und den Phytohormon-Konzentrationen 1 mg/l (helle Säulen) bzw. 2 mg/l (dunkle Säulen). Die Stichprobengrößen sind in der Graphik angegeben.**

2,4-D 1 mg/l beträgt.

### 3.4.2 Einfluss des Mediums auf die Anzahl der Kalli auf der embryogenen Oberfläche

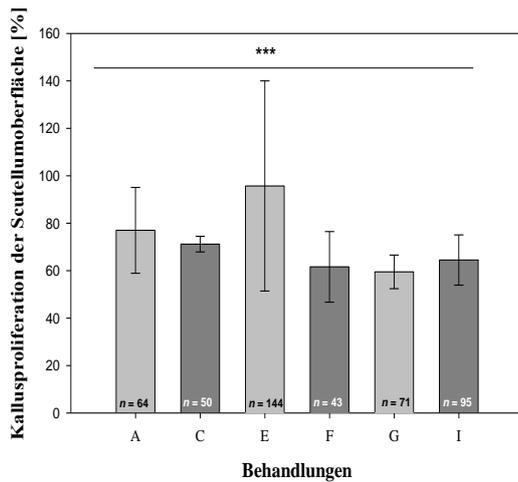
Wie bei 3.2.1 wurde bei jedem unreifen Embryo nach dreiwöchiger Kultur auf den sechs Medien festgestellt, wie viel der Scutellum-Oberfläche mit embryogenem Kallus bedeckt war. Der Anteil der Kallus-bildenden Oberfläche wurde wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben in vier Kategorien aufgeteilt (Abb. 7).

Insgesamt wurden 467 unreife Embryonen untersucht. Für die Behandlung A, C, F, G, H und I lag die Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche bei  $77 \pm 18,1$  %;  $71,2 \pm 6,4$  %;  $95,7 \pm 44,3$  %;  $61,6 \pm 14,9$  %;  $59,5 \pm 7,1$  %; und  $64,5 \pm 10,6$  % jeweils (Abbildung 8). Bei Medium E erreichte die Kallusproliferation der Scutellumoberfläche über 90 %, der Rest lag zwischen 59,5 % und 77 %.

Durch einen Mehrfeldertest wurde ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 54,4$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den sechs Behandlungen festgestellt. Der anschließende *post-hoc* Vergleich zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen mit der 1 mg 2,4-D/l Konzentration, das heißt zwischen A und E sowie E und G. Zwischen den beiden Konzentrationen bei Verwendung des gleichen Mediums gab es nur bei den Behandlungen E und F eine signifikante Differenz.



**Abb. 7: Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche. a- auf M3-; b- auf M9-Medium. Beide Bilder zeigten 100% Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche.**



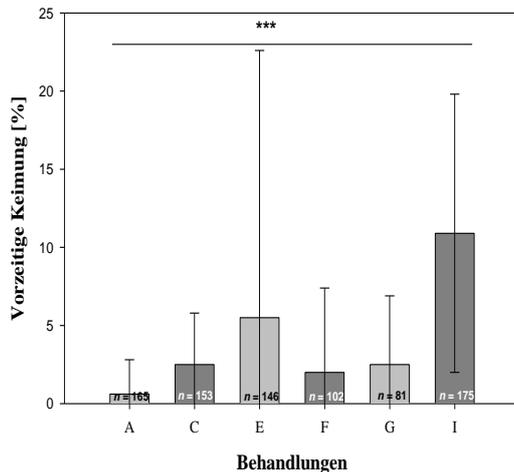
**Abb. 8: Vergleich der mittleren Kallusproliferation der Scutellumoberfläche ( $\pm$ SD) nach sechs Behandlungen (A, C, E, F, G und I). Stichprobengrößen sind in der Graphik angegeben.**

### 3.4.3 Das Medium zur Vermeidung der vorzeitigen Keimung unreifer Embryonen

Parallel zur Scutellarkallus-Induktionsrate in den drei Medien wurde auch die Eignung des Mediums zur Unterdrückung der vorzeitigen Keimung untersucht.

Insgesamt wurden 822 unreife Embryonen für diesen Versuch verwendet.

Für die Medien A, C, E, F, G und I lag die vorzeitige Keimungsrate bei  $0,61 \pm 2,2$  %;  $2,5 \pm 3,3$  %;  $5,5 \pm 17,1$  %;  $2 \pm 5,4$  %;  $2,5 \pm 4,4$  % und  $10,9 \pm 8,9$  % (Abb. 9).



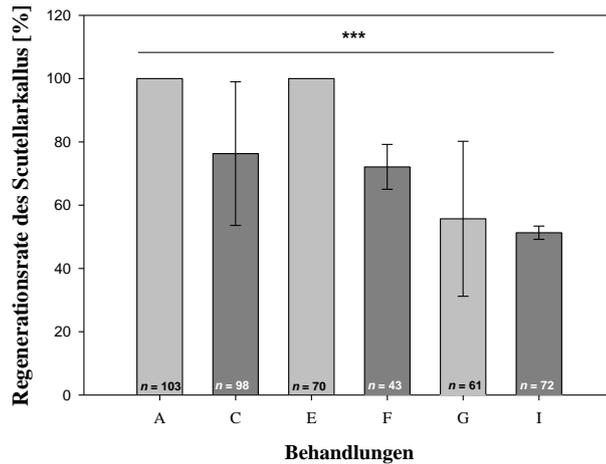
**Abb. 9: Vergleich der vorzeitigen Keimungsrate (Mittelwert  $\pm$ SD) bei der Verwendung der 6 verschiedenen Medien (A, C, E, F, G und I). Stichprobengrößen sind in der Graphik angegeben.**

Durch einen Mehrfeldertest wurde ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 26,9$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den sechs Behandlungen herausgefunden. Der *post-hoc* Vergleich zeigte signifikante Unterschiede bei den Medien mit 2 mg 2,4-D/l zwischen den Behandlungen C und I. Außer bei M3-Medium, war die vorzeitige Keimungsrate tendenziell bei der höheren 2,4-D-Konzentration größer.

3.4.4 **Das Medium im Hinblick auf die Regenerationsfähigkeit der Sorte Klein Brujo**

Als Ausgangsmaterial für die Regeneration wurde Kallus der Sorte Klein Brujo verwendet (vgl. Abschnitt 3.2.3).

Abbildung 10 zeigt die Regenerationshäufigkeit aus Scutellarkalli und Abbildung 11 die Sprossbildung aus dem embryogenen Kallus bei den sechs verschiedenen Behandlungsvarianten.



**Abb. 10: Vergleich der mittleren Regenerationsraten aus Scutellarkallus (Mittelwert  $\pm$  SD) bei Verwendung der sechs verschiedenen Medien (A, C, E, F, G und I). Stichprobengrößen sind in der Graphik angegeben.**

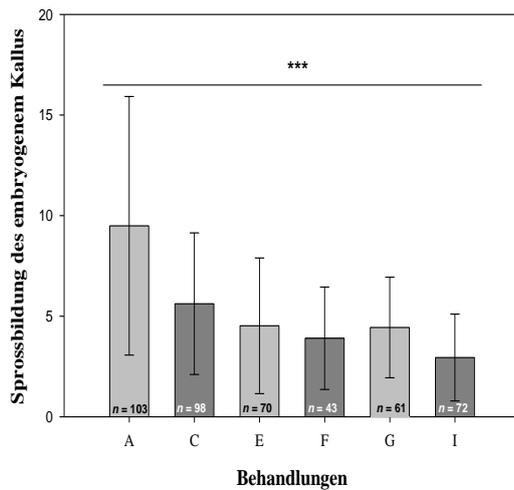
Für diesen Versuch wurden insgesamt 447 Scutellarkalli verwendet. Für die Behandlungen A, C, E, F, G und I lag die durchschnittliche Regenerationsrate bei jeweils **100 %; 76,3  $\pm$  22,7 %; 100 %; 72,1  $\pm$  7,1 %; 55,7  $\pm$  24,5 % und 51,3  $\pm$  2,1 %**. Somit wurde mit Behandlung A (L35-Medium 1 mg 2,4-D/l) und E (M3-Medium 1 mg 2,4-D/l) die maximale Regenerationsrate erzielt, während die Behandlung I (M9-Medium 2 mg/l) die minimale Regenerationsrate lieferte.

Durch einen Mehrfeldertest wurde ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 98,1$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den sechs Behandlungen herausgefunden. Der *post-hoc* Vergleich zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen A und C, E und F. Sowie zwischen den Behandlungen A und G, E und G, die 1mg/l 2,4-D enthalten, bzw. zwischen C und I, die 2 mg 2,4-D/l enthalten.

Parallel zur Regenerationsrate wurde auch die Menge an Sprossen festgestellt, die pro Kallus gebildet wurden. Für die Behandlungen A, C, E, F, G und I lag die durchschnittliche Sprossbildungsrate des embryogenen Kallus bei jeweils **9,5  $\pm$  6,4; 5,6  $\pm$  3,5; 4,5  $\pm$  3,4; 3,9  $\pm$  2,5; 4,4  $\pm$  2,5 und 2,9  $\pm$  2,1**.

Mit dem Medium I (Medium M9 2 mg 2,4-D/l) wurde die geringste, mit Medium A (Medium L35 1 mg 2,4-D /l) die höchste Sprossbildungsrate erhalten.

Durch einen Kruskal-Wallis Test zeigte sich ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 48,4$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den sechs Behandlung. Der *post-hoc* Vergleich zeigte nur signifikante



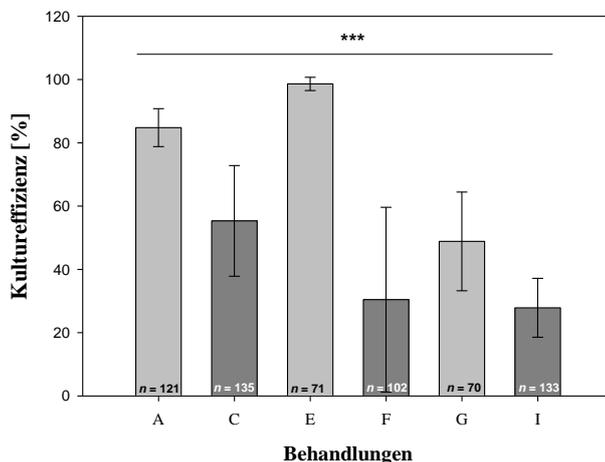
**Abb. 11: Vergleich der mittleren Sprossbildung des embryogenen Kallus (Mittelwert  $\pm$  SD) bei Anzucht auf sechs verschiedenen Medien (A, C, E, F, G und I). (K-W-Test:  $X^2=74,2$   $p < 0,001$ ). Stichprobengrößen sind in der Graphik angegeben.**

Unterschiede zwischen den Behandlungen A und C, sowie zwischen den Behandlungen A und E sowie A und G, die 1 mg 2,4-D/l erhalten, bzw. zwischen C und I, die 2 mg 2,4-D/l erhalten.

Die Kultureffizienz der Behandlungen A, C, E, F, G und I betragen jeweils  $84,8 \pm 6 \%$ ;  $55,3 \pm 17,5 \%$ ;  $98,6 \pm 2,1 \%$ ;  $30,4 \pm 29,1 \%$ ;  $48,8 \pm 15,6 \%$  und  $27,8 \pm 9,3 \%$  (Abb. 12). Hier wurden auch mit den Behandlungen A und E die maximalen Werte von über 80% erreicht. Dagegen lagen die Kultureffizienzwerte bei den Behandlungen F und I unter 30 %.

Durch einen Mehrfeldertest wurde ein höchstsignifikanter Unterschied ( $X^2 = 162,4$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen den vier Behandlungen herausgefunden. Der *post-hoc* Vergleich zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen A und C, E und F sowie G und I. Außerdem wiesen unter den 1 mg 2,4-D/l enthaltenden Medien den Behandlungen A und E, A und G, E und G bzw. unter 2 mg 2,4-D/l enthaltenden Medien C und F sowie C und I auch einen signifikante Unterschiede auf.

Nach der Analyse der sechs Behandlungen hinsichtlich der verschiedenen Parameter wurden die



**Abb. 12: Vergleich der mittleren Kultureffizienz (Mittelwert  $\pm$  SD) bei Verwendung der sechs verschiedenen Medien (A, C, E, F, G und I). Stichprobengrößen sind in der Graphik angegeben.**

drei Behandlungen A, E und G für den Partikelbeschuss unreifer Embryonen ausgewählt.

### 3.5 KONSTRUKTION DES TRANSFORMATIONSVEKTORS

#### 3.5.1 Konstruktion der Nutzenkassette

Im Plasmid pS40-IPT sollten der *HvS40*-Promotor aus pS40-GUS (Krupsinska *et al.*, 2002) und das *ipt*-Gen mit dem *nos*-Terminator aus pSG516 (Gan und Amasino, 1995) kombiniert werden. Als *HvS40*-Promotor wurden die ca. 2 kb großen stromaufwärts der das *HvS40*-Protein kodierenden Region gelegene Bereiche beschrieben. Das *HvS40*-Protein ist im Zellkern lokalisiert und wird besonders stark im Mesophyll während der Blattseneszenz exprimiert (Krupsinska *et al.*, 2002).

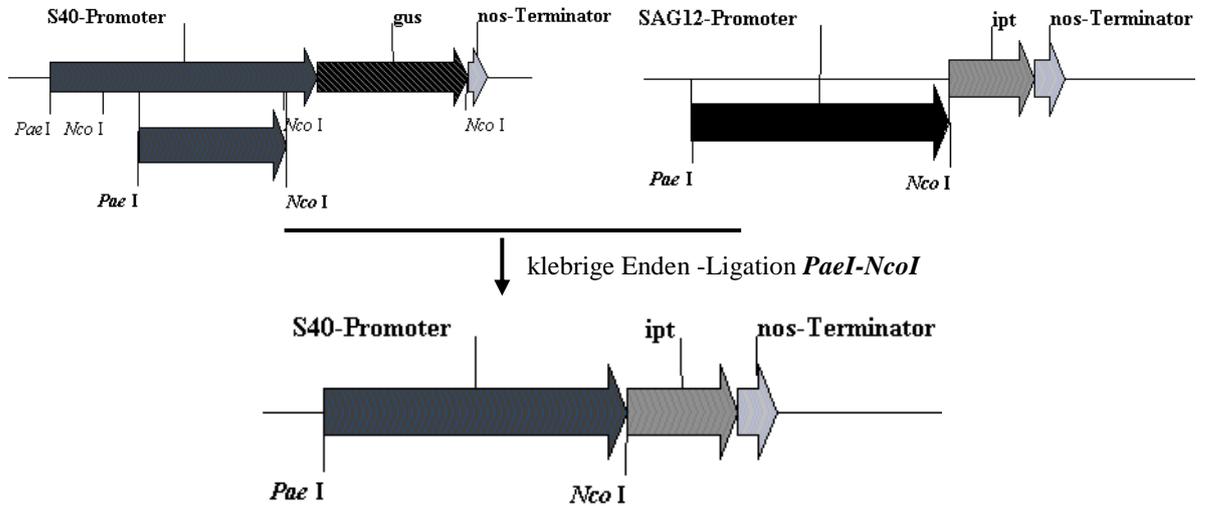
##### 3.5.1.1 Das Plasmid pS40-IPT

Als Ausgangsplasmid für die Konstruktion diente der Vektor pSG516, der den *SAG12*-Promotor aus *Arabidopsis thaliana* (Gan & Amasino 1995), das 0,7 kb *ipt*-Gen (Li *et al.* 1992) und den 0,3 kb des Polyadenylierungssignals des *nos*-Terminators (beide aus *Agrobacterium tumefaciens*) beinhaltet. Zunächst wurde der *HvS40*-Promotor mittels Restriktionsverdau durch *NcoI/PaeI* aus pS40-GUS ausgeschnitten, der den *SAG12*-Promotor ersetzen soll (Abbildung 13).

Eine der beiden *PaeI* Schnittstellen in pS40-GUS befindet sich an der Position -2032 stromaufwärts vom Transkriptionsstart des *HvS40*-Gens. Am anderen Ende befinden sich zwei *NcoI* Erkennungsstellen an den Positionen -26 und +29 relativ zum Transkriptionsstart. Die Sequenz ab der zweiten *NcoI* Schnittstelle bis zum Beginn des *gus*-Gens enthält das *HvS40*-Gen. In der Position +29 befindet sich der Translationsstart des *HvS40*-Gens, daher sollte das Plasmid an dieser Stelle geschnitten werden. Dies ergab ein 2 kb *PaeI/NcoI HvS40*-Promoter-Fragment, wobei die Bindungsstellen von den seneszenzspezifischen Transkriptionsfaktoren ab dem Transkriptionsstart bis zur Position -817 (Dähnhardt, 2003) erhalten geblieben sind.

An welchen der beiden *NcoI*-Schnittstellen geschnitten wurde, wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft (3.5.2).

Anschließend wurde dieses Fragment in den Vektor pSG516 ligiert, aus dem zuvor der *SAG12*-Promotor mittels derselben Restriktionsenzyme entfernt worden war. Das entstandene Plasmid pS40-IPT war 5,69 kb groß.



**Abb. 13: Konstruktion des 5,69 kb pS40-IPT Plasmids aus pS40-GUS und pSG516. Beide Plasmide wurden mit den Restriktionsendonukleasen *PaeI* und *NcoI* geschnitten. Die proteincodierende Region der Isopentenyl-Transferase steht somit unter Kontrolle des *HvS40*-Promotors aus Gerste.**

### 3.5.2 Überprüfung des Konstrukts mittels Restriktionsanalyse

Die beiden *SAG*-Promotoren haben fast die gleiche Größe: *HvS40*: 2053 bp gegen *SAG12*: 2196 bp. Deswegen wurden nach Klonierung und Transformation von *E. coli* mit dem neuen Plasmid beide Plasmide mittels *NcoI/SacI*-Verdau (Restriktionskarte Abb. 14) und anschließender Gelelektrophorese (Abb. 15) überprüft.

Die Restriktionskarte (Abb. 16) und die Elektropherogramme (Abb. 17) zeigen die Schnittstellen und Bandenmuster, die mit pS40-IPT nach Restriktion mit verschiedenen Restriktionendonukleasen erhalten wurden, um die Richtigkeit des konstruierten Plasmids zu überprüfen. Durch Verdau mit *Eco52I* (Abb. 16e) konnte z.B. bestätigt werden, dass die Position +29 der *NcoI* Schnittstelle, die die Sequenz zwischen den beiden *NcoI*-Stellen (s. Abb. 13) den Translationsstart des *HvS40*-Gens enthält, noch erhalten war. Auf dem Plasmid befindet sich eine der Erkennungsstellen von *Eco52I* an Position 17 relativ zum Transkriptionsstart des *HvS40*-Gens.

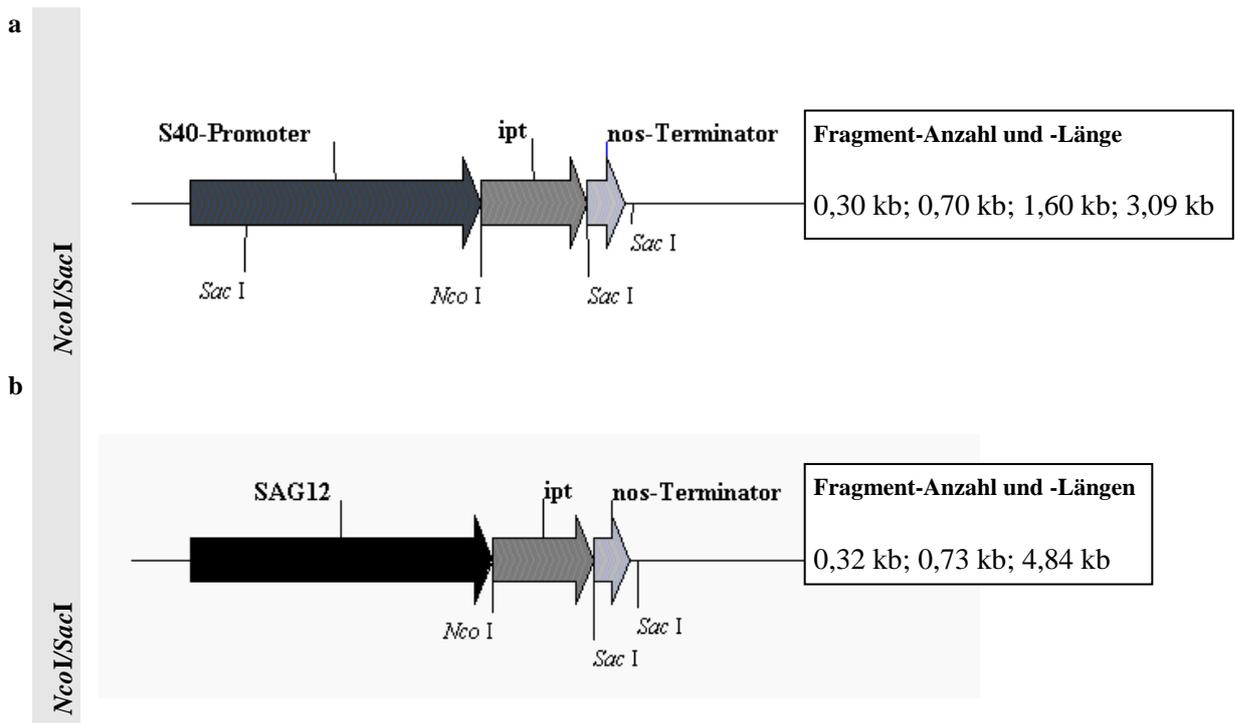


Abb. 14: Restriktionanalyse der beiden Plasmide. a-b: Gezeigt sind Ausschnitte aus Restriktionskarten der Konstrukte pS40-IPT und pSG516. Die erwarteten Fragmente und ihre Größe sind im Kasten aufgeführt.

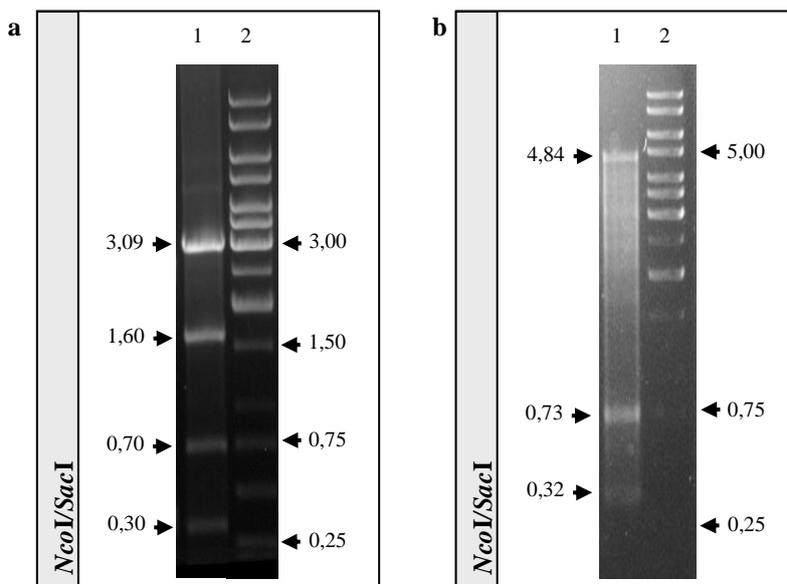


Abb. 15: Restriktionanalyse: Elektropherogramme der Restriktionsansätze, Bahn 1 in a) pS40-IPT und in b) pSG516, beide geschnitten mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI/SacI*. Die entsprechende Fragmentlänge in kb ist jeweils links des Gelstreifens angezeigt. Als Standard ist jeweils auf Bahn 2 (a, b) eine GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) aufgetragen.

# ERGEBNISSE

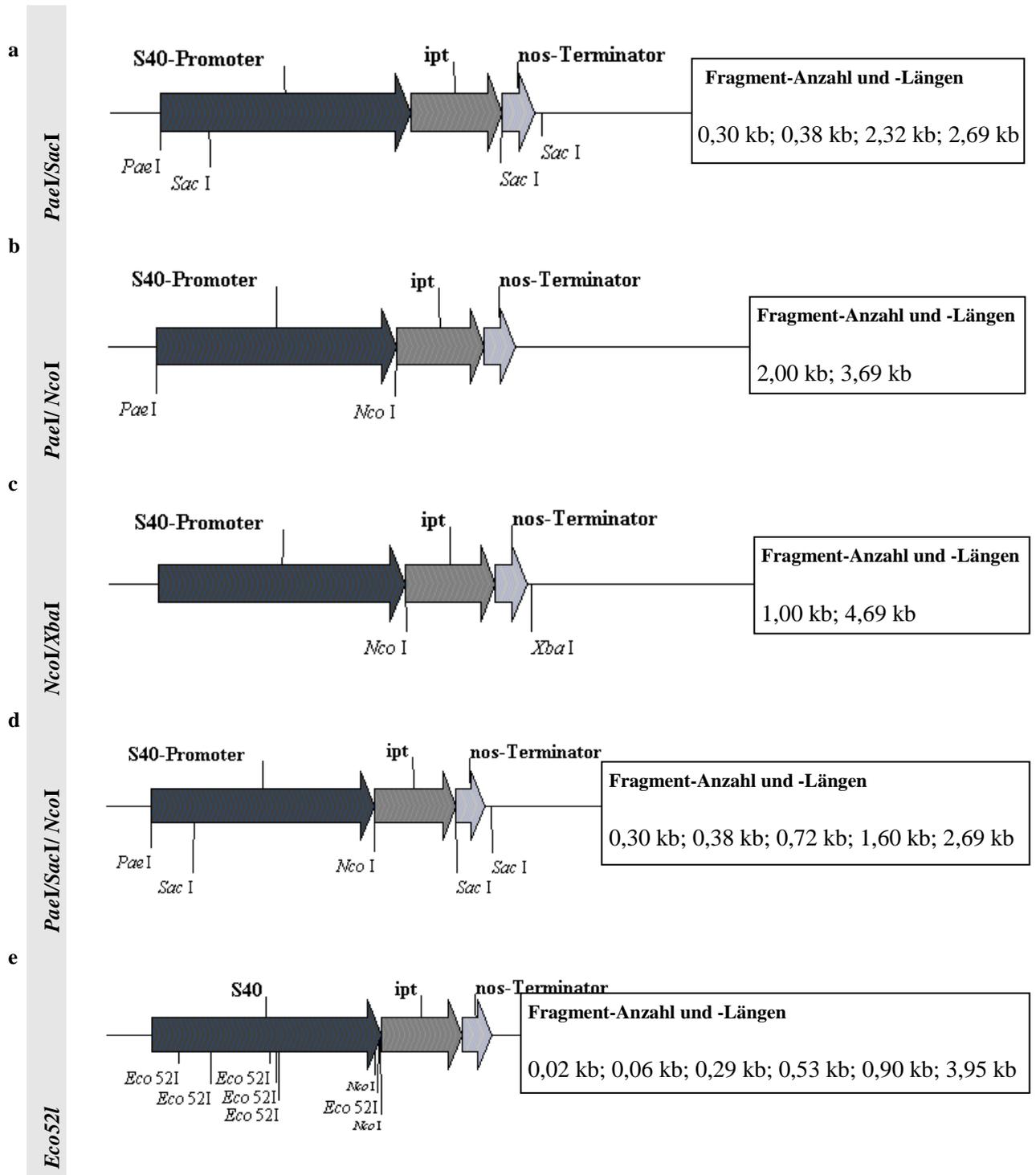


Abb. 16: Restriktionskarten der konstruierten Plasmide. a-e: Gezeigt sind Ausschnitte aus dem Plasmid pS40-IPT. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sowie die erwarteten Fragmentgrößen sind jeweils im Kasten angegeben.

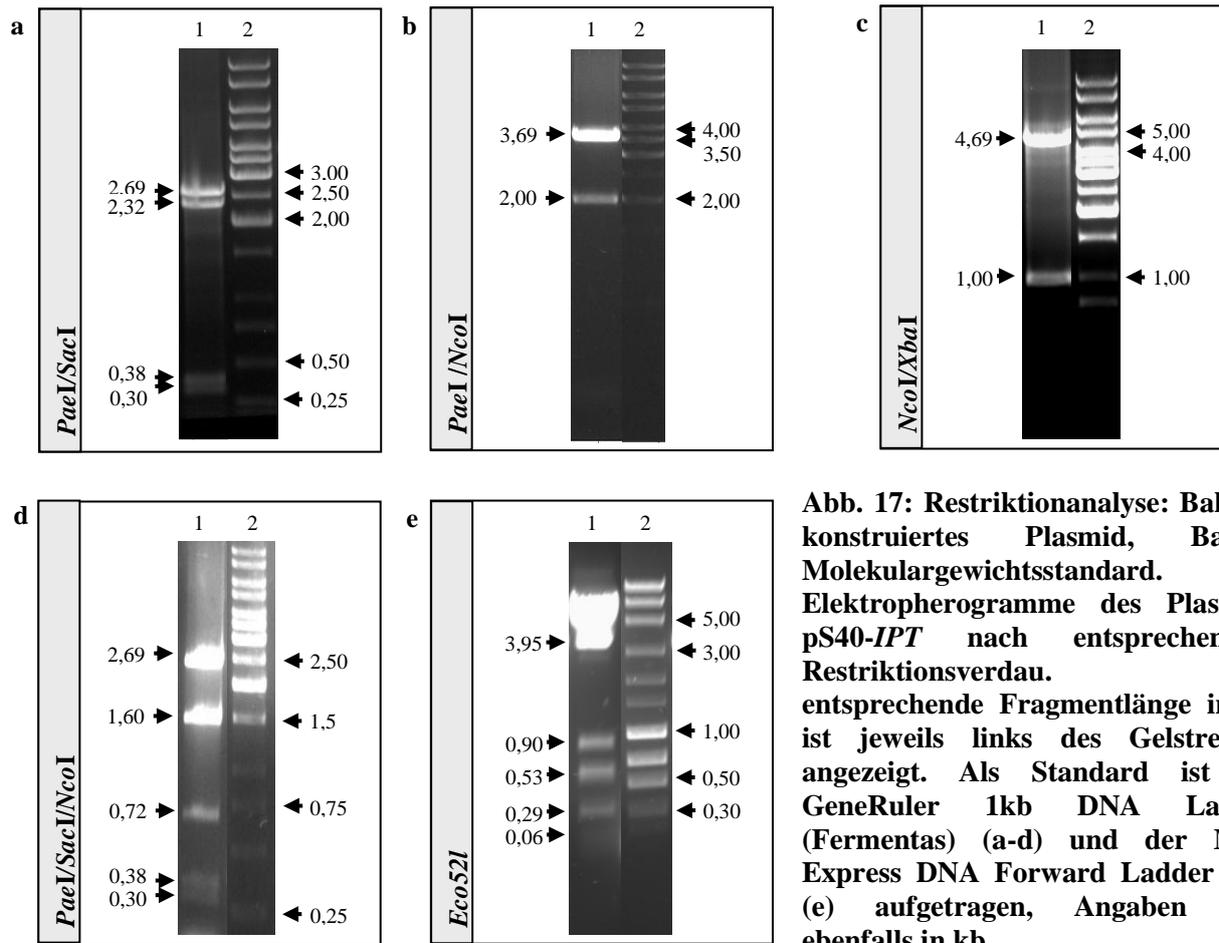


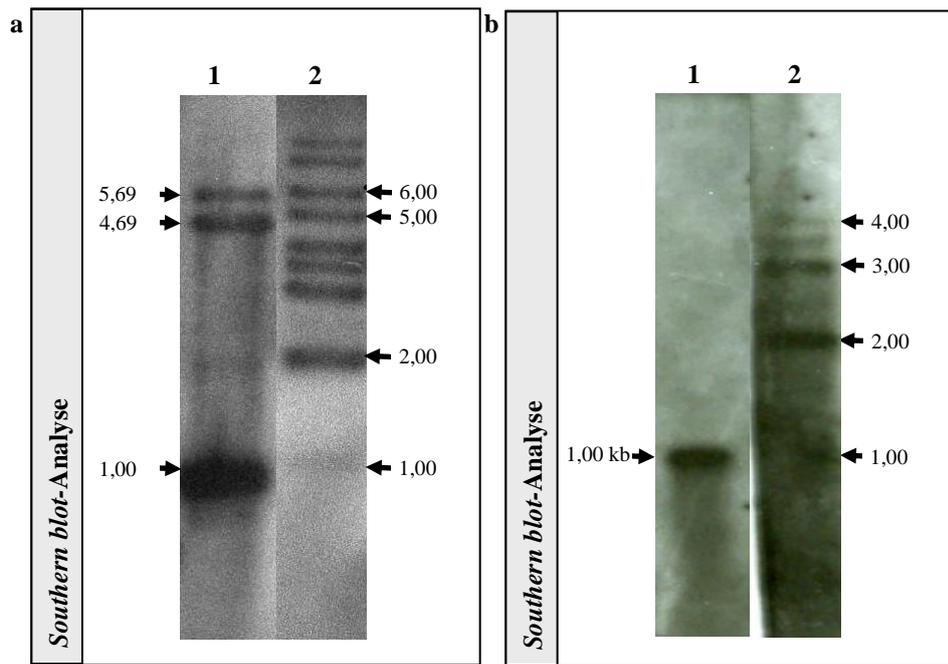
Abb. 17: Restriktionanalyse: Bahn 1, konstruiertes Plasmid, Bahn2. Molekulargewichtsstandard. a-e: Elektropherogramme des Plasmids pS40-IPT nach entsprechendem Restriktionsverdau. Die entsprechende Fragmentlänge in kb ist jeweils links des Gelstreifens angezeigt. Als Standard ist die GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) (a-d) und der Mass Express DNA Forward Ladder Mix (e) aufgetragen, Angaben sind ebenfalls in kb.

### 3.5.3 Überprüfung des Konstrukts mittels *Southern Blot*-Analyse

Um die Richtigkeit der konstruierten Plasmide zu überprüfen, wurden sie *Southern blot*-Analysen unterzogen (Abb. 18). Hierzu wurde spezifische, Biotin-11-dUTP-markierte *ipt*-Sonde-DNA eingesetzt. Tabelle 17 gibt eine Übersicht über die verwendete Sonde, Restriktionsenzyme und die zu erwartenden Fragmentlängen nach spezifischer Hybridisierung (Abb. 16c).

Tab. 17: Übersicht über die *Southern blot*-Analysen der neukonstruierten pS40-IPT und pSG516 Plasmide.

Plasmide	Restriktionenzyme	Sonde	erwartetes Signal bei Fragmentlänge <sup>1</sup>
pS40-IPT	<i>NcoI</i> / <i>XbaI</i>	<i>S-ipt</i>	1 kb
pSG516			



**Abb. 18: Southern blot-Analysen des neukonstruierten Plasmids (pS40-IPT) (a) und pSG516 (b) auf Anwesenheit des *ipt*-Gens. Autoradiogramm nach Hybridisierung gegen die Biotin-11-dUTP-markierte *ipt*-Sonde. Beide Plasmide wurden mit *NcoI* und *XbaI* verdaut. Bahn 2, GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas), Molekulargewichtsangabe jeweils in kb.**

### 3.6 VERSUCHE ZUR TRANSFORMATION VON *TRITICUM AESTIVUM* L

#### 3.6.1 Transfer des *uidA*-Reportergens

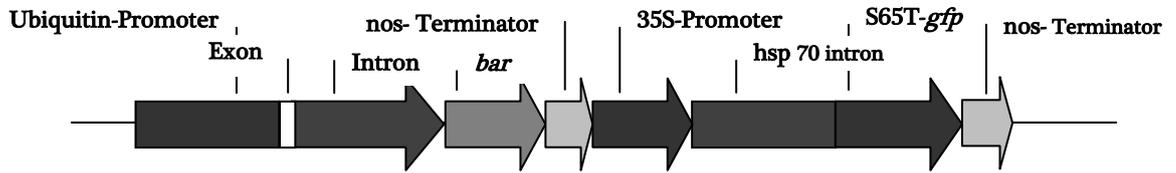
Zunächst wurde die Funktionsfähigkeit beider Promotoren in Weizen mit Hilfe des Reportergens (*uidA*-Gen) geprüft (Krupsinska *et al.*, 2002, Gan and Amasino 1995)

##### 3.6.1.1 Die transiente Expression des *uidA*-Gens in pS40-GUS

Die Plasmide pS40-GUS (Krupsinska *et al.*, 2002) und pGFPBAR (Huber, 2002) (Abb. 19) wurden zur Cotransformation durch Partikelbeschuss verschiedener Organe wie Blätter, Stängel, Wurzeln und Körner, jeweils in verschiedenen Entwicklungsstadien verwendet. Zur Kontrolle wurden auch Blätter und Körner von Gerste in verschiedenen Entwicklungsstadien eingesetzt.

Nach dem Beschuss wurde der Erfolg der Transformation über die Expression des *gfp*-Gens geprüft. Eine transiente Expression des *gfp*-Gens wurde ab 16 h nach dem Partikelbeschuss festgestellt. Die Hälfte der beschossenen Organe wurde, wie in 2.2.7.2.1 beschrieben, histochemisch auf GUS-Aktivität untersucht, um die Aktivität des *uidA*-Gens bewerten zu können. Die andere Hälfte wurde vor der histochemischen Untersuchung wie in 2.2.8.1 beschrieben mit Methyljasmonat zur Induktion der Seneszenz inkubiert. Die Tests erlaubten eine rasche Beurteilung darüber, ob die Fremd-DNA über den Partikelbeschuss in den Zellkern gelangt war, und wie hoch die Aktivität des Promotors war.

Weder bei Weizen noch Gerste konnte in einer der Proben GUS-Färbung beobachtet werden, obwohl die transiente Expression des *gfp*-Gens außer bei altem Gewebe immer positiv war.



**Abb. 19: Das Plasmid pGFPBAR.; Exon, Intron des Ubiquitin-1-Gen; bar: bar-Gen; 35S: *CaMV35S*; hsp 70 intron (Hitzeschockprotein aus *Zea mays*); S65T-*gfp*: Synthetischen *gfp*-Gen mit dem Intron des ST-LS1-Gen aus *Solanum tuberosum*, nos-Terminator: Termination des Nopalinsynthasegens**

### 3.6.1.2 Transfer des Konstrukts pS40-GUS in die Weizensorten Klein Brujo

Da die sehr geringen Transformationseffizienzen noch immer ein zentrales Problem der Gentechnik an Weizen sind, sollte das Transformations- und Regenerationssystem weiter optimiert werden.

Die fünf folgenden Parameter wurden berücksichtigt: Die Variation der Medien, der Kallusinduktionsanfang, der Beschussdruck, der Goldpartikel-Durchmesser und der Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter. Die o. g. Faktoren ergaben 36 verschiedene Varianten des Transformationsansatzes (Tab. 6). Scutellarkallus wurde auf dem R1-Medium regeneriert.

Bei den drei verwendeten Medien waren die Scutellarkallus-Induktionsrate und die Regenerationsrate bei den meisten Transformationsvarianten niedriger als bei den nicht beschossenen unreifen Embryonen (s. 3.3.1 bzw. 3.3.4). Die Transformationsansätze 21 bis 24 mit M3-Medium sowie 33 bis 36 mit M9-Medium ergaben sowohl die höchste Scutellarkallus-Induktionsrate, als auch die beste Regenerationsrate bzw. die beste Kultureffizienz. Es gab einen positiven Effekt auf diese drei Parameter bei beiden MS-Medien vom gestiegenen Kallusinduktionsanfang (Vorkultur) und 9 cm als Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter.

Die höchsten Transformationseffizienzen bei Verwendung der drei Medien waren: 1,9 % bei L3-5; 10 % bei M3-Medium sowie 4,8 % bei M9-Medium (Tab. 18).

Die Pflanzen, die die Selektion durch PPT (Phosphinothricin) überlebt hatten, wurden in Erde unter Gewächshausbedingungen überführt. Die Mehrzahl der in Erde gewachsenen Pflanzen

ERGEBNISSE

zeigte jedoch keine *gfp*-Expression. Von 37 Transformanten waren 28 (75,7 %) *gfp*-negativ (Tab. 18) aber ihre PCR-Analyse des *uidA*-Gens war positiv.

**Tab. 18: Übersicht über Transformationsvarianten von Sommerweizen cv Klein Brujo mit pS40-GUS und pGFPBAR. Jeweils zwei Transformationsvarianten gehören zum gleichen Kallusinduktionsanfang**

Medium / Transformations-variante	Anzahl beschossener Embryonen	Scutellarkallus-Induktionsrate (%)	Regenerationsrate (%)	Kultur-effizienz (%)	Pflanzen in Erde		Transformations-effizienz (%)	Anzahl beschossener Embryonen / Transformanten
					GFP negativ	GFP positiv		
1	87	31,2	32,0	10,0	0	0	0	0
2	155	31,6	28,6	9,0	0	0	0	0
3	87	50,6	11,4	5,8	0	0	0	0
4	116	65,6	18,4	12,1	0	0	0	0
5	186	40,3	12,0	4,8	0	0	0	0
6	76	71,1	0	0,0	0	0	0	0
7	78	59,0	21,7	12,8	0	0	0	0
8	104	76,0	25,3	19,2	2	0	1,9	52
9	91	39,6	19,4	7,7	0	0	0	0
10	117	59,0	0	0,0	0	0	0	0
11	71	29,6	14,3	4,2	0	0	0	0
12	74	35,1	0	0,0	0	0	0	0
Mittelwert ± SD	-	49,1 ± 16,6	15,3 ± 11,1	7,1 ± 5,9	-	-	-	-
Insgesamt	1242	-	-	-	2	0	-	-
13	71	24,0	29,4	7,1	0	0	0	0
14	76	43,0	0	0,0	0	0	0	0
15	118	21,0	40,0	8,4	0	0	0	0
16	120	26,0	6,3	1,6	0	0	0	0
17	209	33,5	28,6	9,6	0	0	0	0
18	98	45,9	17,8	8,2	0	1	1,0	98
19	87	72,4	50,8	36,8	0	1	1,1	87
20	102	72,6	21,6	15,7	0	0	0	0
21	168	69,6	57,3	39,9	1	3	2,4	42
22	150	92,7	75,3	69,8	15	0	10	10
23	99	79,8	53,2	42,5	0	0	0	0
24	160	98,8	50,6	50,0	2	0	1,2	80
Mittelwert ± SD	-	56,6 ± 27,6	35,9 ± 22,5	24,1 ± 22,7	-	-	1,8 ± 4,4	-
Insgesamt	1458	-	-	-	18	5	-	-

## ERGEBNISSE

	25	74	19,0	50,0	9,5	0	0	0	0
	26	82	57,0	38,3	21,8	0	0	0	0
	27	114	36,0	34,1	12,3	0	0	0	0
	28	112	31,0	28,6	8,9	0	0	0	0
	29	178	49,4	39,8	19,7	0	0	0	0
M 9	30	123	63,4	46,2	29,3	0	1	0,8	123
	31	151	61,6	57,0	35,1	0	1	0,7	151
	32	80	91,3	48,0	43,8	0	0	0	0
	33	131	76,3	64,0	48,8	1	2	2,3	44
	34	134	85,8	77,4	66,4	2	0	1,5	67
	35	105	84,8	79,8	67,7	5	0	4,8	21
	36	76	89,5	82,4	73,7	0	0	0	0
Mittelwert ± SD	-	-	62,1 ± 24,5	53,8 ± 18,4	36,4 ± 23,5	-	-	0,8 ± 1,5	-
Insgesamt	1360	-	-	-	-	8	4	-	-

Drei Transformanten der Sommerweizenvarietät „Brujo“ (R1, S1, T1) wurden weiter gezogen; sie stammten aus drei verschiedenen Transformationsansätzen (Tab. 19) (Abb. 20). Alle drei zeigten GFP-Fluoreszenz.

**Tab. 19: Überblick über die drei Transformanten**

Pflanzen	Medium	Transformationsvariante	GFP-Fluoreszenz	PCR-Analyse für <i>uidA</i> -Gen
<b>R1</b>	M 3	21	+	+
<b>T1</b>	M 9	31	+	+
<b>S1</b>	M 9	33	+	+

### 3.6.1.3 Histochemische und Fluoreszenz-Analyse von *HvS40*-GUS-Pflanzen

Um das Verhalten des Gerstenpromotors *HvS40* im heterologen System Weizen bei Seneszenz-induzierenden Bedingungen (Dähnhardt, 2003) wie Dunkelheit, Abscisinsäure-Applikation und Verwundung (wie in 2.2.7.3 beschrieben) zu untersuchen, wurden junge Blätter den drei T<sub>0</sub>- und Kontrollpflanzen entnommen und den jeweiligen Versuchs- bzw. Kontrollbedingungen

unterworfen. Anschließend wurden die Blätter histochemisch auf GUS-Aktivität untersucht (Tab. 20).

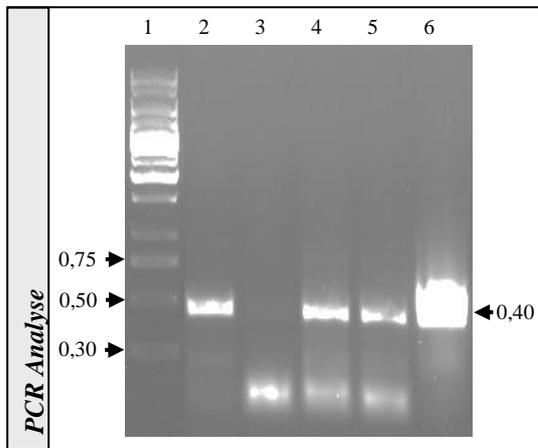


Abb. 20: Elektropherogramm zur PCR Analyse der T<sub>0</sub>-Pflanzen bezüglich des *uidA*-Gens, Bahn 1 GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas), Bahn 2 R1, Bahn 3 Wildtyp, Bahn 4 T1, Bahn 5 S1 und Bahn 6 Plasmid pS40-GUS (Positivkontrolle).

Tab. 20: Überblick über die Induktion der GUS-Färbung in Geweben junger Blätter der drei T<sub>0</sub>-Pflanzen durch Seneszenz-induzierende Bedingungen. ABA (Abscisinsäure), K. (Kontrollpflanze).

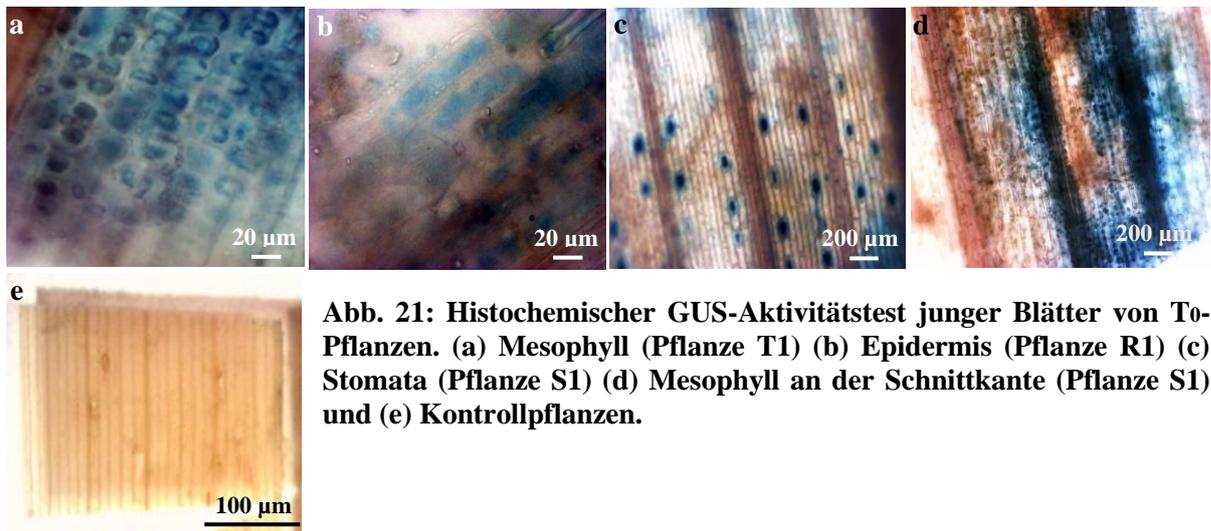
Pflanze	Externe Faktoren			Verwundung
	Dunkelheit	ABA + Dunkelheit	ABA + Licht/Dunkel (16/8 h)	
R1	Mesophyll und Epidermis.	-	-	-
S1	Mesophyll und Stomata	Mesophyll	Mesophyll und Stomata	-
T1	Mesophyll und Epidermis	Mesophyll und Stomata	-	-
K.	-	-	-	-

Außerdem wurden von den drei T<sub>0</sub>-Pflanzen voll entwickelte Blätter, Stängel, Wurzeln und Blüten (Phase 61-69 der Zadoks Skala) ohne Induktion direkt der GUS-Färbung unterzogen. Tabelle 21 zeigt die entsprechenden Ergebnisse.

Tab. 21: GUS-Färbung in reifen Organen der drei T<sub>0</sub>-Pflanzen und der Kontrolle (K).

Pflanze	Ohne Induktion		
	Voll entwickelte Blätter	Stängel	Wurzel
R1	-	-	+/-
S1	-	-	+/-
T1	-	-	+/-
K.	-	-	-

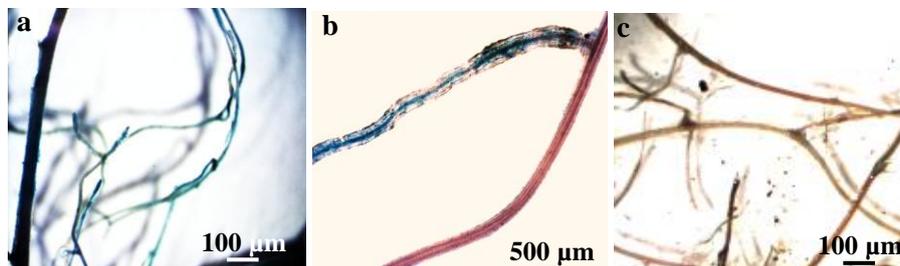
Nach Behandlung junger Blätter zeigten nur wenige Blattstücke GUS-Aktivität. Zudem war die GUS-Färbung sehr uneinheitlich aber häufig an der Schnittkante der Blätter oder in der Nähe von Infektionsherden, die in den meisten Fällen Pilz-Infektionen waren. Die gefärbten Gewebe waren Mesophyll (Abbildung 21a), Epidermis (Abbildung 21b) oder Stomata (Abbildung 21c). Die gefärbten Gewebe waren Mesophyll (Abbildung 21a), Epidermis (Abbildung 21b) oder Stomata (Abbildung 21c).



**Abb. 21: Histochemischer GUS-Aktivitätstest junger Blätter von To-Pflanzen. (a) Mesophyll (Pflanze T1) (b) Epidermis (Pflanze R1) (c) Stomata (Pflanze S1) (d) Mesophyll an der Schnittkante (Pflanze S1) und (e) Kontrollpflanzen.**

Bei diesem Ansatz zeigten, anderes als erwartet, die voll entwickelten Blätter keine GUS-Aktivität. Jedoch war eine solche in ganzen Wurzeln oder Wurzelspitzen der drei To-Pflanzen nachweisbar (Abb.22a).

Parallel dazu wurden auch junge Weizen-Blüten und Körner (Phase 59-73 der Zadoks Skala) (Tab.9) ohne Induktion der Seneszenz histochemisch untersucht (Tabelle 22).



**Abb. 22: Histochemischer GUS-Aktivitätstest der Wurzeln von einer To-Pflanze ohne Induktion. (a-b) Pflanze R1 und (c) Kontrollpflanzen.**

Tab. 22: Überblick über die GUS-Färbung verschiedener Blütenteile der drei Transformanten sowie der Kontrollpflanze (K) n.u.: nicht untersucht.

Pflanze	Ohne Induktion						Spelzen	
	Fruchtknoten	Eizelle	Staubbeutel	Staubfaden	Pollen	Deckspelzen	Vorspelzen	
						-	-	
R1	+	-	-	+	-	+	+	
S1	+	-	+	+	+/-	+	+	
T1	+	n. u.	+	+	+/-	+	+	
K.	-	-	-	-	-	-	-	

Die Fruchtknoten (Abb. 23a, 23b und 23g), Filamente (Abb. 23b, 23c und 23d), Deckspelzen und Vorspelzen (Abb. 23a, und 23h) zeigten starke GUS-Aktivität in allen drei To-Pflanzen. Pollen war bei R1 (Abb. 23b) negativ, bei S1 und T1 dagegen zur Hälfte positiv. Dies wurde als Ausdruck der Hemizygotie gewertet (Abb. 23f). Entsprechend wiesen die jungen Staubbeutel von R1 keine GUS-Färbung (Abb. 23a-b) auf. Hingegen waren die alten von S1 und T1 (Abb. 23c-d) deutlich positiv. Die Staubbeutel der Kontroll-Pflanzen wiesen keine GUS-Färbung (Abb. 23i) auf. In der Abbildung 23e kann man starke GUS-Aktivität auch im unreifen Korn erkennen.

In keiner der drei To-Pflanzen konnte eine nennenswerte GUS-Aktivität in den Blättern nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stimmen somit mit den GUS-Färbungen der voll entwickelten Blätter überein, die auch negativ waren (Tab. 23).

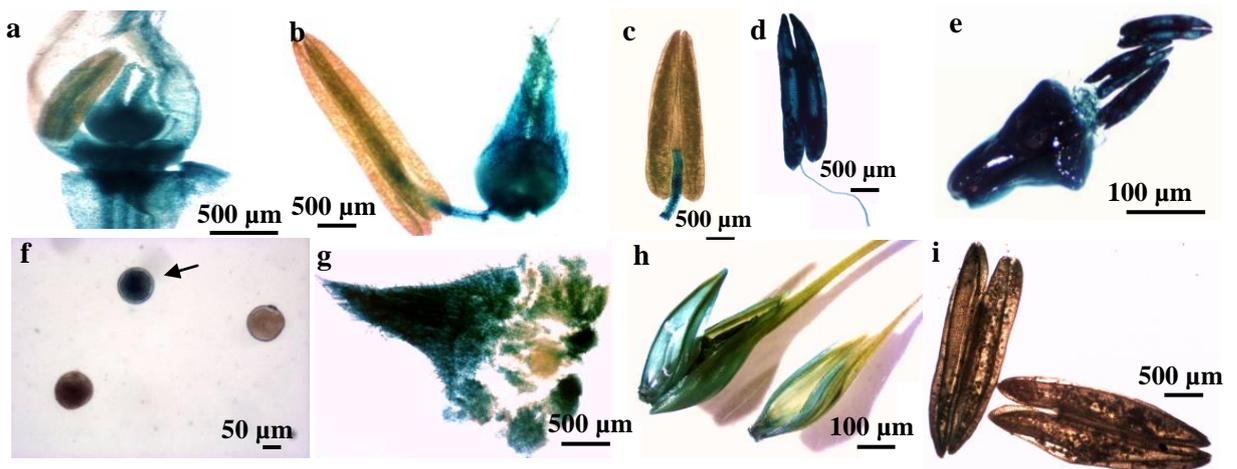


Abb. 23: Histochemischer GUS-Aktivitätstest der Blütenteile von To-Pflanzen. (a-c) Pflanze R1, (d-h) Pflanze S1, und (i) Kontrollpflanzen. a) und b) junge Blüte, c) Staubbeutel, d) Staubbeutel, e) junge Körner und Staubbeutel, f) Pollen, der Pfeil zeigt GUS-Aktivität, g) Fruchtknoten, h) Deckspelzen und Vorspelzen und i) Staubbeutel von Kontrolle Pflanze ohne GUS-Aktivität.

**Tab. 23: Ergebnisse des fluorometrischen GUS-Tests von voll entwickelten Blättern der drei Transformanten, (K, Kontrollpflanze) und von Tabak pSG506**

Pflanze	GUS -Fluoreszenz (pMol MU min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ± σ)
R1	0,05± 0,15
S1	0,00
T1	0,03± 0,02
K.	0,00
Tabak pSG506	571520± 4341

#### 3.6.1.4 Die transiente Expression des *uidA*-Gens in pSG506

Der *SAG12*-Promotor aus *Arabidopsis thaliana* zeigte Funktionsfähigkeit in verschiedenen Pflanzengruppen, darunter in den einkeimblättrigen Pflanzen Reis (Lin *et al.* 2002), Mais (Young, 2004) und Weizen (Sykorova *et al.*, 2008). Zu Beginn dieser Arbeit gab es für Weizen jedoch noch keine Hinweise auf seine Funktionsfähigkeit.

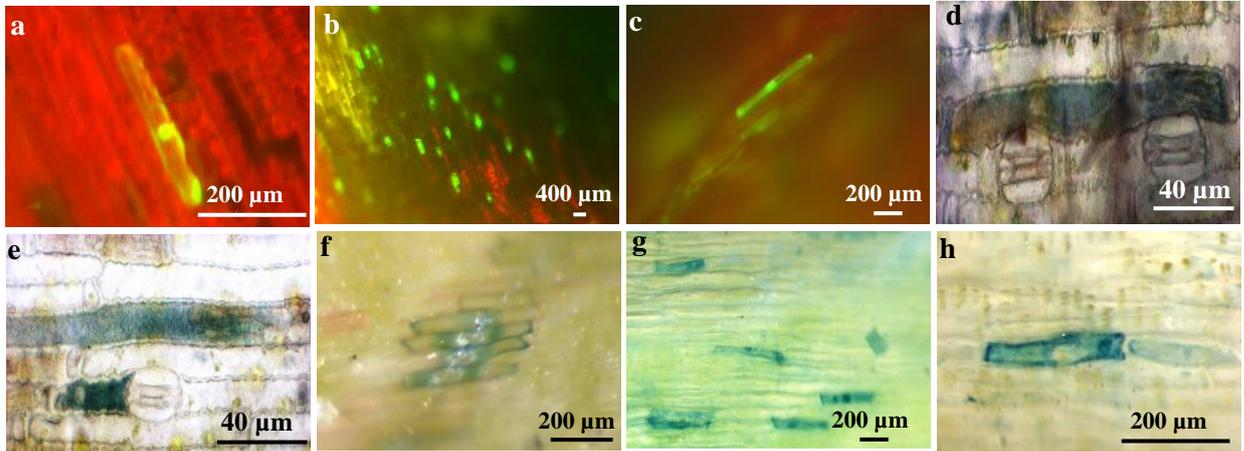
In der vorliegenden Arbeit wurden Weizenpflanzen mit den Plasmiden pSG506 (Gan und Amasino, 1995) und pGFPBAR (Huber, 2002) biolistisch cotransformiert. Die transiente Expression wurde in Blättern und Körnern in drei Altersstadien („jung, adult, alt bzw. reif“) von Wildtyp-Pflanzen untersucht. Zunächst wurde der Erfolg der Transformation 16 h nach dem Beschuss anhand der GFP-Fluoreszenz geprüft, danach wurden die beschossenen Organe wie in 2.2.7.2.1 beschrieben histochemisch auf GUS-Aktivität untersucht, um eine Aussage über die Aktivität des *uidA*-Gens treffen zu können (Tabelle 24)

**Tab. 24: Transiente *gfp*-Expression (pGFPBAR) und GUS-Aktivität (pSG506) in Blättern und Körnern des Weizens(Wildtyp), Sorte Klein Brujo.**

Transiente Expression	Junge Blätter	Adulte Blätter	Alte Blätter	Junge Körner	Reifende Körner	Alte Körner
GFP	+	+	-	+	+	-
GUS	-	-	+	+	+	+

Zellen mit transienter *gfp*-Expression zeigten sich in der Epidermis von jungen (Abb. 24a) und adulten Blättern, nicht aber in alten Blättern. Entsprechend dem Seneszenz-aktiven Promoter zeigte sich GUS-Aktivität dagegen nicht in der Epidermis junger und adulter Blätter, sondern nur in der Epidermis alter Blätter (Abb. 24d-e). Der gleiche altersabhängige Unterschied in der *gfp*-

Expression zeigte sich bei den Weizenkörnern (Abb. 24b und c). *Gus*-Expression war dagegen in allen drei Stadien der Körner (Abb. 24f-h) zu beobachten (Tabelle 24). Damit war die Funktionalität des Seneszenz-spezifischen *SAG12*-Promotors zumindest in der Epidermis der Weizenblätter nachgewiesen.



**Abb. 24: Transiente *gfp*-Expression: (a) Epidermis junges Blatt und Fruchtschale eines (b) jungen und (c) eines Kornes mittleren Alters. Transiente *uidA*-Expression: (d-e) Epidermis eines alten Blattes und (f) Fruchtschale eines jungen, (g) reifen und (h) alten Kornes.**

### 3.6.1.5 Transfer des Konstrukts pSG506 in die Weizensorten Klein Brujo

Hier wurde die Gewebekulturstrategie (Kap. 2.2.1.4.7) angewandt. Die Untersuchung der sechs Transformationsvarianten (Tab. 7) wurde an insgesamt 1814 unreifen Embryonen (Tabelle 25) durchgeführt. Das Regenerationsmedium war WH. Bei den zwei verwendeten Medien waren die Scutellarkallus-Induktionsrate und die Regenerationsrate bei den Transformationsvarianten niedriger als bei den nicht beschossenen unreifen Embryonen (s. 3.4.1 bzw. 3.4.4). Die Scutellarkallus-Induktionsrate war am höchsten bei den Transformationsvarianten 1 (83,4 %) mit M3-Medium und 4 (83,3 %) mit M9-Medium, und am niedrigsten bei den Transformationsvarianten 5 (61,1 %) mit M9-Medium und 3 (66,1 %) mit M3-Medium. Die Bedingungen der Transformationsvarianten 1 und 4 waren fast gleich, der einzige Unterschied lag im (M3-) Medium bei der Transformationsvariante 1 und im (M9-) Medium bei Transformationsvariante 4, was jedoch bei der Scutellarkallus-Induktionsrate kaum eine Rolle spielte. Der Abstand von 6 cm zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter erbrachte das beste Ergebnis.

Die Regenerationsrate sowie die Kultureffizienz waren bei der Transformationsvariante 1 (61,8 %; 51,5 %) mit M3-Medium und 2 (50,9 %; 40,7 %) ebenfalls mit M3-Medium am höchsten. Dies trifft auch auf die Ausbeute an Pflanzen in Erdkultur zu (sieben bzw. sechs) (Tabelle 25).

## ERGEBNISSE

Die höchste Transformationseffizienz mit 4,0 % wurde bei der Transformationsvariante 1 beim M3-Medium erreicht (Tab. 25).

**Tab. 25: Übersicht über Transformationsversuche von Sommerweizen cv Klein Brujo mit pSG506 und pGFPBAR.**

Medium / Transformations-variante	Anzahl beschossener Embryonen	Scutellarkallus-Induktionsrate (%)	Regenerationsrate (%)	Kultur-effizienz (%)	Pflanzen in Erde		Transformations-effizienz (%)	Anzahl beschossener Embryonen / Transformanten	
					GFP negativ	GFP positiv			
M 3	1	83,4	61,8	51,5	1	6	4,0	25	
	2	79,9	50,9	40,7	2	4	3,9	26	
	3	374	66,1	48,4	32,0	1	0	0,3	374
Mittelwert ± SD		-	76,5 ± 9,1	53,7 ± 7,1	41,4 ± 4,8	-	-	2,7 ± 2,1	-
Insgesamt		701	-	-	-	4	10	-	-
M 9	4	83,3	41,3	34,4	0	0	0	0	
	5	816	61,1	45,9	28,0	0	0	0	
	6	70	70,0	36,7	25,7	0	1	1,4	70
Mittelwert ± SD		-	71,5 ± 11,2	41,3 ± 4,6	29,4 ± 4,5	-	-	0,5 ± 0,8	-
Insgesamt		1113	-	-	-	0	1	-	-

Von den Transformanten der Sommerweizenvarietät Klein Brujo konnten 15 Pflanzen erhalten werden: Sieben mit dem Transformationsprotokoll 1 und M3-Medium (71, 96, 100, 150, 322, 458 und 510), sechs mit dem Protokoll 2 und M3-Medium (75, 97, 165, 165, 206 und 308), eine mit dem Protokoll 3 und M3-Medium (1008) und eine mit dem Transformationsprotokoll 6 und M9-Medium (65) (Tab. 26). Nur vier (27 %) davon zeigten während der letzten Phase der *ex vitro* Kultur keine *gfp*-Expression, aber sie besaßen PPT-Resistenz und der PCR-Nachweis für das *uidA*-Gen war positiv.

Die Pflanzen 308, 322 und 510 gehörten zur Gruppe B, die wie die übrigen der Gruppe B die ursprüngliche GFP-Fluoreszenz verloren hatten. Im Gewächshaus wurden sie mit PPT-Lösung behandelt und überlebten dennoch. Alle Pflanzen waren phänotypisch normal, jedoch waren die Ähren der beiden Pflanzen 206 und 1008 z.T. steril. Nicht alle Blüten entwickelten sich zu Körnern.

ERGEBNISSE

Tab. 26: Überblick über die fünfzehn Transformanten der cv. Klein Brujo. Die PCR-Analyse wurde mindestens drei Mal pro Pflanze durchgeführt, aber sechs Mal, wenn die Analyse negativ war. n.u. (nicht untersucht).

Pflanzen	Transformationsstrategien	GFP-Fluoreszenz in Erdkultur	PCR-Analyse für <i>uidA</i> -Gen	Gruppe
65	6	+	+	A
71	1	-	+	B
75	2	+	+	A
96	1	+	n.u.	A
97	2	-	+	C
100	1	+	+	A
150	1	+	n.u.	A
165	2	+	+	A
174	2	-	n.u.	C
206	2	+	n.u.	A
308	2	+	+	B
322	1	+	n.u.	B
458	1	+	+	A
510	1	+	+	B
1008	3	-	+	C

Die PCR-Analyse von Blättern wurde nur bei zehn Transformanten (Tab. 26) durchgeführt und ergab bei allen einen positiven Nachweis des *uidA*-Gens (Abbildung 25).

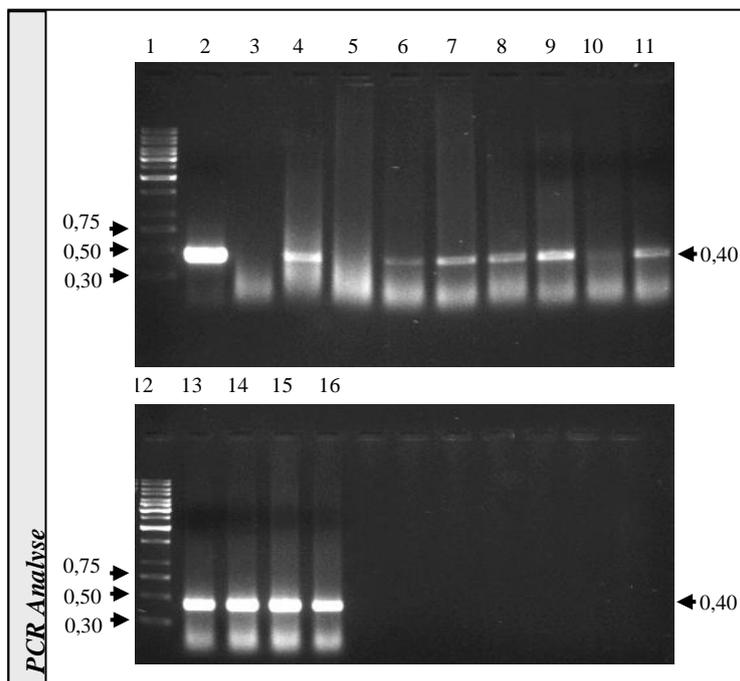


Abb. 25: Elektropherogramm zur PCR Analyse der T<sub>0</sub>-Pflanzen bezüglich des *uidA*-Gens, Bahn 1 und 12: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas), Bahn 2: Plasmid pSG506 (Positivkontrolle), Bahn 3: ohne Plasmid, Bahn 4: Tabak pSG506, Bahn 5: Wildtyp, Bahn 6 bis 11: 97, 100, 174, 308, 1008 und 458 und Bahn 13 bis 16: 65, 71, 75 und 510

### 3.6.1.6 Histochemische und fluorometrische Analyse von pSG506-Pflanzen

Zum Nachweis der Expression des *uidA*-Gens unter der Kontrolle des *SAG12*-Promotors wurden voll entwickelte bzw. seneszierende Blätter der 15 Transformanten, sowie Wurzeln, Blüten und Pollen von drei Transformaten auf GUS-Aktivität untersucht (wie in 2.2.7.2.1 beschrieben). In keinem der Fälle zeigte sich GUS-Färbung. Das gleiche negative Resultat ergab der fluorometrische GUS-Test, der beim transgenen Tabak als Positivkontrolle eine starke Aktivität anzeigte.

### 3.6.2 **Transfer des Seneszenz-verzögernden Konstrukts pS40-IPT in die Weizensorten Klein Brujo und Bobwhite**

Zunächst wurde die Nutzgencassette (s. 3.4.1) in Weizen übertragen, um Wachstum und Ertrag durch Verzögerung der Seneszenz zu verbessern. Diese Nutzgencassette war bisher noch nicht zur genetischen Transformation von Getreide eingesetzt worden.

Hier wurden die Gewebekulturstrategie (s. 2.2.1.4.7) und die 24 Transformationsvarianten (Tab. 8) beachtet. Scutellarkallus wurde auf WH-Medium regeneriert.

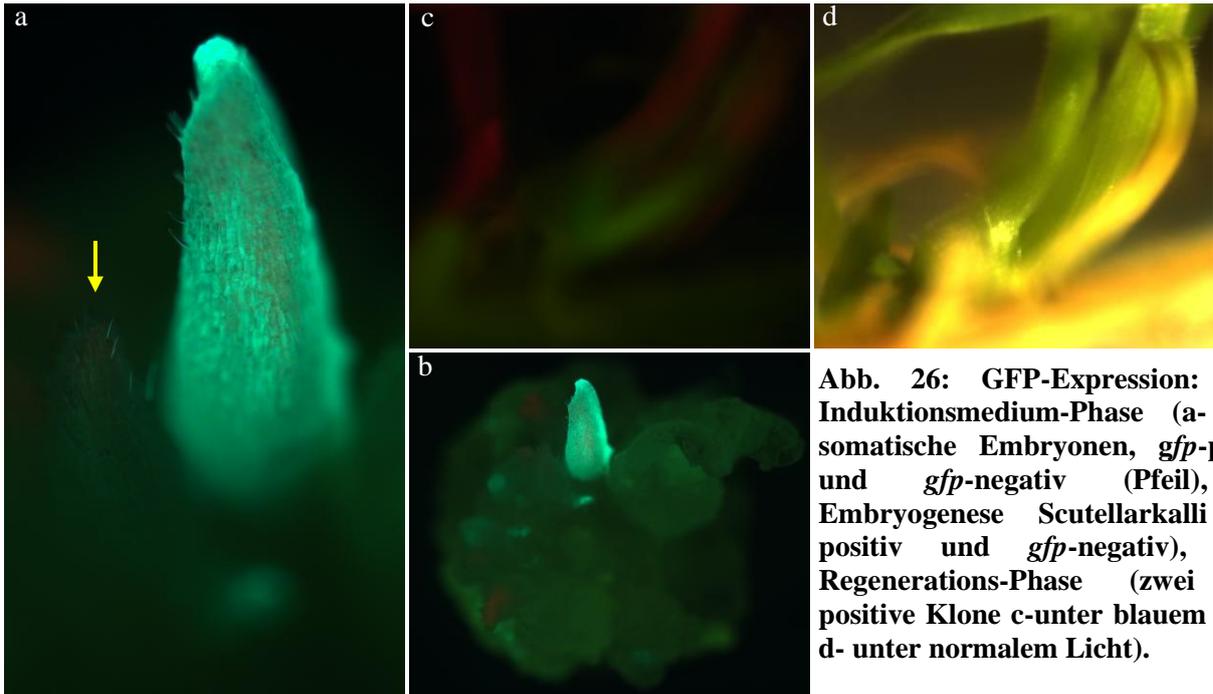
#### 3.6.2.1 Transformation der Sorte Klein Brujo

Zum Gentransfer in die argentinische Sommerweizenvarietät Klein Brujo sollten Scutellen unreifer Embryonen für den Partikelbeschuss verwendet werden.

Es wurden 2073 unreife Embryonen beschossen, deren Scutellarkallusbildung und anschließende Regeneration getestet wurden (Abb. 26 und Tabelle 27). Die Scutellarkallus-Induktionsrate und die Regenerationsrate waren niedriger als bei den unbeschossenen unreifen Embryonen (s. 3.3.1 und S. 3.3.4). Die Transformationsvariante 18 unter Verwendung von Medium M3, hatte die höchste Scutellarkallus-Induktionsrate (86,1 %), gefolgt von den Transformationsvariante 3 (78,5 %) und 15 (73,1 %). Die Regenerationsraten waren bei den Transformationsvarianten 11, 13 und 19 mit Werten von 77,8 %; 75,8 % und 73,7 % am höchsten. Die Transformationsvariante 3 (13,7 %) und 8 (9,7 %) hatten sehr niedrige Regenerationsraten und bei den Transformationsvariante 9 und 22 gab es überhaupt keine Regenerate. Die übrigen Ansätze hatten Regenerationsraten zwischen 26,3 % und 67,7 % (Tabelle 27). Die Transformationsvarianten 1, 2, 13 und 14 mit 7, 10, 6 und 8 transgenen Pflanzen waren am erfolgreichsten, obwohl sie (außer der Variante 13) nicht die höchsten Scutellarkallusinduktionsraten oder Regenerationsraten, aufwiesen (Tab. 27). Zwischen den Transformationsvarianten 1 und 13 bzw. 2 und 14 war der Beschussdruck (Tab. 8) der einzige Unterschied. Sowohl die Regenerationsrate-, als auch Kultureffizienz sowie der

Transformationeffizienz-Mittelwert waren bei den Transformationsvarianten 13-15 höher als bei den Transformationsvarianten 1-3 (Tab. 27). Folglich schien der Beschußdruck von 1350 psi weniger schädlich als 900 psi zu sein.

Das beste Resultat war eine (1) Transformante pro zwölf beschossene embryogene Scutellarkalli. Das entspricht einer Transformationseffizienz von 8,4 % bei der Transformationsvariante 2



**Abb. 26: GFP-Expression:** (a-b) Induktionsmedium-Phase (a- zwei somatische Embryonen, *gfp*-positiv und *gfp*-negativ (Pfeil), b- Embryogenese Scutellarkalli *gfp*-positiv und *gfp*-negativ), (c-d), Regenerations-Phase (zwei *gfp*-positive Klone c-unter blauem Licht, d- unter normalem Licht).

sowie 8,6 % bei der Transformationsvariante 13. (Tab. 27). 75 % der M3-Transformationsvarianten wuchsen zu transgenen Pflanzen heran, hingegen nur 42 % bei M9-Transformationsvarianten. Die bessere Leistung des M3-Mediums im Vergleich zum M9-Medium spiegelte sich in der maximal erreichten Transformationseffizienz von 8,6 % gegenüber 3,2 % wider. Der Abstand von 9 cm zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter war beim M3-Medium effektiver. Alle vier Transformationsvarianten mit diesem Abstand erzeugten transgene Pflanzen.

Von den 24 verschiedenen Transformationsvarianten konnten nur von 14 (= knapp 60 %) insgesamt 51 transgene Pflanzen erfolgreich in Erde kultiviert werden. Abbildung 27 zeigt die *gfp*-Expression in einem somatischen Embryo bei der Scutellarkallus-Induktion und in einem Spross während der Regenerationsphase der Sorte Klein Brujo.

ERGEBNISSE

**Tab. 27: Übersicht über Transformationsversuche von Sommerweizen cv Klein Brujo mit pS40-IPT und pGFPBAR.**

Medium / Transformationsvariante	Anzahl beschossener Embryonen	Scutellarkallus-Induktionsrate (%)	Regenerationsrate (%)	Kultureffizienz (%)	Pflanzen in Erde		Transformations-effizienz (%)	Anzahl beschossener Embryonen / Transformanten	
					GFP negativ	GFP positiv			
1	166	60,2 <sup>a</sup>	39,0 <sup>a</sup>	23,5 <sup>a</sup>	4	3	4,2	24	
M 3	2	119	58,0 <sup>a</sup>	47,8 <sup>a</sup>	27,7 <sup>bc</sup>	0	10	8,4	12
	3	65	78,5 <sup>b</sup>	13,7 <sup>b</sup>	10,8 <sup>bd</sup>	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD	-	65,6 ± 11,3	33,5 ± 17,7	20,7 ± 8,8	-	-	4,2 ± 4,2	-	
Insgesamt	350	-	-	-	4	13	-	-	
4	151	43,0	56,9	24,5	1	1	1,3	76	
M 3	5	95	48,4	58,7	28,4	0	1	1,1	95
	6	136	60,3	32,9	19,8	2	2	2,9	34
Mittelwert ± SD	-	50,6 ± 8,9	49,5 ± 14,4	24,2 ± 4,3	-	-	1,8 ± 1,1	-	
Insgesamt	382	-	-	-	3	4	-	-	
7	63	54,0	29,4	15,9	2	0	3,2	32	
M 9	8	99	31,3	9,7	3,0	0	0,0	0	
	9	36	58,3	0	0,0	0	0,0	0	
Mittelwert	-	47,9 ± 14,5	13,0 ± 15,0	6,3 ± 8,4	-	-	1,1 ± 1,8	-	
Insgesamt	198	-	-	-	2	0	-	-	
10	102	30,4	67,7	20,6	1	0	1,0	102	
M 9	11	72	37,5	77,8	29,2	1	1	2,8	36
	12	54	44,4	66,7	29,6	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD	-	37,4 ± 7,0	70,7 ± 6,1	26,5 ± 5,1	-	-	1,3 ± 1,4	-	
Insgesamt	228	-	-	-	2	1	-	-	
13	70	41,4	75,8	31,4	3	3	8,6	12	
M 3	14	136	55,9	36,8	20,6	5	3	5,9	17
	15	125	73,6	26,1	19,2	0	3	2,4	42
Mittelwert ± SD	-	57,0 ± 16,1	46,2 ± 26,2	23,7 ± 6,7	-	-	5,6 ± 3,1	-	
Insgesamt	331	-	-	-	8	9	-	-	
16	108	50,9	34,5	17,6	0	0	0,0	0	
M 3	17	124	56,5	41,4	23,4	1	2	2,4	41
	18	72	86,1	38,7	33,3	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD	-	64,5 ± 18,9	38,2 ± 3,5	24,8 ± 8,0	-	-	0,8 ± 1,4	-	
Insgesamt	304	-	-	-	1	2	-	-	
M 9	19	68	27,9	73,7	20,6	0	0	0,0	0

## ERGEBNISSE

	20	64	34,4	50,0	17,2	0	1	1,6	64
	21	37	32,4	50,0	16,2	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD	-	-	31,6 ± 3,3	57,9 ± 13,7	18,0 ± 2,3	-	-	0,5 ± 0,9	-
Insgesamt	169	-	-	-	-	0	1	-	-
	22	35	5,7	0	0,0	0	0	0,0	0
M 9	23	41	41,5	52,9	22,0	0	0	0,0	0
	24	35	23,6	26,3	6,2	0	1	2,9	35
Mittelwert ± SD	-	-	23,6 ± 17,9	26,4 ± 26,5	9,4 ± 11,3	-	-	1,0 ± 1,6	-
Insgesamt	111	-	-	-	-	0	1	-	-

In der Tabelle 28 wurden die Pflanzen, deren Transformationsstrategie, GFP-Fluoreszenz, PCR-Analyse und Gruppe gleich waren, in einer Zeile zusammengestellt, (z.B. B-166/ B-175.1). Sie gibt einen Überblick über die 51 transgenen Pflanzen, von denen sich einige (B-175.1, B-175.2, B-176, B-177, B-275, B-293.1, B-293.2, B-344, B-186.1, B-355 und B-339) mehrfach bestockten. Vierzehn von den 51 Transformanten gehörten zu Gruppe A, acht zu Gruppe B sowie 27 zu Gruppe C.

B-186.A und B-186.B und B-344, B-344.A und B-344.B waren Klone. Die anderen Pflanzen, die die gleiche Nummer haben, sind aus dem gleichen Scutellum entstanden, jedoch aus verschiedenen Kalli z.B.: B-175.1 und B-175.2 oder B-246.1 und B-246.2.

Die GFP-Fluoreszenz-Ergebnisse entsprachen der *gfp*-Expression in den T<sub>0</sub> Blättern während der letzten Phase in Erdkultur. 20 (39,2 %) Pflanzen von den 51 Transformanten waren *gfp*-negativ in Erdkultur. Zwei davon B-169 und B-184 gehörten zu Gruppe A und waren bei *in vitro* Kultur *gfp*-positiv. Nur B-214, B-216 und B-339 zeigten keine Anwesenheit des *ipt*-Gens nach der PCR-Analyse.

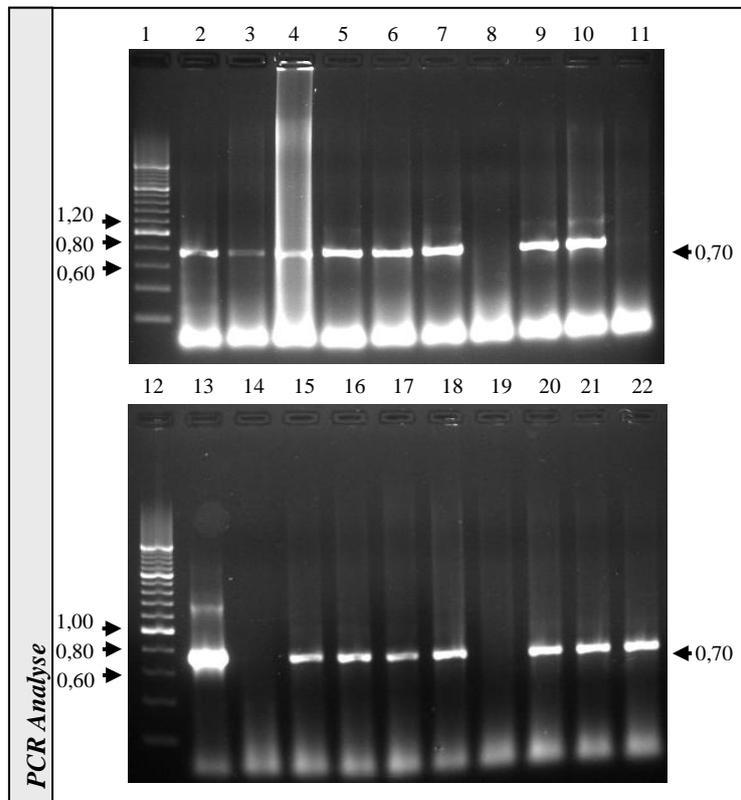
Alle Pflanzen waren phänotypisch normal, jedoch die Ähren der sechs Pflanzen (B-293.1, B-293.2; B-242; B-279, B-196, B-339) waren teilweise oder völlig steril. Die Pflanzen B-344.2, B-346.1 und B-218 waren hinsichtlich der *gfp*-Expression Chimären.

ERGEBNISSE

**Tab. 28: Überblick über die 51 Transformanten, mit dem jeweiligen Bestockungsgrad (in Klammern) während der *in vitro* Kultur. Die PCR-Analyse wurde mindestens drei Mal pro Pflanze durchgeführt, aber sechs Mal, wenn die Analyse negativ war. n.u. (nicht untersucht).**

Pflanzen (Bestockungsgrad)	Transformations- variante	GFP-Fluoreszenz in Erdkultur	PCR-Analyse für <i>ipt</i> -Gen	Gruppe
B-166 / B-175.1 (2) / B-175.2 (1) / B-178	1	-	+	C
B-176 (4) / B-177 (3) / B-275 (5)	1	+	+	A
B-153 / B-346 / B-346.1 (1)	2	+	+	B
B-277 / B-293.2 (2) / B-347	2	+	+	C
B-293.1 (3) / B-344 (3) / B-344.A / B-344.B	2	+	+	A
B-241	4	+	+	C
B-242	4	-	+	B
B-244	5	+	+	B
B-169	6	-	+	A
B-245	6	-	+	C
B-246.1 / B-246.2	6	+	+	B
B-156	7	-	+	B
B-279	7	-	+	C
B-248	10	-	+	B
B-196	11	+	+	C
B-249	11	-	+	C
B-165 / B-179	13	+	+	A
B-179.1	13	+	+	C
B-179.2 / B-179.3 / B-179.4	13	-	+	C
B-185	14	+	+	B
B-184	14	-	+	A
B-185.1 / B-187.1 / B-187.2 / B-186.B	14	-	+	C
B-186.A (2) / B-187	14	+	+	C
B-214	15	+	-	C
B-218 / B-355 (2)	15	+	+	C
B-216	17	+	-	C
B-338	17	-	+	C
B-339 (2)	17	+	-	A
B-224	20	+	+	C
B-354	24	+	+	C

Abbildung 27 zeigt nur die PCR-Analyse von Blättern der siebzehn von den 51 Transformanten. Fünfzehn Proben ergaben einen positiven Nachweis des *ipt*-Gens.



**Abb. 27:** Elektropherogramm zur PCR Analyse der T<sub>0</sub>-Pflanzen bezüglich des *ipt*-Gens, Bahn 1 und 12: O'RangeRuler 200 bp DNA Ladder (Fermentas), Bahn 13: Plasmid pS40-IPT (Positivkontrolle), Bahn 14: ohne Plasmid, Bahn 19: Wildtyp, Bahn 2 bis 7: B-166, B-175.1, B-176, B-153, B-346, und B-156, Bahn 8 und 11: B-214 und B-216, Bahn 9 und 10: B-246.1 und B-246.2, Bahn 15 bis 18: B-186.A, B-186.B, B-344 und B-344.A und Bahn 20 bis 22: B-355, B-338 und B-196.

### 3.6.2.2 Transformation der Sorte Bobwhite

Um die transiente Expression und stabile Transformation der unreifen Embryonen der Sorte Bobwhite zu untersuchen, wurden 2557 unreife Embryonen beschossen.

Ein Vorversuch ergab, dass die Scutellarkallus-Induktionsraten von unbeschossenen unreifen Embryonen jeweils 84,1 % bzw. 72,8 % bei M3- und M9-Medien betragen. Die Regenerationsraten erreichten jeweils 86,6 % bzw. 66,7 % bei Verwendung des M3- und M9-Mediums.

Die höchste Scutellarkallus-Induktionsrate hatten die Transformationsvarianten 17 (67,6 %) und 18 (67,2 %) unter Verwendung von M3-Medium. Die restlichen Werte der Scutellarkallus-Induktionsrate lagen zwischen 9,1 % und 49,4 % (Tabelle 29).

Die Transformationsvariante 11 mit 77,8 % ergab die höchste Regenerationsrate, gefolgt von den Transformationsvarianten 1 (60,7 %) und 24 (60 %). Mit 7,3 % hatte die Transformationsvariante 13 die niedrigste Regenerationshäufigkeit aus Scutellarkallus und bei der Transformationsvariante 21 ist kein Pflänzchen aus dem Kallus entstanden.

## ERGEBNISSE

Bei M3-Medium erwiesen sich drei von zwölf Transformationsvarianten als erfolgreich bzw. bei M9-Medium eine von zwölf Variante. Nur von den Transformationsvarianten 1, 16, 17 und 20 (= knapp 17 %) konnten 5 transgene Pflanzen erfolgreich in Erde übergeführt werden, deren Transformationseffizienzen 0,5 % (1), 1,3 % (16) und 1,4 % (17 und 20) erreichten. Die höchste Transformationseffizienz zeigte sich bei Verwendung von M3- und M9-Medium. Dies entsprach einer Transformante pro 71-72 beschossenen embryogenen Scutellarkalli. 40 % der Transformanten waren *gfp-negativ*.

Zwei transgene Pflanzen von fünf beschossenen wurden mit dem Goldpartikeln von 0,6 µm und einem Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter von 9 cm erhalten, sowie drei Pflanzen mit dem Abstand vom 6 cm und Goldpartikeln von 1,0 µm. Der 1350 psi Beschussdruck war bei vier Pflanzen erfolgreicher als 900 psi bei einer Pflanze. Außerdem bekamen 80 % der Transformationsvarianten mit dem M3-Medium, transgene Pflanzen, entgegen nur 20 % mit dem M9-Medium.

**Tab. 29: Übersicht über Transformationsversuche der Sommerweizensorte Bobwhite mit pS40-IPT und pGFPBAR.**

Medium / Transformations-variante	Anzahl beschossener Embryonen	Scutellarkallus-Induktionsrate (%)	Regenerations-rate (%)	Kultur-effizienz (%)	Pflanzen in Erde		Transformations-effizienz (%)	Anzahl beschossener Embryonen / Transformanten	
					GFP negativ	GFP positiv			
M 3	1	213	28,6 <sup>a</sup>	60,7 <sup>a</sup>	17,4 <sup>a</sup>	1	0	0,5	213
	2	148	33,1 <sup>a</sup>	20,4 <sup>bc</sup>	6,8 <sup>bc</sup>	0	0	0,0	0
	3	173	34,7 <sup>a</sup>	35,0 <sup>bc</sup>	12,1 <sup>ac</sup>	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD		-	32,1 ± 3,2	38,7 ± 20,4	12,1 ± 5,3	-	-	0,2 ± 0,3	-
Insgesamt		534	-	-	-	1	0	0	-
M 3	4	154	37,7	53,4	20,1	0	0	0,0	0
	5	167	29,3	55,1	16,1	0	0	0,0	0
	6	106	43,4	30,4	13,2	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD		-	36,8 ±	46,3	16,5 ± 3,5	-	-	0,0	-
Insgesamt		457	-	-	-	0	0	-	-
M 9	7	147	16,3	33,3	5,4	0	0	0,0	0
	8	108	13,9	33,3	4,6	0	0	0,0	0
	9	143	9,1	7,7	0,7	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD		-	13,1 ± 3,7	24,8 ± 14,8	3,6 ± 2,5	-	-	0,0	-
Insgesamt		398	-	-	-	0	0	0	-
M 9	10	33	22,4	55,6	12,5	0	0	0,0	0

## ERGEBNISSE

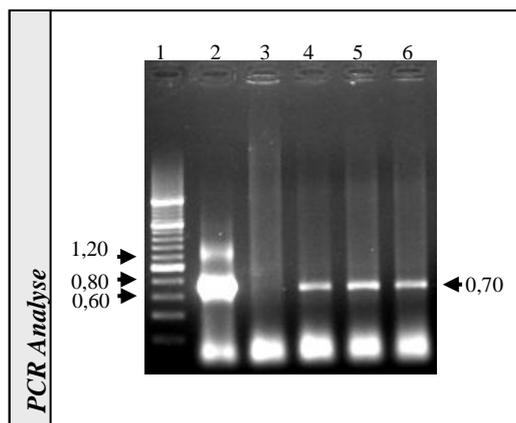
	11	35	18,6	77,8	14,5	0	0	0,0	0
	12	64	15,6	40,0	6,2	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD		-	18,9 ± 3,4	57,8 ± 19,0	11,1 ± 4,3	-	-	0,0	-
Insgesamt		132	-	-	-	0	0	0	-
	13	83	49,4 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	0	0	0,0	0
M 3	14	61	31,1 <sup>bc</sup>	10,5 <sup>b</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	0	0	0,0	0
	15	82	35,4 <sup>bc</sup>	3,4 <sup>a</sup>	1,2 <sup>ac</sup>	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD		-	38,6 ± 9,6	7,1 ± 3,6	2,7 ± 1,3	-	-	0,0	-
Insgesamt		226	-	-	-	0	0	-	-
	16	156	40,4	47,6	19,2	1	1	1,3	78
M 3	17	71	67,6	18,7	12,6	0	1	1,4	71
	18	61	67,2	48,8	32,8	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD		-	58,4 ± 15,6	38,4 ± 17,0	21,9 ± 10,3	-	-	0,9 ± 0,8	-
Insgesamt		288	-	-	-	1	2	-	-
	19	72	43,1	19,3	8,3	0	0	0,0	0
M 9	20	72	18,1	46,1	8,3	0	1	1,4	72
	21	97	32,0	0,0	0,0	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD		-	31,1 ± 12,5	21,8 ± 23,2	5,6 ± 4,8	-	-	0,5 ± 0,8	-
Insgesamt		241	-	-	-	0	1	-	-
	22	125	26,4	51,5	13,6	0	0	0,0	0
M 9	23	104	29,8	38,7	11,5	0	0	0,0	0
	24	82	24,4	60,0	14,6	0	0	0,0	0
Mittelwert ± SD		-	26,9 ± 2,7	50,1 ± 10,7	13,3 ± 1,6	-	-	0,0	-
Insgesamt		311	-	-	-	0	0	-	-

Ein Überblick über die fünf transgenen Pflanzen gibt Tabelle 30. Diese fünf Pflanzen hatten sich nicht bestockt und wiesen alle das *ipt*-Gen (nach der PCR-Analyse) auf. Nach der Gewebekulturstrategie (s. 2.2.1.4.7) gehörte Bw-34 zu Gruppe B, Bw-517 zu Gruppe C und Bw-87, Bw-993 und Bw-1483 zu Gruppe A. Die Pflanze Bw-34 aus der Gruppe B zeigte nur anfangs während der Phase K, GFP-Fluoreszenz, hat aber die PPT-Behandlung überlebt. Die Pflanzen Bw-34 und Bw-87 sind im Gewächshaus abgestorben. Die Pflanze Bw-517 aus der Gruppe C, die keine *gfp*-Expression während ihrer Entwicklung zeigte, war PPT-resistent und deshalb transgene. Alle Pflanzen waren phänotypisch normal, jedoch die Ähren der drei Pflanzen (Bw-517, Bw-993; Bw1483) waren teilweise oder völlig steril.

**Tab. 30: Überblick über die fünf Transformanten. Die PCR-Analyse wurde mindestens drei Mal pro Pflanze durchgeführt, um das Resultat abzusichern.**

Pflanzen	Transformationsstrategien	GFP-Fluoreszenz in Erdkultur	PCR-Analyse für <i>ipt</i> -Gen	Gruppe
Bw-34	16	-	+	B
Bw-87	16	+	+	A
Bw-517	1	-	+	C
Bw-993	17	+	+	A
Bw-1483	20	+	+	A

Abbildung 28 zeigt die PCR-Analyse von Blättern der drei von den fünf Transformanten. Alle drei ergaben einen positiven Nachweis des *ipt*-Gens.



**Abb. 28: Elektropherogramm der PCR Analyse der pS40-IPT. T<sub>0</sub>-Pflanzen auf Expression des *ipt*-Gens, Bahn 1: O'RangeRuler 200 bp DNA Ladder (Fermentas), Bahn 2: Plasmid pS40-IPT (Positivkontrolle), Bahn 3: Wildtyp, Bahn 4 bis 6: Bw-34, Bw-517 und Bw-1483.**

### 3.6.3 Transfer des Seneszenz-verzögernden Konstrukts pSG516 in die Weizensorten Klein Brujo und Bobwhite

Chronologisch gesehen wurde das Genkonstrukt pSG516 vor dem Plasmid pS40-IPT zur Transformation verwendet. Die Transformationsvarianten entsprachen denjenigen, die in Tabelle 7 beschrieben wurden. Hier wurde R1 als Regenerationsmedium verwendet.

#### 3.6.3.1 Transformation der Sorte Klein Brujo

Bei 1256 unreifen Embryonen lagen die Scutellarkallus-Induktionsraten zwischen 91,8 % bei der Transformationsvariante 1 und 82,9 % bei der Transformationsvariante 2. Bei M3- und M9-Medien erbrachte ein Abstand von 6 cm zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter das beste Ergebnis (Tabelle 31).

## ERGEBNISSE

Nicht so hoch wie die Induktionsraten waren die Regenerationsraten, die zwischen 66,2 % (Transformationsvariante 2) und 24,4 % (Transformationsvariante 5) lagen. Das M3-Medium zeigte einen besseren Effekt auf die Regeneration der Kalli und die Kultureffizienz als das M9-Medium.

Obwohl für die Transformationsvariante 1 eine hohe Scutellarkallus-Induktionsrate und eine relativ hohe Regenerationsrate erhalten wurde, misslang die Pflanzenkultur in Erde. Dasselbe gilt auch für die Transformationsvarianten 4 und 6, hier waren aber bereits die Regenerationsrate und die Kultureffizienz jeweils mit 28,9 % und 24,9 % sowie 28,6 % und 24,5 % ziemlich niedrig (Tabelle 31).

Bei der Transformationsvariante 3 entstanden fünf Pflanzen mit und eine ohne *gfp*-Expression. Bei der Transformationsvariante 2 wurden insgesamt zwei Pflanzen, (eine davon GFP-positiv) und bei den Transformationsvariante 5 nur eine (GFP-negative) Pflanze erhalten (Tabelle 31). 87,5 % der M3-Transformationsvarianten bekamen transgene Pflanzen, hingegen nur 12,5 % bei M9-Transformationsvarianten. Diese bessere Leistung des M3-Mediums im Vergleich zum M9-Medium spiegelte sich in der maximal erreichten Transformationseffizienz von 1,4 % gegen 0,7 % wider. Der Abstand von 9 cm zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter war beim der anschließenden Kultur in beiden Medien (Transformationsvarianten 2 bzw. 5) am effektivsten.

**Tab. 31: Übersicht über Transformationsversuche mit der Sommerweizensorte cv. Klein Brujo mit pSG516 und pGFPBAR.**

Medium / Transformations- variante	Anzahl beschossener Embryonen	Scutellarkallus- Induktionsrate (%)	Regenerations- rate (%)	Kultur- effizienz (%)	Pflanzen in Erde		Transformations- effizienz (%)	Anzahl beschossener. Embryonen / Transformanten	
					GFP negativ	GFP positiv			
M 3	1	208	91,8	63,4	58,2	0	0	0	0
	2	321	82,9	66,2	54,9	1	1	0,6	161
	3	355	87,6	43,4	38,0	1	4	1,4	71
Mittelwert ± SD		-	87,4 ± 3,6	57,7 ± 10,2	50,4 ± 10,8	-	-	0,7 ± 0,6	-
Insgesamt		884	-	-	-	2	5	-	-
M 9	4	80	86,3	28,9	24,9	0	0	0	0
	5	153	83,0	24,4	20,3	1	0	0,7	153
	6	139	85,6	28,6	24,5	0	0	0	0
Mittelwert ± SD		-	85,0 ± 1,4	27,3 ± 2,1	23,2 ± 2,6	-	-	0,2	-
Insgesamt		372	-	-	-	1	0	-	-

Fünf von den sieben Pflanzen, die auf dem M3-Medium erzeugt wurden, zeigten eine stabile *gfp*-Expression (Tab. 32). Man konnte aber bei P-538, P-644 und P-1143 eine PCR-Analyse durchführen. P-57 und P-1237 sind schon während des Erde-Übergangs abgestorben. Die anderen zwei (P-124 und P-859) Pflanzen sowie P-709 von der Transformationsvariante 5 waren *gfp*-negativ, die PCR-Analyse für das *ipt*-Gen war jedoch positiv.

Die überlebenden Pflanzen waren phänotypisch normal, jedoch die Ähren bei der Pflanze P-538 waren nicht alle Blüten fruchtbar.

**Tab. 32: Überblick über die 8 Transformanten. Die PCR-Analyse wurde mindestens drei Mal pro Pflanze durchgeführt, um das Resultat abzusichern.**

Pflanzen	Transformationsstrategien	GFP-Fluoreszenz	PCR-Analyse für <i>ipt</i> -Gen	Gruppe
P-57	3	+	tot	A
P-124	2	-	+	C
P-538	3	+	+	C
P-644	3	+	+	A
P-709	5	-	+	B
P-859	3	-	+	B
P-1143	3	+	+	C
P-1237	2	+	tot	A

### 3.6.3.2 Transformation der Sorte Bobwhite

Tabelle 33 gibt einen Überblick über die Induktions- und Regenerationsraten von Scutellarkalli aus unreifen Embryonen der Sorte Bobwhite. Die Scutellarkallus-Induktionsrate der sechs Transformationsvarianten lag zwischen 82,5 % bei Transformationsvariante 6 und 52,1 % bei Transformationsvariante 5.

Die Regenerationsrate aus Scutellarkalli und die Kultureffizienz waren hier wie bei der Sorte Klein Brujo auch relativ niedrig mit Werten zwischen 61,6 % bzw. 45 % (Transformationsvariante 2) und 24,2 bzw. 15,6 % (Transformationsvariante 1).

Außer bei den Transformationsvarianten 1 und 4 gelang es, Pflanzen in Erde zu kultivieren. Insgesamt wurden sieben Pflanzen erhalten, von denen zwei (28,6 %) *gfp*-Expression zeigten (Tabelle 33). Die höchste Transformationseffizienz, die erreicht wurde, lag bei 4,1 % mit M3-Medium bzw. 1,6 % mit M9-Medium.

ERGEBNISSE

Nach der Gewebekulturstrategie gehörten zwei Pflanzen zu Gruppe C zwei zu Gruppe A, und drei zu Gruppe B (Tabelle 34).

**Tab. 33: Übersicht über Transformationsversuche von Sommerweizen cv. Bobwhite mit pSG516 und pGFPBAR.**

Medium / Transformations-variante	Anzahl beschossener Embryonen	Scutellarkallus-Induktionsrate (%)	Regenerationsrate (%)	Kulturreffizienz (%)	Pflanzen in Erde		Transformations-effizienz (%)	Anzahl beschossener Embryonen / Transformanten	
					GFP negativ	GFP positiv			
M 3	1	64,6	24,2	15,6	0	0	0	0	
	2	73,0	61,6	45,0	2	1	4,1	24	
	3	43	76,8	39,5	30,3	0	1	2,3	43
Mittelwert ± SD		-	71,5 ± 5,1	41,8 ± 15,4	30,3 ± 14,7	-	-	2,1 ± 1,7	-
Insgesamt		178	-	-	-	2	2	-	-
M 9	4	57,3	49,0	28,1	0	0	0	0	
	5	61	52,1	31,1	16,2	1	0	1,6	61
	6	141	82,5	39,7	32,8	2	0	1,4	71
Mittelwert ± SD		-	64,0 ± 13,3	39,9 ± 7,3	25,7 ± 8,5	-	-	1,0 ± 0,7	-
Insgesamt		249	-	-	-	3	0	-	-

Zwei Pflanzen zeigten eine stabile *gfp*-Expression. Bei allen sieben Pflanzen war die PCR-Analyse für *ipt*-Gen positiv (Tab. 34). Die überlebenden Pflanzen waren phänotypisch normal, jedoch waren die Blüten mancher Ähren der zwei Pflanzen Pw-410 und Pw-317 unfruchtbar und zeigten deswegen eine verringerte Körnerproduktion.

**Tab. 34: Überblick über die sieben Transformanten. Bestockungsgrad (in Klammern) während der *in vitro* Kultur. Die PCR-Analyse wurde mindestens drei Mal pro Pflanze durchgeführt, um das Resultat abzusichern.**

Pflanzen	Transformationsstrategien	GFP-Fluoreszenz	PCR-Analyse für <i>ipt</i> -Gen	Gruppe
Pw-25	2	-	+	C
Pw-28	6	-	+	C
Pw-67	2	-	+	B
Pw-86	6	-	+	B
Pw-205	5	-	+	B
Pw-317 (2)	2	+	+	A
Pw-410 (7)	3	+	+	A

### 3.7 ANALYSE DER REGENERATPFLANZEN

#### 3.7.1 *Southern blot*-Analysen in der T<sub>0</sub>

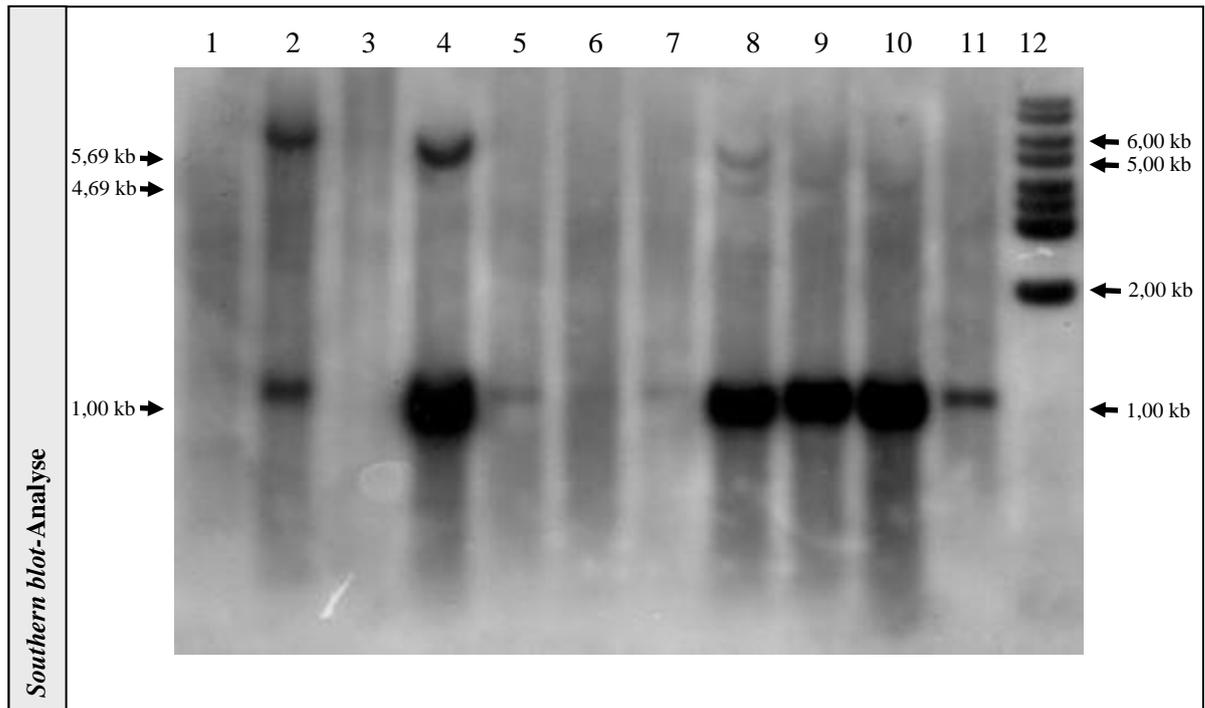
Mit dem Konstrukt pS40-IPT wurden insgesamt 56 und mit pSG516 (Gan and Amasino, 1995) wurden 15 transgene T<sub>0</sub>-Pflanzen von beiden Sorten (Klein Brujo und Bobwhite) erhalten. Mit acht ausgewählten T<sub>0</sub>-Pflanzen wurde ein *Southern blot* zum Nachweis der Präsenz eines intakten *ipt*-Gen Fremdgens durchgeführt. Die Pflanzen wurden nach der Höhe des Chlorophyllgehalts ausgewählt (s. Anhang). Die ausgesuchten Pflanzen waren sechs Klein Brujo pS40-IPT-Pflanzen (B-153, B-156, B-175.1, B-176, B-346, und B-355) und zwei (Pw-317 und Pw-410) Bobwhite pSG516-Pflanzen.

Für die *Southern blot*-Analysen wurde eine spezifische, mit Biotin-11-dUTP-markierte Sonde (*S-ipt*) (siehe 3.5.3) eingesetzt.

Die DNA dieser Pflanzen wurde mit *Nco*I und *Xba*I gespalten, wodurch das intakte *ipt*-Gen zusammen mit dem *nos*-Terminator gegebenenfalls als 1,0 kb großes Fragment (Abb. 16c) nachweisbar sein sollte. Abbildung 29 zeigt Hybridisierungssignale mit der *S-ipt*-Sonde in der erwarteten Laufhöhe allen Bobwhite- und Klein Brujo-Pflanzen. Alle untersuchten Pflanzen erwiesen sich demnach als transgen. Zusätzlich auftretende Hybridisierungssignale wie bei B-355, B-176, Pw-410, Pw-317 und B-175.1 sind auf Bruchstücke und/oder rearrangierten *ipt*-Kopien zurückzuführen. Der als Positivkontrolle eingesetzte Tabak516, der das Konstrukt pSG516 enthält, zeigte überraschenderweise kein Signal.

Für die Überprüfung einer Integration des übertragenen Fremdgens ins Genom und zur Abschätzung der Anzahl von übertragenen Genkopien wurde genomische DNA der transgenen Pflanzen mit dem Enzym *Pae*I gespalten. Die verwendeten Plasmide enthalten für dieses Enzym nur jeweils eine Restriktionsstelle (Abb. 13). Bei Anwesenheit freier Plasmid-DNA sollte deshalb nur ein Hybridisierungssignal auf der Höhe der jeweiligen Plasmidgröße auftreten. Bei Abwesenheit freier Plasmid-DNA sollten dagegen Hybridfragmente zwischen Plasmid- und pflanzlicher DNA nachzuweisen sein. Die Größe dieser Hybridfragmente ist zufällig, da die Erkennungssequenzen für *Pae*I außerhalb der Plasmid-DNA in der genomischen pflanzlichen DNA zufällig verteilt vorliegen.

Die Erkennungssequenz für *Pae*I innerhalb der Plasmid-DNA befindet sich im Fall der Nutzenplasmide pSG516 und pS40-IPT vor der Promotorsequenz von *SAG12* bzw. *HvS40*, so dass pro intakt integrierter *ipt*-Kopie ein Hybridfragment nachweisbar sein sollte. Tabelle 35 zeigt die geschätzte Mindestzahl an integrierten Kopien in den einzelnen T<sub>0</sub>-Pflanzen.



**Abb. 29:** *Southern blot*-Analysen zum Nachweis des *ipt*-Gens, in acht mutmaßlich transgenen T<sub>0</sub>-Pflanzen nach Hybridisierung mit einer Biotin-11-dUTP-markierten *ipt*-Sonde. Bahn 1: Wildtyp, Bahn 2: B-355, Bahn 3: Tabak516 (Positivkontrolle), Bahn 4: B-176, Bahn 5: B-156, Bahn 6: B-346, Bahn 7: B-153, Bahn 8: Pw-410, Bahn 9: Pw-317, Bahn 10: B-175.1, Bahn 11: Plasmid pSG516 (Positivkontrolle) und Bahn 12: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)

### 3.7.2 Nachweis der Expression des *ipt*-Gens mit reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis wurde die Expression des *ipt*-Gens über eine Amplifikation der *ipt*-mRNA mit RT-PCR durchgeführt. Seine Expression wurde in Fahnenblättern der Entwicklungsphase zwischen *early milk* (Zadoks Skala 73) und *early dough* (Zadoks Skala 83) nachgewiesen. Die erwartete Größe des Amplifikationsprodukts der *ipt*-DNA war 700 bp.

Abbildung 30a zeigt das erwartete 700 bp Amplifikationsprodukt nach PCR von Plasmid-DNA (pS40-IPT) und revers transkribierten *ipt*-mRNA (cDNA) der acht T<sub>0</sub>-Pflanzen. Die Amplifikationsprodukte wurden in der *Southern blot*-Analyse durch die entsprechenden Hybridisierungssignale mit der *ipt*-Sonde bestätigt. Alle acht selektierten T<sub>0</sub>-Pflanzen zeigten ein positives Signal.

### 3.7.3 Überprüfung der Expression übertragener Fremdgene

Einen Überblick über die Expression der drei Fremdgene, mit denen die acht ausgewählten T<sub>0</sub>-Pflanzen transformiert worden waren, gibt Tabelle 35.

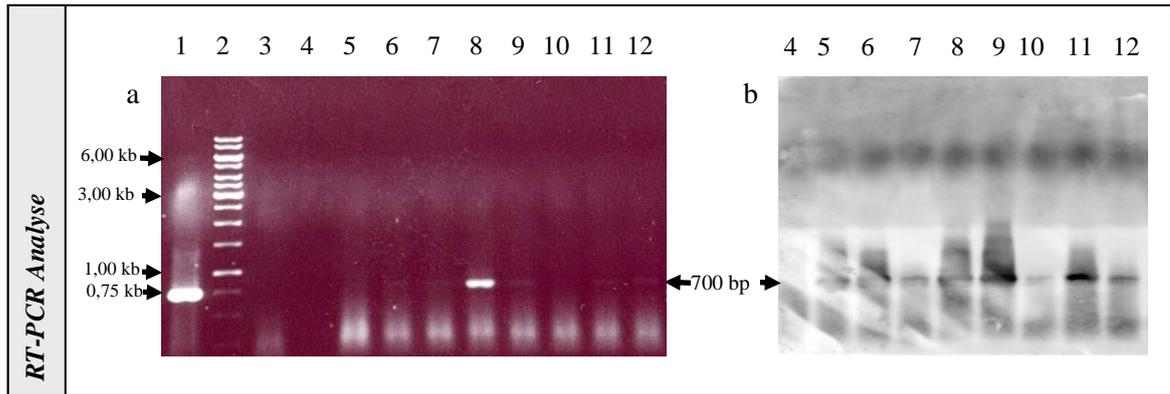


Abb. 30: Nachweis von *ipt*-mRNA mit RT-PCR in T<sub>0</sub>-Pflanzen.

a) Elektropherogramm des RT-PCR-Ansatzes der transgenen T<sub>0</sub>-Pflanzen.

b) *Southern blot*-Analysen des in (a) gezeigten Pherogramms. Die erwarteten Hybridisierungssignale gegen die *ipt*-Sonde sind zu erkennen. Bahn 1: Plasmid pS40-*IPT*, Bahn 2: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas), Bahn 3: Tabak516 (Positivkontrolle), Bahn 4: Negativkontrolle, Bahn 5: Pw-317, Bahn 6: Pw-410, Bahn 7: B-153, Bahn 8: B-156, Bahn 9: B-175.1, Bahn 10: B-176, Bahn 11: B-346 und Bahn 12: B-355.

Nur die Pflanzen B-156 und B-175.1 zeigten keine *gfp*-Expression während der Kultur in Erde. Die Pflanze B-156 war aber vorher schon als GFP-positiv registriert worden (Tab. 28). Vom Zeitpunkt des Partikelbeschusses ab, bis hin zur abreifenden Regeneratpflanze wurde die Expression des *gfp*-Gens unter Fluoreszenzbedingungen verfolgt und dokumentiert (Abb. 26 und 31). Bei chlorophyllfreiem Material z.B. Kallus, Wurzel (Abb. 31d, f) und „*embryo rescue*-Kultur“ (Abb. 31f), die *gfp*-positiv waren, war der Nachweis der Fluoreszenz im Gewebe deutlicher als bei chlorophyllhaltigem Material, z.B. in Blättern (31c). Alle acht Pflanzen waren PPT-resistent, exprimierten also dieses Fremdgen (Tab. 35).

Tab. 35: Überblick über die Expression der drei Fremdgene in den acht ausgewählten T<sub>0</sub>-Pflanzen.

Pflanzen	GFP-Fluoreszenz in Pflanzen in Erdkultur	PPT Resistenz	PCR- und RT-PCR-Nachweis des <i>ipt</i> -Gens	<i>Southern blot</i> -Analysen für das <i>ipt</i> -Gen und Mindestkopienzahl
Pw-317	+	+	+/+	+ (2)
Pw-410	+	+	+/+	+ (7)
B-153	+	+	+/+	+ (7)
B-156	-	+	+/+	+ (7)
B-175.1	-	+	+/+	+ (7)
B-176	+	+	+/+	+ (4)
B-346	+	+	+/+	+ (7)
B-355	+	+	+/+	+ (6)

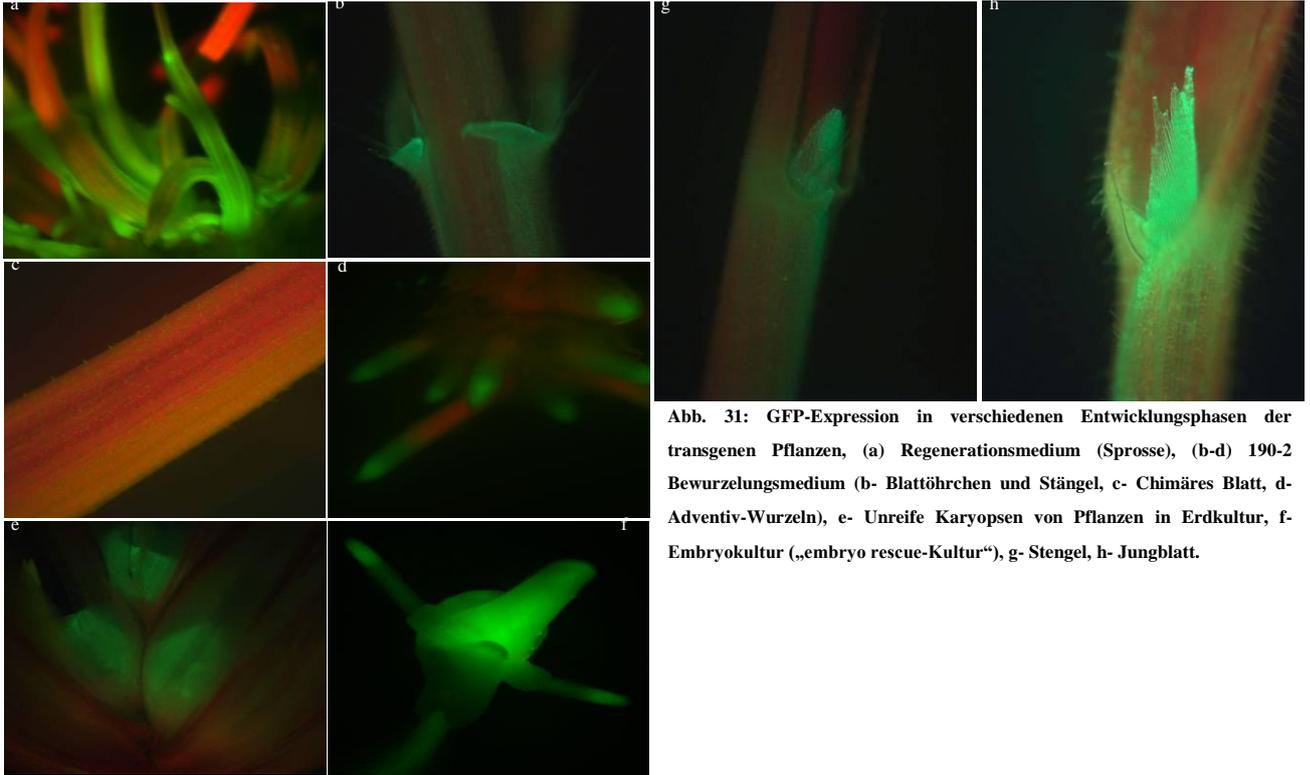


Abb. 31: GFP-Expression in verschiedenen Entwicklungsphasen der transgenen Pflanzen, (a) Regenerationsmedium (Sprosse), (b-d) 190-2 Bewurzelungsmedium (b- Blättörchen und Stängel, c- Chimäres Blatt, d- Adventiv-Wurzeln), e- Unreife Karyopsen von Pflanzen in Erdkultur, f- Embryokultur („embryo rescue-Kultur“), g- Stengel, h- Jungblatt.

### 3.8 UNTERSUCHUNGEN AN T<sub>1</sub>-PFLANZEN

#### 3.8.1 Untersuchung des Vererbungsmodus

Von jeder transgenen Pflanze wurden 20 zufällig ausgewählte Körner (außer für B-156, die nur insgesamt 9 Körner produzierte) in Erde gesät. Aus allen entwickelten sich (im Gewächshaus) morphologisch normale, selbstfertile Pflanzen. Wegen der verwendeten Cotransformationstechnik musste mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass in den T<sub>1</sub>-Nachkommen Nutzgen und Selektions- oder Markergen unabhängig vererbt wurden.

Die Plasmid Kombinationen waren: Pw-317 und Pw-410 pSG516 jeweils mit pGFPBAR und für die übrigen pS40-IPT mit pGFPBAR.

##### 3.8.1.1 Prüfung auf Anwesenheit des *ipt*-Gens und *gfp*-Expression im Keimling

Von den sechs *gfp*-positiven Linien der T<sub>0</sub>-Pflanzen wurde die *gfp*-Expression in den T<sub>1</sub>-Nachkommen geprüft. Außerdem wurde die Anwesenheit des *ipt*-Gens durch PCR-Analyse ermittelt (Tab. 36). Im  $\chi^2$ -Test ergab sich für die *gfp*-Expression nur bei Pw-317 und B-153 eine statistisch signifikante Abweichung vom erwarteten 3:1-Verhältnis. Bei der PCR-Analyse für *ipt*-Gen ergab sich keine statistisch signifikante Aufspaltung. Die Pflanzen der Linien B-346 und

B-355 zeigten sowohl *gfp*-Expression als auch die Präsenz des *ipt*-Gens. Bei den anderen 4 Linien gab es mehr *ipt*-positive als *gfp*-positive Pflanzen (Tab. 36). Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der *gfp*-Expression wäre *gfp*-Silencing.

**Tab. 36: Aufspaltung der *gfp*- und *ipt*-Gen Expression bei den 2 Bobwhite und den 4 Klein-Brujo-Linien. Die Anzahl der untersuchten Individuen jeder Linie und ihre Segregation in positive und negative Pflanzen sind gezeigt.**

Linie	<i>gfp</i> -Expression + : -	PCR-Analyse der Präsenz des <i>ipt</i> -Gens	Ohne <i>gfp</i> -Expression
<b>Pw-317</b>	10(+):10(-)	12(+):8(-) <sup>1</sup>	2
<b>Pw-410</b>	12(+):8(-) <sup>1</sup>	18(+):2(-) <sup>1</sup>	6
<b>B-153</b>	11(+):9(-)	17(+):3(-) <sup>1</sup>	6
<b>B-176</b>	12(+):8(-) <sup>1</sup>	13(+):7(-) <sup>1</sup>	1
<b>B-346</b>	16(+):4(-) <sup>1</sup>	16(+):4(-) <sup>1</sup>	0
<b>B-355</b>	13(+):7(-) <sup>1</sup>	13(+):7(-) <sup>1</sup>	0

<sup>1</sup> Die Analyse im  $\chi^2$ -Test ergab, dass die Aufspaltung vom erwarteten 3:1-Verhältnis nicht signifikant verschieden war (Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$ ).

### 3.8.1.2 Anwesenheit des *ipt*-Gens und Expression des *bar*-Gens im Keimling

Da die Linien B-156 und B-175.1 *gfp*-negativ waren, wurde die Anwesenheit des *bar*-Gens, mit Hilfe des PPT-Tests (im Gewächshaus, Abb. 32), und des *ipt*-Gen durch PCR-Analyse geprüft. Bei B-156 exprimierten nur vier von neun und bei B-175.1 zehn von 20 Individuen das *bar*-Gen. Der  $\chi^2$ -Test ergab einen signifikanten Unterschied zu dem erwarteten Spaltungsverhältnis von 3:1. Bei der PCR-Analyse des *ipt*-Gens ergab die statistische Auswertung ein 3:1 Verhältnis. Auffällig war, dass wie bei der Untersuchung des *bar*-Gens mehr Pflanzen das *ipt*-Gen erhielten als diejenigen, die *bar*-Expression zeigten (Tab. 37).

**Tab. 37: Aufspaltung der *bar*- und *ipt*-Gen Expression bei den 2 *gfp*-negativen Klein-Brujo-Linien. Die Anzahl der untersuchten Individuen jeder Linie und ihre Segregation in positive und negative Pflanzen sind gezeigt**

Linie	<i>bar</i> -Expression + : -	PCR-Analyse der Präsenz des <i>ipt</i> -Gens	Ohne <i>bar</i> -Expression
<b>B-156</b>	4(+):5(-)	7(+):2(-) <sup>1</sup>	3
<b>B-175.1</b>	10(+):10(-)	18(+):2(-) <sup>1</sup>	8

<sup>1</sup> Die Analyse im  $\chi^2$ -Test ergab, dass das Spaltungsverhältnis nicht signifikant verschieden von der erwarteten 3:1-Spaltung war (Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$ ).



Abb. 32: Expression des *bar*-Gens der T<sub>1</sub>-Nachkommen. Pflanzen in Gewächshaus nach 10 Tage der PPT-Behandlung: a- *bar*-positiv und b- *bar*-negativ.

### 3.8.2 Mendelanalysen an der T<sub>1</sub>-Generation

In Weizen-Transformationen wurde eine sehr enge Kopplung zwischen selektierbarem Markierungsgen und Nutzgen, die durch Cotransformation eingebracht wurden, gefunden (Huber *et al.* (2002), Fettig and Hess (1999)). In diesen Untersuchungen zeigte sich in keinem Fall eine unabhängige Segregation der übertragenen Gene.

Bei der Untersuchung des Vererbungsmodus der T<sub>0</sub>-Pflanzen wurde beobachtet, dass die PCR-Analyse die erwartete Aufspaltung von 3:1 für das *ipt*-Gen in allen acht Linien ergab. Bei vier Linien von sechs gab es jedoch weniger Individuen, die *gfp*-positiv waren, als Individuen mit dem *ipt*-Gen. Zwei Linien davon (Pw-317 und B-153) zeigten kein Spaltungsverhältnis der *gfp*-Expression von 3:1 (Tab. 36). Die Linien mit keiner *gfp*-Expression (B-156 und B-175.1) zeigten hinsichtlich der *bar*-Expression ein ähnliches Verhältnis (Tab.37).

Zur Untersuchung des Vererbungsmodus der insgesamt 149 T<sub>1</sub>-Pflanzen wurde die T<sub>1</sub>-Nachkommenschaft, d.h. die T<sub>2</sub>-Generation analysiert. Dafür wurde das *ipt*-Gen molekulargenetisch, das *gfp*-Gen optisch und das *bar*-Gen biochemisch-enzymatisch untersucht. Beim *gfp*- und *bar*-Gen wurde so die Expression bzw. die Aktivität ermittelt, beim *ipt*-Gen hingegen nur seine Anwesenheit.

Die Tabellen 38 und 39 zeigen die Anzahl der homozygoten, hemizygoten und azygoten T<sub>1</sub>-Pflanzen. Für den hemizygot monohybriden Erbgang wurde bei einer Selbstung ein Spaltungsverhältnis von 3:1 in den T<sub>1</sub>-Pflanzen erwartet, weswegen die Nachkommenschaft der hemizygoten T<sub>1</sub>-Pflanzen mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests analysiert wurde. Die Anzahl von untersuchten Pflanzen der T<sub>2</sub>-Generation lag zwischen zehn und 79.

## ERGEBNISSE

In manchen Fällen waren die Ausgangspflanzen der T<sub>1</sub>-Generation *gfp*- und *bar*-negativ (Tab. 39); in diesen Fällen wurden eine PCR-Analyse des *ipt*-Gens und anschließend der  $\chi^2$ -Tests durchgeführt.

Die hemizygoten T<sub>1</sub>-Pflanzen, deren Nachkommen anders als im Verhältnis 3:1 aufspalteten, betrug ein Drittel (23/67) und zeigten in weniger Pflanzen als erwartet *gfp*- oder *bar*-Expression. Die Genstilllegung betraf entweder das *gfp*-Gen oder beide Gene. Jedoch war der Expressionsverlust des *bar*-Gens tendenziell niedriger als beim *gfp*-Gen.

**Tab. 38: Überblick über die Vererbungsmodus der T<sub>1</sub>-Pflanzen in sechs Linien und die Expression des *gfp*- und *bar*-Gens in der Nachkommenschaft der T<sub>1</sub>-Generation. Hozyg. (homozygot), Hezyg. (hemizygot), Azyg. (azygot).**

Pflanze-Linie (Anzahl ausgelegter Karyopsen)	Vererbungsmodus			Anzahl der hemizygoten Pflanzen mit signifikanten vom Modus 3:1 abweichenden Spaltungsverhältnis (3:1) nach dem $\chi^2$ -Test ( $p \leq 0,05$ )/Anzahl der getesteten T <sub>1</sub> -Pflanzen	
	Hozyg.	Hezyg	Azyg.		
				<i>gfp</i> -positiv	<i>bar</i> -positiv
<b>Pw-317 (20)</b> <sup>1</sup>	0	12	8	7/10	1/2
<b>Pw-410 (20)</b> <sup>2</sup>	3	16	1	1/9	6/7
<b>B-153 (20)</b> <sup>3</sup>	5	12	3	2/7	5/5
<b>B-176 (20)</b> <sup>4</sup>	4	5 <sup>5</sup>	6	1/4	n.u.
<b>B-346 (20)</b>	4	12	4	0/12	n.u.
<b>B-355 (20)</b>	3	10	7	0/10	n.u.

<sup>1</sup> Die Nachkommenschaft zweier T<sub>1</sub>-Pflanzen hatte keine *gfp*-Expression, aber nach der *bar*-Expression waren beide hemizygot.

<sup>2</sup> Die Nachkommenschaft zweier T<sub>1</sub>-Pflanzen war weder *gfp*- noch *bar*-positiv, aber nach der PCR-Analyse des *ipt*-Gens waren beide hemizygot. Die Nachkommenschaft der fünf T<sub>1</sub>-Pflanzen zeigte keine *gfp*-Expression, aber entsprechend der *bar*-Expression waren sie hemizygot.

<sup>3</sup> Die Nachkommenschaft der sechs T<sub>1</sub>-Pflanzen war *gfp*-negativ. Nach der PPT-Behandlung war eine davon homozygot beim *bar*-Gen, der Rest war hemizygot.

<sup>4</sup> Zehn Pflanzen waren steril, daher konnte man die Nachkommenschaft nicht untersuchen. Fünf der T<sub>1</sub>-Pflanzen waren *gfp*-positiv. Die anderen fünf T<sub>1</sub>-Pflanzen waren *gfp*-negativ und entsprechend der PCR-Analyse des *ipt*-Gens waren sie azygot.

<sup>5</sup> Eine T<sub>1</sub>-Pflanze war *gfp*-negativ, jedoch stellte sie sich nach der PCR-Analyse des *ipt*-Gens der T<sub>2</sub>-Generation als hemizygot heraus und hatte kein vom 3 : 1-Typ signifikant verschiedenes Spaltungsverhältnis ( $p \leq 0,05$ ).

**Tab. 39: Überblick über die Vererbungsmodus in zwei Linien der T<sub>1</sub>-Pflanzen und über die Expression des *bar*-Gens und die Präsenz des *ipt*-Gens in der Nachkommenschaft der T<sub>1</sub>-Generation. Hozyg. (homozygot), Hezyg. (hemizygot), Azyg. (azygot).**

Pflanze-Linie (Anzahl ausgelegter Karyopsen)	Vererbungsmodus			Anzahl der hemizygoten Pflanzen mit signifikant vom Modus 3:1- abweichenden Spaltungsverhältnis nach dem $\chi^2$ -Test ( $p \leq 0,05$ )/Anzahl der getesteten T <sub>1</sub> -Pflanzen	
	Hozyg.	Hezyg.	Azyg.	<i>bar</i> -positiv	<i>ipt</i> -positiv
B-156 (9) <sup>1</sup>	0	7	2	2/4	0/3
B-175.1 (20) <sup>2</sup>	4	6	2	1/6	n.u.

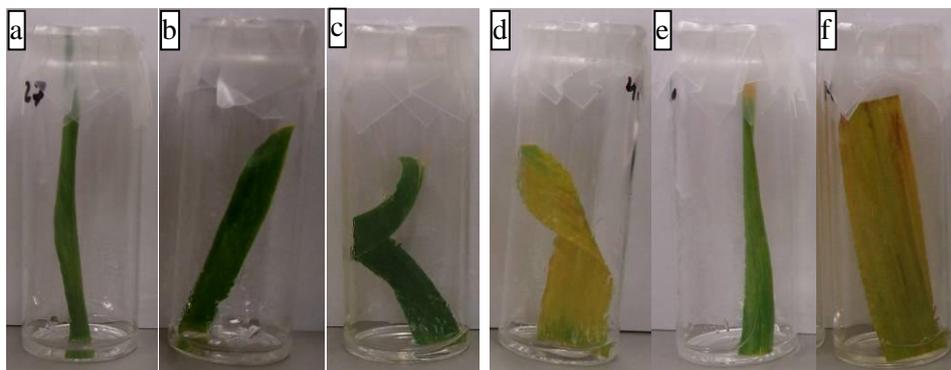
<sup>1</sup>Die Nachkommenschaft dreier T<sub>1</sub>-Pflanzen war *gfp*- und *bar*-negativ, aber nach der PCR-Analyse des *ipt*-Gens war sie hemizygot für dieses Gen.

<sup>2</sup>Bei acht T<sub>1</sub>-Pflanzen, die nach der PPT-Behandlung abgestorben waren, konnte man die Nachkommenschaft nicht untersuchen.

### 3.8.3 Chlorophyllgehalt

Der Chlorophyllgehalt wurde in voll entwickelten, abgeschnittenen Fahnenblättern von *ipt*-PCR-positiven transgenen T<sub>1</sub>-Pflanzen, und Wildtyp-Weizenpflanzen (s. 2.2.8.2) am Anfang und am Ende (ungefähr sieben und zehn Tage) des Seneszenzexperimentes gemessen (wie in 2.2.9 beschrieben), um einen Hinweis auf die Funktionsfähigkeit des *ipt*-Gens unter der Kontrolle von beiden Seneszenz-assozierten Promotoren zu bekommen.

Für die transgenen Pflanzen jeder Linie und die entsprechenden Kontrollen in Wasser und in BAP-Lösung wurden sowohl der Chlorophyll *a*- (Chl *a*) und Chlorophyll *b* (Chl *b*) -Abbau in Prozenten der Ausgangswerte, als auch das Chl *a* zu *b*-Verhältnis am Anfang und am Ende des Versuchs berechnet und gegenseitig verglichen (Abb. 33).



**Abb. 33: Voll entwickelte, abgeschnittene Fahnenblätter von Weizenpflanzen am Anfang (a-c) und nach sieben bis zehn Tagen am Ende (d-f) des Experiments.**

#### 3.8.3.1 Abbau des Chlorophylls in den Linien mit dem Konstrukt pSG516

Hier wurden neun transgene T<sub>1</sub>-Pflanzen der Linie Pw-317 (s. Anhang) und 15 transgene Pflanzen der Linie Pw-410 (Tabelle 40) mit sechs und fünf Kontrollpflanzen jeweils in Wasser

und in BAP-Lösung verglichen. In jedem Fall war der Abbau von Chl *a* geringer als von Chl *b*. Beide Linien gehören zu der Sorte Bobwhite.

**Tab. 40: Chlorophyll *a* und *b* der Linie Pw-410 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. n: Stichprobengröße. T: Transgene; K: Kontrolle (Wildtyp); K-B: Kontrolle in BAP-Lösung (Zusatz von Benzylaminopurin zum Medium (22,2 µM))**

Pflanzen	Am Anfang des Versuches			Am Ende des Versuches			Abbau in Prozenten	
	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>
<b>T (n=15)</b>	21,5 ± 3,0 <sup>a</sup>	13,9 ± 2,7 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,4 ± 3,3 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	79,5 ± 15,0 <sup>a</sup>	87,8 ± 11,2 <sup>a</sup>
<b>K (n=6)</b>	23,1 ± 2,1 <sup>a</sup>	14,3 ± 4,9 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,9 <sup>bc</sup>	0,6 ± 0,3 <sup>bc</sup>	2,2 ± 0,4 <sup>bc</sup>	94,5 ± 3,3 <sup>bc</sup>	96,0 ± 1,9 <sup>bc</sup>
<b>K-B (n=5)</b>	22,0 ± 5,9 <sup>a</sup>	13,7 ± 5,0 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,5 ± 3,7 <sup>ac</sup>	0,8 ± 1,1 <sup>ac</sup>	2,8 ± 0,5 <sup>ac</sup>	88,9 ± 14,0 <sup>ac</sup>	93,2 ± 9,3 <sup>ac</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ( $p < 0,01$ ) nach Kruskal Wallis Test.

Am Anfang des Versuchs gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den transgenen Pflanzen und der Kontrolle. Beide transgene Linien hatten einen geringeren Abbau der beiden Chlorophylle als die Kontrollpflanzen in Wasser und in BAP-Lösung. Aber nur zwischen den transgenen Pflanzen Pw-317 und Pw-410 und den Kontrollpflanzen in Wasser gab es einen statistisch signifikanten Unterschied. Allerdings waren bei den transgenen Pflanzen und den Kontrollpflanzen in BAP-Lösung die Standardabweichungen von Pflanze zu Pflanze größer als bei den Kontrollpflanzen in Wasser.

Das Verhältnis zwischen Chlorophyll *a* und *b* war am höchsten am Ende des Versuchs und zwar bei beiden transgenen Linien. Wie bereits beim Chlorophyllgehalt bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen transgenen Pflanzen beider Linien und den Kontrollpflanzen in Wasser, bei Kontrollpflanzen in BAP-Lösung waren die Werte nicht signifikant zu den transgenen bzw. den Kontrollen in Wasser verschieden.

### 3.8.3.2 Abbau des Chlorophylls in den Linien mit dem Konstrukt pS40-IPT

Auch bei diesen Pflanzen war der Abbau des Chl *b* stärker als der des Chl *a*. Dies gilt sowohl für die Transgenen als auch für die Kontrollpflanzen in Wasser und in BAP-Lösung. Die Tabellen 41 und 42 zeigen exemplarisch nur die Ergebnisse der Linien B-346 und B-355.

In vier Linien (B-153, B-175.1, B-176 und B-355) war der Abbau der beiden Chlorophylle am niedrigsten bei den Kontrollpflanzen in BAP-Lösung, gefolgt von den transgenen Pflanzen, die anderen zwei Linien B-156 (s. Anhang) und B-346 zeigten geringeren Abbau als die BAP-Kontrolle. Außer bei B-153 und B-176 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied einerseits

zwischen den transgenen Pflanzen (B-156, B-346 und B-355) und Kontrollpflanzen in Wasser und andererseits zwischen den Kontrollpflanzen in Wasser und den Kontrollpflanzen in BAP-Lösung gefunden.

Auch hier schwankte der Abbau zwischen den Pflanzen des gleichen Ansatzes stärker bei den transgenen Pflanzen und bei den Kontrollpflanzen in BAP-Lösung als bei den Kontrollpflanzen in Wasser.

**Tab. 41: Chlorophyll *a*- und *b*-Gehalt in voll entwickelten Blättern der Linie B-346 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. n: Stichprobengröße. T: Transgene; K: Kontrolle (Wildtyp); K-B: Kontrolle in BAP-Lösung (Zusatz von Benzylaminopurin zum Medium (22,2 µM))**

Pflanzen	Am Anfang des Versuches			Am Ende des Versuches			Abbau in Prozenten	
	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>
<b>T. (n=16)</b>	20,6 ± 2,4 <sup>a</sup>	13,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	9,6 ± 4,0 <sup>a</sup>	4,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,8	53,6 ± 18,2 <sup>a</sup>	66,3 ± 21,9 <sup>a</sup>
<b>K. (n=8)</b>	22,8 ± 4,2 <sup>a</sup>	13,7 ± 4,3 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,5 <sup>bc</sup>	0,6 ± 0,4 <sup>bc</sup>	2,7 ± 0,9	93,1 ± 5,8 <sup>bc</sup>	96,2 ± 2,2 <sup>bc</sup>
<b>K.-B (n=7)</b>	20,6 ± 4,4 <sup>a</sup>	13,0 ± 3,7 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,5 ± 4,8 <sup>ad</sup>	3,6 ± 2,6 <sup>ad</sup>	2,5 ± 0,7	60,7 ± 21,1 <sup>ad</sup>	73,6 ± 18,1 <sup>ad</sup>

Mittelwerte mit den gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,05) nach dem Kruskal Wallis Test.

**Tab. 42: Chlorophyll *a*- und *b*-Gehalt in voll entwickelten Blättern der Linie B-355 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. n: Stichprobengröße. T: Transgene; K: Kontrolle (Wildtyp); K-B: Kontrolle in BAP-Lösung (Zusatz von Benzylaminopurin zum Medium (22,2 µM))**

Pflanzen	Am Anfang des Versuches			Am Ende des Versuches			Abbau in Prozenten	
	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>
<b>T. (n=13)</b>	20,6 ± 2,9 <sup>a</sup>	11,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,5 ± 3,0 <sup>a</sup>	1,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	72,9 ± 14,9 <sup>a</sup>	83,5 ± 11,2 <sup>a</sup>
<b>K. (n=8)</b>	22,8 ± 4,2 <sup>a</sup>	13,7 ± 4,3 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,5 <sup>bc</sup>	0,6 ± 0,4 <sup>bc</sup>	2,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	93,1 ± 5,8 <sup>bc</sup>	96,2 ± 2,2 <sup>bc</sup>
<b>K.-B (n=7)</b>	20,6 ± 4,4 <sup>a</sup>	13,0 ± 3,7 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,5 ± 4,8 <sup>ad</sup>	3,6 ± 2,6 <sup>ad</sup>	2,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	60,7 ± 21,1 <sup>ad</sup>	73,6 ± 18,1 <sup>ad</sup>

Mittelwerte mit den gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,05) nach dem Kruskal Wallis Test.

### 3.8.4 Das Cytokininmuster der T<sub>1</sub>-Pflanzen

Wegen des großen experimentellen Aufwands der Cytokininanalyse wurde bei diesen Untersuchungen nicht zwischen den Cytokininmustern der einzelnen transgenen Linien unterschieden. Es wurde nur der Gehalt der dominierenden Cytokinine Isopentenyladenosin, Zeatinribosid und Dihydrozeatinribosid (s. 2.2.10), die den geringsten Chlorophyll-Abbau zeigten, gemessen.

Die Quantifizierung der Cytokinine erfolgte mittels ELISA in voll entwickelten Fahnenblättern der T<sub>1</sub>- und Wildtyp-Pflanzen, deren Entwicklungszustand den Stadien 73 bis 83 der Zadoks Skala entspricht, das heißt zwischen *early milk* und *early dough* der Körner.

#### 3.8.4.1 Cytokiningehalte in Transformaten mit dem Plasmid pSG516

Tabelle 43 zeigt die Cytokiningehalte der Blätter der transgenen Linie Pw-410 im Vergleich mit denen des Wildtyps (Bobwhite). Die Steigerung des Gesamtgehalts der Cytokinine war 3,9-fach bezogen auf die Kontrolle. Von den drei Phytohormonen zeigte das Zeatinribosid in den T<sub>1</sub>-Pflanzen die stärkste Anreicherung. Im Vergleich zur Kontrolle war seine Konzentration 4,8-fach höher; dagegen waren Dihydrozeatinribosid und Isopentenyladenosin nur 2,5- bzw. 2,1-fach höher.

**Tab. 43: Konzentration der drei verschiedenen Cytokinine (pmol/g FW) in voll entwickelten Fahnenblättern der T<sub>1</sub>-Pflanzen der Linie Pw-410 (n=3), (mit dem Plasmid pSG516) und der Kontrolle (n=3). Die Werte sind Durchschnittswerte mit Standardabweichung.**

Linie	Cytokininspezies							
	Zeatinribosid		Dihydrozeatinribosid		Isopentenyladenosin		Gesamtgehalt	
	Transgene	Kontrolle	Transgenen	Kontrolle	Transgene	Kontrolle	Transgene	Kontrolle
Pw-410	227,5 ± 32,8	47,4 ± 16	77,1 ± 17	30,8 ± 14	44,5 ± 30,4	21,0 ± 13,7	394,1 ± 66,7	98,8 ± 16,2

#### 3.8.4.2 Cytokiningehalte in Transformaten mit dem Plasmid pS40-IPT

Die Cytokiningehalte der Fahnenblätter der T<sub>1</sub>-Generation der 3 transgenen Linien sowie der Kontrollpflanzen (Klein Brujo) sind in Tabelle 44 gezeigt.

Die höchste Steigerung des Gesamtzytokiningehalts, nämlich 2,6-fach, im Vergleich zur Kontrolle fand sich in der Linie B-346. Bei den Linien B-156 und B-355 war die Steigerung etwas geringer (2,3-fach bzw. 2,2-fach, Tab. 44).

Die Effekte der Expression des *ipt*-Gens waren bezüglich der 3 Cytokininspezies unterschiedlich stark: Während die Dihydrozeatingehalte höchstens um den Faktor 1,8 erhöht waren (B-346), ergaben sich Steigerungsraten zwischen 3,7- und 3,4-fach bei Zeatinribosid (B-346) und Isopentenyladenosin (B-355) (Tabelle 45).

**Tab. 44: Konzentration der drei Cytokininspezies (pmol/g FW) in voll entwickelten Fahnenblätter der T<sub>1</sub>-Pflanzen der Linien B-156 (n=4), B-346 (n=3), B-355 (n=3) (mit dem Plasmid pS40-IPT) und Kontrollpflanzen (n=3). Die Werte sind Durchschnittswerte mit Standardabweichung.**

Cytokininspezies									
Linie	Zeatinribosid		Dihydrozeatinribosid		Isopenenyladenosin		Gesamtgehalt		
	Transgenen	Kontrolle	Transgenen	Kontrolle	Transgenen	Kontrolle	Transgenen	Kontrolle	
B-156	252,3 ± 176	83,2 ± 62	138,7 ± 6	91,0 ± 19	219,8 ± 45	88,7 ± 38	610,8 ± 198	262,9 ± 73	
B-346	314,0 ± 118		166,5 ± 42		220,5 ± 177		701 ± 341		
B-355	123,2 ± 106		135,5 ± 45		309,5 ± 68		568,2 ± 253		

**Tab. 45: Erhöhung des Cytokinidgehalts gegenüber der Kontrolle in den verschiedenen Linien der T<sub>1</sub>-Pflanzen. Fett gedruckte Zahlen zeigen die maximalen Effekte für die einzelnen Cytokininspezies, bzw. die einzelnen transgenen Linien.**

Cytokinin												
Linie	ZR			DHZR			IPA			Total		
	B-156	B-346	B-355	B-156	B-346	B-355	B-156	B-346	B-355	B-156	B-346	B-355
Erhöhung des Cytokinidgehalts	3,0-fach	<b>3,7-fach</b>	1,5-fach	1,5-fach	<b>1,8-fach</b>	1,5-fach	2,4-fach	2,4-fach	<b>3,4-fach</b>	2,3-fach	<b>2,6-fach</b>	2,2-fach

### 3.9 ERTRAGSLEISTUNG DER T<sub>1</sub>-PFLANZEN

Es wurde erwartet, dass die transgenen Pflanzen, die das *ipt*-Gen unter der Kontrolle eines Seneszenz-assoziierten Promotors enthielten, eine längere Blatt-Lebensdauer haben, die wiederum zu einem höheren Kornansatz und einem höheren Korngewicht führen sollte; die Konsequenz wäre eine Steigerung des Ertrags im Vergleich mit den Wildtyp und den azygoten Pflanzen. Allerdings wurden nicht in jeder Linie genug azygote Pflanzen erhalten, um eine statistische Analyse durchzuführen.

Die geprüften agronomischen Eigenschaften waren einerseits „morphometrische Daten“ wie Pflanzengröße, Bestockung, etc. und andererseits „Ertragsparameter“ wie Gesamtzahl der Körner, Körner pro Ähre, etc.

### 3.9.1 Zwei Linien mit der Nutzenskassette pSG516

Die zwei Linien Pw-317 und Pw-410 gehören zur Ausgangssorte *Bobwhite*. Bei der Linie Pw-410 gab es nur eine azygote Pflanze, deswegen konnten ihre Daten nicht statistisch ausgewertet werden.

Bei den Linien Pw-317 und Pw-410 waren die „morphometrischen Daten“ der transgenen und azygoten Pflanzen höher als die Werte der Kontrollpflanzen und die Unterschiede waren meist signifikant.

Die Ährelänge der azygoten Pflanzen der Linie Pw-317 lag signifikant über der der transgenen Linie (Tab. 46).

Die Gesamtzahl der Körner schwankte von Pflanze zu Pflanze stärker bei den transgenen und azygoten Pflanzen als bei den Kontrollpflanzen. Die transgenen Pflanzen der beiden Linien besaßen weniger Körner pro Ähre als die azygoten und die Kontrollpflanzen, bei der Linie Pw-317 war der Unterschied sogar signifikant.

Das durchschnittliches Korngewicht der transgenen Pflanzen der Linie Pw-317 war um 5,8 % leichter als das der azygoten Pflanzen. Bei den transgenen Pflanzen der Linie Pw-410 hingegen war es um 28,7 % höher als bei den azygoten Pflanzen.

**Tab. 46: Überblick über agronomische Parameter der Linie Pw-317. K. (Kontrolle), n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert.**

Pw-317	Morphometrische-Daten				Ertragsparameter			
	Pflanzenhöhe (cm)	Anzahl der Sprosse	Anzahl fruchtbarer Sprosse	Ährelänge (cm)	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)
<b>Transgene (n=12)</b>	<b>70,4 ± 4,4<sup>a</sup></b>	<b>16,8 ± 6,2<sup>a</sup></b>	12,0 ± 3,6 <sup>a</sup>	8,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	305,9 ± 163,8 <sup>a</sup>	24,6 ± 9,8 <sup>a</sup>	10,1 ± 5,4 <sup>a</sup>	41,7 ± 6,0 <sup>a</sup>
<b>Azygote (n=8)</b>	70,3 ± 5,0 <sup>ab</sup>	16,6 ± 5,4 <sup>ab</sup>	<b>14,3 ± 4,9<sup>ac</sup></b>	<b>10,1 ± 0,8<sup>bc</sup></b>	<b>501,4 ± 232,3<sup>a</sup></b>	35,6 ± 9,5 <sup>bc</sup>	<b>21,4 ± 9,8<sup>bc</sup></b>	<b>44,1 ± 3,4<sup>ab</sup></b>
<b>K. (n=7)</b>	59,4 ± 3,2 <sup>ac</sup>	8,3 ± 1,5 <sup>ac</sup>	7,9 ± 1,3 <sup>bd</sup>	8,1 ± 0,6 <sup>ad</sup>	306,6 ± 44,1 <sup>a</sup>	<b>37,4 ± 4,1<sup>bc</sup></b>	10,7 ± 3,7 <sup>ad</sup>	34,6 ± 9,9 <sup>ac</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach dem Kruskal Wallis-Test

### 3.9.2 Sechs Linien mit der Nutzenskassette pS40-IPT

Die sechs Linien B-153, B-156, B-176, B-175.1, B-346 und B-355 stammen von der Sorte Klein Brujo ab. Die Linien B-156 und B-175.1, deren azygote Pflanzen nach der Behandlung mit PPT nicht überlebt hatten, wurden getrennt analysiert.

3.9.2.1 Die Pflanzen der Linien B-153, B-176, B-346 und B-355

Die „morphometrischen Daten“ der transgenen und azygoten Pflanzen waren tendenziell höher und zeigten fast immer einen signifikanten Unterschied zur Kontrollpflanze, außer bei der Pflanzenhöhe der transgenen Pflanzen der Linie B-355, die kürzer als die Kontrollpflanzen waren (Tab. 48).

Die transgenen Pflanzen bildeten zwischen 10 % und 11,3 % weniger Sprosse als die azygoten Pflanzen, außer bei der Linie B-355, die 11 % mehr Sprosse trieb. Der prozentuale Anteil Ährentragender Sprosse war bei den transgenen Pflanzen zwischen 92 und 98 % höher als bei azygoten, außer bei der Linie B-153, deren Wert 73 % bei transgenen gegen 94 % bei azygoten Pflanzen betrug. Dieser Unterschied war signifikant. Die Ähren der transgenen waren bis zu 12 % kürzer als bei den azygoten Pflanzen.

Die „Ertragsparameter“ der Nachkommen der Regeneratpflanzen waren tendenziell höher und fast immer signifikant unterschiedlich zu denen der Kontrollpflanzen. Das durchschnittliche Korngewicht der azygoten und der transgenen Pflanzen von B-355 war fast gleich.

Die Werte der transgenen Pflanzen waren im Allgemeinen niedriger als die der azygoten Pflanzen. Bei der Gesamtzahl der Körner war der Unterschied zwischen 0,0 % und 51,2 %, bei den Körnern pro Ähre zwischen 13,5 % und 24,0 %, beim Korngewicht zwischen 1,37 % und 82 %. Das durchschnittliche Korngewicht war nur zwischen 3,7 % und 8,5 % erhöht, dagegen lag es bei der Linie B-355 um 11,9 % höher.

**Tab. 47: Überblick über die agronomische Parameter der Linie B-153. K. (Kontrolle), n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen der höherer Wert.**

B-153	Morphometrische-Daten				Ertragsparameter			
	Pflanzenhöhe (cm)	Anzahl der Sprosse	Anzahl fruchtbarer Sprosse	Ährenlänge (cm)	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)
<b>Transgene (n=17)</b>	<b>69,8 ± 6,1<sup>a</sup></b>	15,2 ± 5,6 <sup>a</sup>	11,1 ± 3,2 <sup>a</sup>	8,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	253,3 ± 139,2 <sup>a</sup>	22,0 ± 8,3 <sup>a</sup>	10,0 ± 6,4 <sup>a</sup>	43,7 ± 4,1 <sup>a</sup>
<b>Azygote (n=3)</b>	69,0 ± 3,1 <sup>a</sup>	<b>16,7 ± 4,0<sup>ac</sup></b>	<b>15,7 ± 3,5<sup>bc</sup></b>	<b>9,6 ± 0,8<sup>ab</sup></b>	<b>383,0 ± 83,1<sup>ab</sup></b>	<b>25,5 ± 9,3<sup>a</sup></b>	<b>18,2 ± 4,0<sup>bc</sup></b>	<b>47,4 ± 1,3<sup>ab</sup></b>
<b>K.(n=9)</b>	67,1 ± 3,8 <sup>a</sup>	6,4 ± 1,4 <sup>bd</sup>	6,0 ± 1,4 <sup>bc</sup>	7,6 ± 0,5 <sup>ac</sup>	145,6 ± 47,4 <sup>ac</sup>	24,2 ± 5,3 <sup>a</sup>	5,7 ± 1,6 <sup>ad</sup>	40,1 ± 4,6 <sup>ac</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach Kruskal Wallis-Test

ERGEBNISSE

**Tab. 48: Überblick über agronomische Eigenschaften der Linie B-355. K. (Kontrolle), n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert.**

B-355	Morphometrische-Daten				Ertragsparameter			
	Pflanzenhöhe (cm)	Anzahl der Sprosse	Anzahl fruchtbarer Sprosse	Ährenlänge (cm)	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)
Transgene (n=13)	66,3 ± 3,6 <sup>a</sup>	<b>11,9 ± 3,7<sup>a</sup></b>	<b>11,6 ± 3,9<sup>a</sup></b>	10,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	<b>343,6 ± 142,6<sup>a</sup></b>	29,5 ± 9,3 <sup>a</sup>	14,5 ± 7,1 <sup>a</sup>	<b>46,3 ± 4,5<sup>a</sup></b>
Azygote (n=7)	<b>71,6 ± 5,5<sup>ac</sup></b>	10,6 ± 5,3 <sup>ac</sup>	10,3 ± 5,0 <sup>ac</sup>	<b>10,5 ± 1,0<sup>ac</sup></b>	<b>343,6 ± 170,1<sup>ac</sup></b>	<b>33,5 ± 7,3<sup>a</sup></b>	<b>14,7 ± 8,9<sup>ac</sup></b>	40,8 ± 7,3 <sup>ac</sup>
K.(n=9)	67,1 ± 3,0 <sup>bc</sup>	6,4 ± 1,4 <sup>bc</sup>	6,0 ± 1,4 <sup>bc</sup>	7,6 ± 0,5 <sup>bd</sup>	145,6 ± 47,4 <sup>bd</sup>	24,2 ± 5,0 <sup>a</sup>	5,7 ± 1,6 <sup>bc</sup>	40,1 ± 4,6 <sup>bc</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach Kruskal Wallis-Test

3.9.2.2 Die Pflanzen B-156 und B-175.1

Die Pflanzen wurden mit den Kontrollpflanzen verglichen. Bei den „morphometrischen Daten“ zeigten in beiden Linien die transgenen Pflanzen signifikant höhere Werte als die Kontrollpflanzen, außer bei der Pflanzenhöhe der Linie B-175.1 (Tab. 49) und der Anzahl der Ähren-tragender Sprosse von B-156.

Bei den „Ertragsparametern“ konnte nur eine Pflanze der Linie B-156 berücksichtigt werden, deren Gesamtzahl der Körner um 11 % und deren Kornansatz pro Ähre“ um 11 % niedriger und sowie das Gesamtkorngewicht um 23 % und das durchschnittliche Korngewicht um 29,4 % höher als die Kontrollpflanzen waren. Die Ergebnisse der Linie B-175.1 waren signifikant höher als diejenigen der Kontrollpflanzen, z.B. lag die Anzahl der Körner pro Ähre um 28,2 % höher. Beim durchschnittlichen Korngewicht gab es keinen signifikanten Unterschied obwohl er um 5 % über dem Wert des Wildtyps lag.

**Tab. 49: Überblick über agronomische Parameter der Linie B-175.1. K. (Kontrolle), n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem höheren Wert.**

B-175.1	Morphometrische-Daten				Ertragsparameter			
	Pflanzenhöhe (cm)	Anzahl der Sprosse	Anzahl fruchtbarer Sprosse	Ährenlänge (cm)	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)
Transgene (n=10)	65,7 ± 3,7 <sup>a</sup>	<b>14,0 ± 3,3<sup>a</sup></b>	<b>13,1 ± 2,4<sup>a</sup></b>	<b>9,2 ± 0,6<sup>a</sup></b>	<b>435,9 ± 75,9<sup>a</sup></b>	<b>33,7 ± 5,5<sup>a</sup></b>	<b>16,9 ± 4,2<sup>a</sup></b>	<b>42,0 ± 6,2<sup>a</sup></b>
K.(n=9)	<b>67,1 ± 3,8<sup>a</sup></b>	6,4 ± 1,4 <sup>b</sup>	6,0 ± 1,4 <sup>b</sup>	7,6 ± 0,5 <sup>b</sup>	145,6 ± 47,4 <sup>b</sup>	24,2 ± 5,3 <sup>b</sup>	5,7 ± 1,6 <sup>b</sup>	40,1 ± 4,6 <sup>a</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach dem Mann-Whitney U-Test

### 3.10 UNTERSUCHUNG DER T<sub>2</sub>-PFLANZEN

#### 3.10.1 Mendel-Analysen der T<sub>2</sub>-Generation

Von der T<sub>2</sub>-Generation wurden die Linien Pw-317 und Pw-410 der Sorte Bobwhite und vier Linien der Sorte Klein Brujo (B-153, B-176, B-346 und B-355) untersucht.

Von jeder Linie der *gfp*-positiven T<sub>1</sub>-Pflanzen wurden je 3–6 Samen der T<sub>2</sub>-Generation ausgesät und zwar jeweils von einer azygoten, hemizygoten und homozygoten Pflanze, außer bei Pw-317 (nur azygot und hemizygot) und Pw-410 (nur homozygot und azygot). Zur Feststellung des Erbgangs wurden die Expression des *gfp*-Gens optisch und die Expression des *bar*-Gens biochemisch in der T<sub>3</sub>-Generation geprüft. Das Ergebnis ist in Tab. 50 dargestellt. Für den hemizygot monohybriden Erbgang wird bei einer Selbstung ein Spaltungsverhältnis der T<sub>3</sub>-Generation von 3:1 erwartet, weswegen die Expression der Markergene in den hemizygoten T<sub>3</sub>-Pflanzen mit dem  $\chi^2$ -Tests geprüft wurde. Zwischen 20 und 27 Körner der T<sub>3</sub>-Generation wurden jeweils ausgesät, von denen aber nicht alle keimten. Bei 7 von 22 (32 %) hemizygoten T<sub>3</sub>-Individuen unterscheiden sich die beobachteten Spaltungsverhältnisse signifikant von dem für einen hemizygoten monohybriden Erbgang erwarteten Verhältnis von 3:1.

Einige Linien zeigten in der T<sub>3</sub>-Generation Unterschiede in der Expression des *gfp*- bzw. des *bar*-Gens, obwohl beide Gene vorhanden waren (Tab. 50). Somit bestätigt die Untersuchung der T<sub>2</sub>-Nachkommenschaft, dass das *gfp*-Gen schwächer exprimiert wird als das *bar*-Gen. Wie schon bei der T<sub>2</sub>-Generation zeigten auch die T<sub>3</sub>-Pflanzen keine durchgehende Expression beider Gene, obwohl die verwendeten T<sub>2</sub>-Mutterpflanzen homozygot positiv waren. Die Tabelle 51 zeigt die Pflanzen Pw-410-A, B-153-R, B-346-B und B-355-C, die alle in der T<sub>1</sub> homozygot waren. Trotzdem zeigten ihre T<sub>3</sub>-Nachkommen nur teilweise *gfp*- oder *bar*-Expression. Die T<sub>3</sub>-Pflanzen der Linie B-153-R-2 zeigte überhaupt keine *gfp*-Expression aber alle Pflanzen waren PPT-resistent, exprimierten also das *bar*-Gen. Die T<sub>3</sub>-Pflanzen der Linien B-346-B-1, - B3 sowie B-355-C-3 waren, wie erwartet, alle homozygot für beide Gene nicht aber ihre Geschwister-Pflanzen (B-346-B-2 bzw. B-355-C-1 und -C-2).

Die Pflanzen B-153-Q (Tab. 52) waren T<sub>1</sub>-Pflanzen und hemizygot im Bezug auf die Expression beider Gene. Die daraus hervorgegangenen T<sub>2</sub>-Pflanzen B-153-Q-1 exprimierten das *gfp*-Gen waren aber *bar*-negativ; aber die T<sub>3</sub>-Pflanzen von B-153-Q-1 zeigten wiederum *bar*-Expression.

ERGEBNISSE

Tab. 50: Überblick über den Vererbungsmodus der T<sub>2</sub>-Pflanzen anhand der Expression des *gfp*- und des *bar*-Gens in der T<sub>3</sub>-Generation. Hozyg. (homozygot), Hezyg. (hemizygot), Azyg. (azygot).

Linie, Genotypen der T <sub>1</sub> -Generation und Anzahl der ausgelegten Körner	Vererbungsmodus			Anzahl der hemizygoten T <sub>2</sub> -Pflanzen mit signifikanten verschieden Spaltungsverhältnis (3:1) nach dem $\chi^2$ -Test ( $p \leq 0,05$ )/Anzahl der getesteten T <sub>2</sub> -Pflanzen	
	Hozyg.	Hezyg.	Azyg.	<i>gfp</i> -positiv	<i>bar</i> -positiv
Pw-317-S (3) (azyg.)	0	0	3	-	-
Pw-317-T (5) <sup>1</sup> (hezyg.)	0	4	0	2/4	2/4
Pw-410-A (5) <sup>2</sup> (hozyg.)	0	5	0	1/5	1/5
Pw-410-T (3) (azyg.)	0	0	3	-	-
B-153-J (4) (azyg.)	0	0	4	-	-
B-153-Q (5) (hezyg.)	0	4	1	3/4	3/4
B-153-R (3) <sup>3</sup> (hozyg.)	2	0	0	-	-
B-176-C (3) (azyg.)	0	0	3	-	-
B-176-J (6) (hozyg.)	5	0	0	-	-
B-346-A (5) (hezyg.)	2	1	2	0/1	0/1
B-346-B (3) (hozyg.)	3	0	0	-	-
B-346-I (3) (azyg.)	0	0	3	-	-
B-355-A (3) (hozyg.)	0	3	0	0/3	0/3
B-355-C (3) (hozyg.)	3	0	0	-	-
B-355-N (3) (azyg.)	0	0	3	-	-

<sup>1</sup> Eine T<sub>2</sub>-Pflanze zeigte weder *gfp*- noch *bar*-Expression, obwohl die PCR-Analyse für das *ipt*-Gen positiv war.

<sup>2</sup> Pw-410-A (T<sub>1</sub>-Generation) wurde als homozygot eingestuft, aber die Nachkommenschaft der fünf Pflanzen waren hemizygot.

<sup>3</sup> Eine T<sub>2</sub>-Pflanze produzierte nur sieben Körner. Ihre Nachkommenschaft wurde deshalb nicht berücksichtigt.

Tab. 51: Überblick über die *gfp*- und *bar*-Expression der homozygoten T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanzen und ihrer Nachkommen.

Pflanzen	T <sub>1</sub> -Pflanze		T <sub>2</sub> -Pflanze		T <sub>3</sub> -Pflanze (Expression/Zahl der Individuen)			
	<i>gfp</i> -Expression	<i>bar</i> -Expression	<i>gfp</i> -Expression	<i>bar</i> -Expression	<i>Gfp</i> + <i>Bar</i> +	<i>Gfp</i> + <i>Bar</i> -	<i>Gfp</i> - <i>Bar</i> +	<i>Gfp</i> - <i>Bar</i> -
Pw-410-A-1	+	+	+	+	14/26	0/26	1/26	11/26
Pw-410-A-2			+	+	9/12	0/12	0/12	3/12
Pw-410-A-3			+	+	14/20	0/20	0/20	6/20
Pw-410-A-4			+	+	13/20	0/20	0/20	7/20
Pw-410-A-5			+	+	11/19	0/19	1/19	7/19
B-153-R-2	+	+	+	+	0/20	0/20	20/20	0/20
B-153-R-3			+	+	19/20	0/20	0/20	1/20

ERGEBNISSE

<b>B-346-B-1</b>			+	+	20/20	0/20	0/20	0/20
<b>B-346-B-2</b>	+	+	+	+	18/20	0/20	2/20	0/20
<b>B-346-B-3</b>			+	+	18/18	0/18	0/18	0/18
<b>B-355-C-1</b>			+	+	12/13	0/13	1/13	0/13
<b>B-355-C-2</b>	+	+	+	+	26/27	0/27	1/27	0/27
<b>B-355-C-3</b>			+	+	8/8	0/8	0/8	0/8

**Tab. 52: Überblick über die Expression des *gfp*- bzw. *bar*-Gens der hemizygoten T<sub>1</sub>-Pflanzen und ihrer T<sub>2</sub> und T<sub>3</sub> Nachkommen.**

Pflanzen	T <sub>1</sub> -Pflanze		T <sub>2</sub> -Pflanze		T <sub>3</sub> -Pflanze (Expression/Zahl der Individuen)			
	<i>gfp</i> - Expression	<i>bar</i> - Expression	<i>gfp</i> - Expression	<i>bar</i> - Expression	<i>Gfp</i> + <i>Bar</i> +	<i>Gfp</i> + <i>Bar</i> -	<i>Gfp</i> - <i>Bar</i> +	<i>Gfp</i> - <i>Bar</i> -
<b>B-153-Q-1</b>	+	+	+	-	2/15	4/15	0/15	9/15
<b>B-153-Q-2</b>			+	+	9/17	0/17	0/17	8/17
<b>B-153-Q-3</b>			-	-	0/20	0/20	0/20	0/20
<b>B-153-Q-4</b>			+	+	8/17	0/17	0/17	9/17
<b>B-153-Q-5</b>			+	+	1/18	0/18	14/18	3/18

### 3.10.2 Das Cytokininmuster der T<sub>2</sub>-Planzen

Der Gehalt der dominierenden Cytokinine wurde wie bei der Untersuchung der T<sub>1</sub>-Generation beschrieben, ermittelt.

#### 3.10.2.1 Cytokiningehalte in Transformaten mit dem Plasmid pSG516

Von diesen Pflanzen wurde die homozygoten und azygoten Pflanzen der Linie Pw-410 (Tab. 53) untersucht.

Mit einer Ausnahme waren die Konzentrationen der drei Cytokininspezies Isopentenyladenosin, *t*-Zeatinribosid und Dihydrozeatinribosid sowie der Cytokinin-*O*-Glucoside in den transgenen Pflanzen immer geringfügig niedriger (90%) als bei den azygoten Pflanzen. Dihydrozeatinribosid war die einzige von den drei Cytokininspezies, deren Konzentrationen in den transgenen Pflanzen 1,5-fach höher lag als in den azygoten.

## ERGEBNISSE

Der Gesamtgehalt der freien Cytokinine war bei allen Pflanzen gleich. Rechnet man die *O*-Glucoside dazu, enthielten die homozygoten 0,9-fach weniger Phytohormone als die azygote Pflanzen (Tab. 53). Alle diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

**Tab. 53: Konzentration der drei Cytokininspezies und ihrer *O*-Glucoside (pmol/g FW) in voll entwickelten Fahnenblättern der T<sub>2</sub>-Pflanzen der Linie Pw-410, Gluc: Glucosidasebehandlung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert.**

Pw-410	Cytokininspezies						
	<i>t</i> -Zeatinribosid		Dihydrozeatinribosid		Isopentenyladenosin	Gesamtgehalt	
	<i>ohne Gluc.</i>	<i>nach Gluc.</i>	<i>ohne Gluc.</i>	<i>nach Gluc.</i>		<i>ohne Gluc</i>	<i>nach Gluc</i>
<b>Homozygote Pflanzen (n=3)</b>	195,3 ± 40,2	202,4 ± 96,3	<b>89,4 ± 96,4</b>	119,3 ± 106,4	52,5 ± 9,0	<b>337,2</b>	374,2
<b>Azygote Pflanzen (n=3)</b>	<b>217,2 ± 26,3</b>	<b>229,6 ± 115,7</b>	59,9 ± 54,2	<b>122,0 ± 117,2</b>	<b>53,2 ± 0,1</b>	330,3	<b>404,8</b>

### 3.10.2.2 Cytokiningehalte in Transformaten mit dem Plasmid pS40-IPT

Von diesen Pflanzen wurden die homozygoten, hemizygoten und azygoten Linien B-156, B-346 (Tab. 54) und B-355 untersucht.

Der Gesamtgehalt an freien Cytokinen war bei den homozygoten Pflanzen zwischen 4 und 38 % höher als bei den Azygoten, wobei eine entsprechend höhere Konzentration auch bei den *O*-Glucosiden gefunden wurde. Bei den hemizygoten Pflanzen waren die Verhältnisse im Prinzip wie bei den homozygoten, was auch für die *O*-Glucoside zutrifft. Alle diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

**Tab. 54: Konzentration der drei Cytokininspezies und ihrer *O*-Glucoside (pmol/g FW) in voll entwickelten Fahnenblättern der T<sub>2</sub>-Pflanzen der Linie B-346, Gluc: Glucosidasebehandlung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert.**

B-346	Cytokininspezies						
	<i>t</i> -Zeatinribosid		Dihydrozeatinribosid		Isopenenyladenosin	Gesamtgehalt	
	<i>ohne Gluc.</i>	<i>nach Gluc.</i>	<i>ohne Gluc.</i>	<i>nach Gluc.</i>		<i>ohne Gluc</i>	<i>nach Gluc</i>
<b>Homozygote Pflanzen (n=4)</b>	236,7 ± 79,6	<b>330,5 ± 99,6</b>	<b>114,2 ± 24,3</b>	160,0 ± 73,8	119,1 ± 63,1	470	609,6
<b>Hemizygoten Pflanzen (n=4)</b>	<b>237,6 ± 184,8</b>	270,5 ± 130,2	99,6 ± 34,1	<b>171,0 ± 88,0</b>	<b>227,7 ± 93,3</b>	<b>564,9</b>	<b>669,2</b>
<b>Azygote Pflanzen (n=3)</b>	188,8 ± 95,5	209,2 ± 71,1	78,3 ± 36,6	124,5 ± 75,5	85,1 ± 43,6	352,2	418,8

Nach Deglycosylierung zeigten die homozygoten und hemizygoten Pflanzen fast durchwegs höhere Cytokiningehalte als die azygoten (Tab. 55); somit waren auch die Cytokinin-*O*-Glucoside bei den transgenen und azygoten Pflanzen fast immer erhöht. Die Konzentration an Zeatinribosid war bei den homozygoten Pflanzen der Linie B-156 um den Faktor 2,0 höher. Dihydrozeatinribosid- und Isopentenyladenosin-gehalte waren bei den hemizygoten Pflanzen der Linie B-346 um den Faktor 1,4 bzw. 2,7 höher als die azygoten.

Die Konzentration der drei Cytokininspezies als freie cytokinine oder als Konjugate (Tab. 55) war immer höher bei einer von beiden transgenen Pflanzen, aber nicht immer bei den homozygoten Pflanzen.

**Tab. 55: Verhältnis des Gesamt-cytokiningehalte in den verschiedenen Linien der T<sub>2</sub>-Pflanzen im Vergleich zu den azygoten Pflanzen. Fett gedruckte Zahlen zeigen die maximalen Werte für die einzelnen Cytokininspezies, bzw. für die einzelnen homozygoten und hemizygoten Linien. n.u. nicht untersucht.**

		Cytokinin											
		<i>t</i> -ZR			DHZR			IPA			Total		
Linie		B-156	B-346	B-355	B-156	B-346	B-355	B-156	B-346	B-355	B-156	B-346	B-355
<b>Homozygote</b>		<b>2,0-fach</b>	1,6-fach	1,9-fach	1,0-fach	<b>1,3-fach</b>	0,7-fach	2,5-fach	1,4-fach	<b>1,8-fach</b>	<b>1,8-fach</b>	1,5-fach	1,5-fach
<b>Hemizygote</b>		n.u.	<b>1,3-fach</b>	n.u.	n.u.	<b>1,4-fach</b>	n.u.	n.u.	<b>2,7-fach</b>	n.u.	n.u.	<b>1,6-fach</b>	n.u.

### 3.10.3 RT-PCR Analyse der T<sub>2</sub>-Pflanzen.

Die Untersuchung Nachkommen (eine azygote und eine oder zwei transgene) der T<sub>1</sub>-Linien (außer B-175.1) zur Analyse der T<sub>2</sub>-Pflanzen sind in Tabelle 56 zusammengestellt.

In der Nachkommenschaft der Pw-410-J, sieht man z.B., dass alle Pflanzen das *ipt*-Gen enthielten, aber weder *gfp*-noch *bar*-Expression zeigten.

Beim Seneszenz-Versuch (s. 2.2.8.2) wurde in voll entwickelten, abgeschnittenen Fahnenblättern am Anfang und am Ende (ungefähr sieben und zehn Tage) die durch Seneszenz ausgelöste Expression des *ipt*-Gens durch RT-PCR geprüft. Die RT-PCR „direkt aus der Pflanze“ wurde mit Fahnenblatt-Material zwischen Stadium 80 (*Dough development*) und 91 (*Seed hard*) durchgeführt. Alle drei RT-PCR Analysen zeigten, dass die Pflanzen das *ipt*-Gen nicht immer, wie erwartet am Ende der Seneszenzphase der Fahnenblätter exprimierten. Nur die Nachkommen der acht von elf Linien, die positiv für die PCR-Analyse des *ipt*-Gens zeigten, zeigten es auch bei der RT-PCR.

ERGEBNISSE

**Tab. 56: Zusammenfassung der Ergebnisse der Analyse der T<sub>2</sub>-Pflanzen. Angegeben ist jeweils die Anzahl der hinsichtlich der einzelnen Parameter positiven Pflanzen.**

Linie	Anzahl der gekeimten Pflanzen	Nachweis des <i>ipt</i> -Gens	GFP- Fluoreszenz	PPT Resistenz	RT-PCR (Seneszenz-Versuch)		RT-PCR (direkt aus die Pflanze)
					Am Anfang	Am Ende	
Pw-317-S	3	0 (Azygote)	0	0	0	0	0
Pw-317-T	5	5 (Hemizygote)	4	4	0	0	0
Pw-410-A	5	5 (Homozygote)	5	5	0	5 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup>
Pw-410-J	3	3 (Hemizygote)	0	0	0	0	0
Pw-410-T	5	0 (Azygote)	0	0	0	0	0
Kontrolle- Bobwhite	3	0	0	0	0	0	0
B-153-J	4	0 (Azygote)	0	0	0	0	0
B-153-Q	5	4 (Hemizygote)	4	3	0	0	0
B-153-R	3	3 (Homozygote)	3	3	0	0	1 <sup>1</sup>
B-156-E	5	0 (Azygote)	0	0	0	0	0
B-156-H	4	4 (Homozygote)	0	4	0	4	4
B-176-C	6	0 (Azygote)	0	0	0	0	0
B-176-J	6	6 (Homozygote)	6	5	0	6	6
B-346-A	3	3 (Homozygote)	3	3	0	3	3
B-346-B	3	3 (Homozygote)	3	3	0	3	3
B-346-I	5	0 (Azygote)	0	0	0	0	0
B-355-A	3	3 (Homozygote)	3	3	0	3	3
B-355-C	3	3 (Homozygote)	3	3	0	3	3
B-355-N	3	0 (Azygote)	0	0	0	0	0
Kontrolle- Klein Brujo	6	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup> Schwaches Signal

### 3.11 ERTRAGSLEISTUNG DER T<sub>2</sub>-PFLANZEN

Hier wurden als „morphometrische Daten“ nicht nur die Pflanzengröße, die Bestockung etc. wie bei den T<sub>1</sub>-Pflanzen, sondern auch die Blattanzahl, die Blattlänge (Blattspreite und Blattscheide) und die Länge des Pedunculus (Achsenabschnitt zwischen Fahnenblatt und Ähre) bestimmt. Bei den „Ertragsparametern“ wurden auch die oberirdische Biomasse und der Ernteindex, d.h. der prozentuale Anteil der Samen-Biomasse an der gesamten oberirdischen Biomasse gemessen. Für jede Linie wurden nur die homozygoten Pflanzen, deren RT-PCR-Analyse die Expression des *ipt*-Gens zeigten (Tab. 56), und die azygoten Pflanzen untersucht. Deswegen wurden die Linien Pw-317 und B-153 ausgeschlossen.

#### 3.11.1 Die Linie Pw-410 mit der Nutzgenkassette pSG516

Bei der Linie Pw-410 gab es zwischen den „morphometrischen Daten“ der homozygoten und azygoten Pflanzen keine statistisch signifikanten Unterschiede, wohl aber Tendenzen (Tab. 57). Die azygoten Pflanzen erreichten generell etwas höhere Werte, insbesondere bei Pflanzenhöhe, Blattanzahl, Ährenlänge und Pedunculuslänge, (5,5 %; 8 %; 2,4 % und 13,5 %). Die homozygoten Pflanzen bestockten besser und hatten längere Blätter. Alle azygoten Pflanzen entwickelten Körner an den ährentragenden Trieben und die Bestockung war um 4 % höher als bei den homozygoten Linien.

**Tab. 57: Überblick über „morphometrische Daten“ der Linie Pw-410. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert. \*Gemessen wurden der Haupttrieb und zwei Treiber.**

Pw-410	Pflanzenhöhe (cm)	Blattanzahl*	Gesamt-Bestockungsgrad	Anzahl fruchtbarer Triebe.	Ährelänge* (cm)	Fahnenblattlänge* (cm)	Pedunculus* (cm)
<b>Homozygote (n=5)</b>	59,8 ± 5,8 <sup>a</sup>	6,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	<b>8,4 ± 1,1<sup>a</sup></b>	7,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	<b>42,8 ± 4,0<sup>a</sup></b>	19,2 ± 3,8 <sup>a</sup>
<b>Azygote (n=8)</b>	<b>63,3 ± 6,5<sup>a</sup></b>	<b>7,4 ± 0,7<sup>a</sup></b>	7,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	<b>7,5 ± 2,1<sup>a</sup></b>	<b>8,4 ± 0,4<sup>a</sup></b>	42,0 ± 3,7 <sup>a</sup>	<b>22,2 ± 2,9<sup>a</sup></b>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach dem Mann-Whitney U-Test

Bei den „Ertragsparametern“ waren die Parameter der azygoten Pflanzen überwiegend höher als die der homozygoten außer beim durchschnittlichen Korngewicht (Tab. 58). Bei der Zahl der Körner pro Ähre und dem Ernteindex war der Unterschied signifikant. Die azygoten Pflanzen hatten um ein Drittel mehr Körner pro Ähre und der Ernteindex war um ein Viertel höher als bei den homozygoten Pflanzen. Auch bei der Gesamtzahl der Körner und beim Korn Gewicht lagen die azygoten Pflanzen mit jeweils einem Drittel höher.

ERGEBNISSE

**Tab. 58: Überblick über die „Ertragsparameter“ der Linie Pw-410. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert.**

Pw-410	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)	Biomasse (g)	Ernteindex
<b>Homozygote (n=5)</b>	162,0 ± 93,8 <sup>a</sup>	21,5 ± 10,8 <sup>a</sup>	6,5 ± 3,6 <sup>a</sup>	<b>40,9 ± 5,3<sup>a</sup></b>	15,6 ± 3,1 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>Azygote (n=8)</b>	<b>244,4 ± 67,0<sup>a</sup></b>	<b>32,7 ± 3,8<sup>b</sup></b>	<b>9,5 ± 2,2<sup>a</sup></b>	39,6 ± 5,2 <sup>a</sup>	<b>17,9 ± 4,1<sup>a</sup></b>	<b>0,53 ± 0,0<sup>b</sup></b>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach dem Mann-Whitney U-Test

3.11.2 Vier Linien mit der Nutzgenkassette pS40-IPT

Der Trend bei den „morphometrischen Daten“ ging zu den höheren Werten bei den homozygoten Pflanzen. Die Unterschiede waren z.T. statistisch signifikant. Bei insgesamt 42 untersuchten Pflanzen fanden sich immer Ähren-tragende Triebe. Bei den Linien B-346 und B-355 waren alle Ähren-tragenden Triebe auch fruchtbar. Bei den anderen zwei Linien B-156 und B-176 (Tab. 59 und 60) hingegen lagen die Anteile der fruchtbaren Triebe der homozygoten (91 % und 93 %) und der azygoten Pflanzen (87 % und 89 %) nicht wesentlich auseinander.

**Tab. 59: Überblick über „morphometrische Daten“ der Linie B-156. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert. \*Gemessen wurden der Haupttrieb und zwei Treiber.**

B-156	Pflanzenhöhe (cm)	Blattanzahl*	Gesamt-Bestockungsgrad	Anzahl fruchtbarer Triebe.	Ährelänge* (cm)	Fahnenblattlänge* (cm)	Pedunculus* (cm)
<b>Homozygote (n=4)</b>	<b>63,9 ± 2,7<sup>a</sup></b>	<b>8,8 ± 0,5<sup>a</sup></b>	<b>7,5 ± 3,1<sup>a</sup></b>	<b>6,8 ± 3,0<sup>a</sup></b>	<b>9,9 ± 1,0<sup>a</sup></b>	<b>46,1 ± 2,2<sup>a</sup></b>	<b>27,8 ± 1,9<sup>a</sup></b>
<b>Azygote (n=6)</b>	52,2 ± 6,5 <sup>b</sup>	7,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	6,7 ± 2,0 <sup>a</sup>	5,8 ± 1,6 <sup>a</sup>	7,5 ± 1,8 <sup>a</sup>	35,1 ± 5,2 <sup>b</sup>	16,2 ± 4,3 <sup>b</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach dem Mann-Whitney U-Test

**Tab. 60: Überblick über „morphometrische Daten“ der Linie B-176. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert. \*Gemessen wurden der Haupttrieb und zwei Treiber**

B-176	Pflanzenhöhe (cm)	Blattanzahl*	Gesamt-Bestockungsgrad	Anzahl fruchtbarer Triebe.	Ährelänge* (cm)	Fahnenblattlänge* (cm)	Pedunculus* (cm)
<b>Homozygote (n=6)</b>	<b>62,6 ± 7,6<sup>a</sup></b>	<b>8,5 ± 1,0<sup>a</sup></b>	5,7 ± 2,0 <sup>a</sup>	5,3 ± 2,3 <sup>a</sup>	<b>10,0 ± 1,1<sup>a</sup></b>	<b>43,8 ± 3,3<sup>a</sup></b>	<b>24,3 ± 2,8<sup>a</sup></b>
<b>Azygote (n=6)</b>	56,3 ± 6,9 <sup>a</sup>	8,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	<b>8,8 ± 3,8<sup>a</sup></b>	<b>7,8 ± 4,9<sup>a</sup></b>	8,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	42,1 ± 3,7 <sup>a</sup>	22,4 ± 2,6 <sup>a</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach dem Mann-Whitney U-Test

Die homozygoten Pflanzen der Linie B-156 zeigten auch höhere Werte hinsichtlich aller „Ertragsparametern“ (Tab. 61). Die Gesamtzahl der Körner, das Gesamt-Korngewicht und die

## ERGEBNISSE

Biomasse waren jeweils um 40 %; 42 % und 37 % höher als bei den azygoten Pflanzen, wobei die Unterschiede statistisch signifikant waren. Die Kornzahl pro Ähre waren bei den homozygoten Pflanzen um 30 % höher als bei den azygoten; jedoch war der Unterschied ebenso wenig statistisch signifikant, wie auch das um 4,1 % höhere durchschnittliche Korngewicht.

Auch bei den Linien B-176 (Tab.62) und B-346 (s. Anhang) überwogen die Parameter der homozygoten die der azygoten Pflanzen. Signifikante Unterschiede zu den azygoten Pflanzen gab es bei der Kornzahl pro Ähre (jeweils 29 % und 15,5 %). Das durchschnittliche Korngewicht war bei den Homozygoten der Linie B-176 um 11,4 % höher, während bei der Linie B-346 die Körner der azygoten Pflanzen geringfügig schwerer waren (6 %). Bei der Linie B-355 (s. Anhang) hatten die azygoten Pflanzen mehr Körner pro Ähre und ein höheres durchschnittliches Korngewicht.

Die oberiridische Biomasse der homozygoten war bei allen vier Linien größer; z.T. war der Unterschied auch statistisch signifikant. Die Auswirkung des *ipt*-Gens auf den Ernte-index der homozygoten und azygoten Linien war unterschiedlich, aber in keinem Fall signifikant.

**Tab. 61: Überblick über die „Ertragsparameter“ der Linie B-156. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert.**

B-156	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)	Biomasse (g)	Ernteindex
<b>Homozygote (n=4)</b>	<b>171,5 ± 41,7<sup>a</sup></b>	<b>26,9 ± 4,7<sup>a</sup></b>	<b>7,4 ± 1,2<sup>a</sup></b>	<b>43,6 ± 3,7<sup>a</sup></b>	<b>20,2 ± 5,4<sup>a</sup></b>	<b>0,37 ± 0,0<sup>a</sup></b>
<b>Azygote (n=6)</b>	<b>103,5 ± 33,8<sup>b</sup></b>	<b>18,9 ± 9,0<sup>a</sup></b>	<b>4,3 ± 1,6<sup>b</sup></b>	<b>41,8 ± 4,1<sup>a</sup></b>	<b>12,8 ± 0,6<sup>b</sup></b>	<b>0,34 ± 0,1<sup>a</sup></b>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach dem Mann-Whitney U-Test

**Tab. 62: Überblick über die „Ertragsparameter“ der Linie B-176. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem jeweils höheren Wert.**

B-176	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)	Biomasse (g)	Ernteindex
<b>Homozygote (n=6)</b>	<b>188,2 ± 77,9<sup>a</sup></b>	<b>36,4 ± 7,7<sup>a</sup></b>	<b>7,6 ± 3,4<sup>a</sup></b>	<b>40,2 ± 5,3<sup>a</sup></b>	<b>16,1 ± 6,4<sup>a</sup></b>	<b>0,47 ± 0,0<sup>a</sup></b>
<b>Azygot (n=6)</b>	<b>215,0 ± 159,9<sup>a</sup></b>	<b>25,8 ± 8,9<sup>b</sup></b>	<b>6,8 ± 5,0<sup>a</sup></b>	<b>35,6 ± 14,4<sup>a</sup></b>	<b>16,0 ± 8,0<sup>a</sup></b>	<b>0,38 ± 0,1<sup>a</sup></b>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach dem Mann-Whitney U-Test

## 4 DISKUSSION

Durch die Übertragung eines Isopentenyl-Transferase-Gens (*ipt*) aus *Agrobacterium tumefaciens* sollte die **Cytokininbiosynthese** in Weizen (*Triticum aestivum* L.) gesteigert werden. Durch den Einsatz entsprechender Promotoren (*SAG12* und *HvS40*) sollte eine Seneszenz-spezifische Expression des Gens die Steigerung der Cytokininproduktion zu Beginn der Seneszenz auslösen und durch eine autoregulatorische Schleife (*feedback-loop*) die Akkumulation von Cytokinin verhindern (Gan and Amasino, 1997). Dadurch sollte es zu einer deutlichen Verzögerung der Blattseneszenz kommen was im optimalen Fall zu einer Ertragssteigerung führen könnte. Zuvor wurde die Funktionsfähigkeit beider Promotoren in Weizen mit Hilfe eines Reportergens (*uidA*-) geprüft (Krupinska *et al.*, 2002, Gan and Amasino 1995).

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von 22 argentinischen Weizenvarietäten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kallusbildung aus unreifen Embryonen und anschließender Regeneration ganzer Pflanzen. Aufgrund ihrer hohen Werte bei der Kallusbildung und -regeneration wurde Klein Brujo als geeignetste Sorte ermittelt und für die verschiedenen Transformationsvarianten und Gewebekulturstrategien eingesetzt. Als Transformationstechnik wurde der Mikroprojektilbeschuss und die Cotransformation des selektierbaren Marker- und Reportergens mit dem *ipt*-Gen eingesetzt. Sofern es möglich war, wurde die *gfp*-Expression ohne Selektionsdruck während der Gewebekulturstrategie als Methode verwendet, um die transgenen Individuen zu selektieren. Die genannte Vorgehensweise sollte ferner den Weg offen halten, markierungsgenfreie Pflanzen zu erhalten. Wenn die Plasmide ungekoppelt eingebaut werden, ergibt sich in der Nachkommenschaft der cotransformierten Elternpflanze die Möglichkeit, dass markierungsgenfreie Transgene erhalten werden könnten (Yoder and Goldsbrough, 1994; Pedersen *et al.*, 1997). Die Konstruktion der Nutzgenkassette aus *HvS40*-Promotor und *ipt*-Gen wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

### 4.1 SCREENING VON WEIZENVARIETÄTEN

Eine hohe Regenerationsfähigkeit von kommerziellen Weizensorten ist eine primäre Voraussetzung für eine effiziente gentechnische Veränderung dieser Getreideart (Barro *et al.*, 1999). Hierbei war es das Ziel, durch ein Screening von 22 kommerziellen argentinischen Weizensorten herauszufinden, welche die beste Kapazität für Sprossbildung aus embryogenem Scutellarkallus und Pflanzenregeneration hat.

Die hier untersuchten argentinischen Sorten zeigten bei vier experimentellen Varianten (zwei verschiedene Embryostadien und zwei verschiedene Auxinkonzentrationen) erhebliche

Unterschiede bei sechs untersuchten Parametern (Scutellarkallus-Induktion, Kallusproliferation der Scutellumoberfläche, vorzeitige Keimung unreifer Embryonen, Regeneration, Sprossbildung und Kultureffizienz). Die Scutellarkallus-Induktion und Regenerationsfähigkeit der unreifen Embryonen waren vom Genotyp, vom Entwicklungsstadium und der Auxinkonzentration (2,4-D) sowie von deren Wechselwirkung abhängig.

Wie schon von Redway *et al.* (1990) beschrieben, waren die Embryonen im Entwicklungsstadium H am besten für die **Bildung von embryogenem Kallus**. Außerdem fanden Rasco-Gaunt *et al.* (2001), dass die Proliferation von Scutella bei einer Größe zwischen 0,5 und 1,5 mm am besten war. Viertel *et al.* (1998) fanden bei 18 deutschen Sommerweizensorten einen geringfügigen, nicht signifikanten Unterschied der Auxinkonzentration (1 oder 2 mg/l 2,4-D im Medium) auf die Scutellarkallus. In der vorliegenden Arbeit, in der ebenfalls Embryonen im Entwicklungsstadium H verwendet wurden zeigte sich aber doch ein signifikant besseres Ergebnis mit der niedrigeren der beiden Auxinkonzentrationen, wie es auch von Sears and Deckard (1982), Maddock *et al.* (1983) und Dagüstü (2008) berichtet wurde. Eine Konzentration von 2 mg/l 2,4-D war hingegen für das Entwicklungsstadium W besser (s. auch Almouslem *et al.* (2005)).

Die **Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche** ist insofern ein wichtiger Parameter, weil dieses Gewebe für den biolistischen Gentransfer verwendet wird. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Viertel *et al.* (1998) war die Kallusproliferation unabhängig von der verwendeten Auxinkonzentration, sowohl im Entwicklungsstadium H wie auch im Stadium W. Hinsichtlich dieses Parameters war das Entwicklungsstadium wichtiger als die Auxinkonzentration. Nur im Stadium H ergab sich eine enge Korrelation zwischen der Scutellarkallus-Induktionsrate und der Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche, wie es auch von Viertel *et al.* (1998) berichtet wurde.

Hinsichtlich der **vorzeitigen Keimung unreifer Embryonen** spielte sowohl das Alter der Embryonen (Maddock *et al.*, 1983, He *et al.*, 1988) wie auch die Auxinkonzentration eine wichtige Rolle. Um die ungünstige vorzeitige Keimung zu minimieren, war die Kombination aus Embryonen im Entwicklungsstadium H mit der höheren Auxinkonzentration (2 mg 2,4-D/l) am besten (vgl auch Ozias-Akins and Vasil, 1982, 1983; He *et al.*, 1986). Bapat *et al.* (1988) beschrieben, dass Weizen-Genotypen mit Neigung zu vorzeitiger Keimung unreifer Embryonen ein höheres Scutellarkallus-Induktionspotenzial hätten. Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.

Auch die **Regeneration** von Weizenpflanzen aus Kallusproliferation des Scutellums erwies sich als stark Genotyp-abhängig, wie es auch schon in anderen Studien beobachtet worden war (Sears and Deckard, 1982; Maddock *et al.*, 1983; Viertel *et al.*, 1998; Özgen *et al.*, 1998; Barro *et al.*, 1999; Keresa *et al.*, 2003; Talukder *et al.*, 2004; Dagüstü, 2008). Dabei spielt die während der Scutellarkallus-Induktion verwendete Auxinkonzentration eine wesentliche Rolle, zumindest wenn Embryonen im Entwicklungsstadium H verwendet wurden (Maddock *et al.*, 1983; Viertel *et al.*, 1998, Rasco-Gaunt *et al.*, 2001).

Im Ergebnis war also das Entwicklungsstadium H signifikant besser geeignet als das Entwicklungsstadium W (Rasco-Gaunt *et al.* 2001). Die fehlende Korrelation zwischen der Scutellarkallus-Induktionsrate und der Regenerationsrate (Sears und Deckard 1982; Maddock *et al.*, 1983; Chowdhury *et al.* 1991; Özgen *et al.* 1996, 1998) deutet darauf hin, dass beide Phänomene durch unterschiedliche Gene oder Gen-Kombinationen kontrolliert werden. Dem widerspricht die von Viertel *et al.* (1998), Barro *et al.* (1999) und Dagüstü (2008) gefundene enge Korrelation beider Parameter. Da letztere auch andere Ursachen haben können, ist die Erklärung noch offen.

Nach der **Kultureffizienz** hat das Entwicklungsstadium H sich unter beiden Phytohormone-Konzentration besser eignet. Wie bei der Scutellarkallus-Induktionsrate war 1 mg/l 2,4-D geeigneter beim Entwicklungsstadium H und 2 mg/l 2,4-D beim Entwicklungsstadium W.

Ebenso war die Verwendung der niedrigeren Auxinkonzentration günstiger als die höhere, obwohl damit nur etwa zwei Drittel der Sorten bessere Ergebnisse erzielten. Die **Sprossbildung** war hauptsächlich vom Genotyp (Özgen *et al.*, 1998) und nicht vom Entwicklungsstadium oder von der Auxin-Konzentration abhängig. Das Entwicklungsstadium H in Kombination mit 1 mg/l 2,4-D erzielte insgesamt die besseren Resultate, aber 32 % der Sorten reagierten besser auf 2 mg/l 2,4-D. Diese Ergebnisse kontrastieren mit denjenigen von Viertel *et al.* (1998), wo in allen Fällen die Sorten, die mit 2 mg/l 2,4-D induziert worden waren, schlechter reagierten haben. Die Sprossbildung war unabhängig von anderen Parametern, so wie es Özgen *et al.* (1998) gefunden hatten.

Als Regenerationsmedium wird im Regelfall das gleiche Medium wie bei der Scutellarkallus-Induktion verwendet, jedoch entweder ohne Phytohormone (Maddock *et al.*, 1983; He *et al.*, 1988; Chowdhury *et al.*, 1991; Özgen *et al.*, 1998; Varshney and Altpeter, 2001; Almouslem *et al.*, 2005; Dagüstü, 2008) oder mit deutlich geringerer Konzentration an 2,4-D (Sears and Deckard, 1982; He *et al.*, 1988; Keresa *et al.*, 2003) oder mit Cytokinin und niedriger Auxin-Konzentration (Ozias-Akins *et al.*, 1982; Redway *et al.*, 1990; Viertel *et al.*, 1998; Talukder *et*

*al.*, 2004). Das Regenerationsmedium ist somit als Variable für die Ausschöpfung des Regenerationspotenzials mancher Sorten zu prüfen.

Die beiden Variablen erbrachten bei den verschiedenen Weizensorten unterschiedliche Ergebnisse. Eine der getesteten Sorte bildete überhaupt keinen embryogenen Scutellarkallus unter den zwei Kombinationen. Deswegen lassen sich die Bedingungen nicht für ein breites Spektrum von Genotypen standardisieren. Das heißt, dass neue Sorten immer unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden müssen. Die Sorte, die am aussichtsreichsten reagierte, ist „Klein Brujo“.

### **4.2 DER EINFLUSS DER ZUSAMMENSETZUNG DES MEDIUMS**

Die beiden Medien L3-5 und MS wurden in verschiedenen Modifikationen (Tab. 16) für die Transformation der Sorte Klein Brujo verwendet.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Parameter (Scutellarkallus-Induktion, Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche, vorzeitige Keimung unreifer Embryonen, Regeneration, Sprossbildung und Kultureffizienz), von der Zusammensetzung des Mediums, insbesondere von der Auxinkonzentration und vom Maltosegehalt beeinflusst wurden. Allerdings waren die Effekte nicht gekoppelt.

Das MS-Medium mit 3 % Maltose und 1 mg/l 2,4-D war bei der Scutellarkallus-Induktionsrate besser als L3-5- und MS-Medium mit 9 % Maltose mit der gleichen Auxin-Konzentration. Das MS- (Barcelo and Lazzeri, 1995, modifiziert) und das L3-5-Medium (Jähne *et al.*, 1991, modifiziert) unterscheiden sich in mehrfacher Hinsicht. Beim MS-Medium fehlen bestimmte Vitamine und Kohlenhydrate, Aminosäuren und organische Säuren und es enthält Maltose statt Saccharose. Das Verfestigungsmittel war Agar beim MS- und Gelrite beim L3-5 Medium. Wie sich zeigte, spielte die Zusammensetzung des Mediums eine besondere Rolle bei der Scutellarkallus-Induktion sowie bei der Sprossbildung der Sorte Brujo. Eine Erhöhung der Maltosekonzentration verringerte die Embryogenese. Ebenso wurde die Regenerationsrate vermindert. Die gleiche Beobachtung wurde bei der Erhöhung der Auxinkonzentration gemacht. Offensichtlich spielt die Art der Kohlenstoffquelle auch eine wichtige Rolle: Denn im Gegensatz zu der hier vorgestellten Beobachtung fanden Rasco-Gaunt *et al.* (2001) einen Anstieg der somatischen Embryogenese bei der Sorte „Florida“, aber nicht bei der Sorte „Riband“ sowie eine Verbesserung der Sprossinduktionsrate bei beiden Sorten, wenn das Medium 9 % statt 3 % Saccharose enthielt. Bei beiden Maltosekonzentrationen der MS-Medium zeigte sich ein Effekt der 2,4-D Konzentrationen, wobei sich die höhere negativ auf die Sproßinduktionsrate auswirkte.

Barro *et al.* (1998) fanden auch, dass eine von zwei Sorten „Pavon“ mit einer viel besseren Embryogenese und Regeneration auf eine niedrige Auxinkonzentration (1 mg/l 2,4-D) reagierte, während es für die andere Sorte „Florida“ keinen signifikanten Effekt gab. In der vorliegenden Arbeit ergab sich der deutlichste Unterschied hinsichtlich des Mediums bei der Sprossbildung, die bei Verwendung des L3-5 Mediums mit der niedrigen Auxinkonzentration am höchsten war. Dies gilt aber nur für den hier untersuchten Genotyp „Klein-Brujo“. Die Nutzung von Medien mit 1 mg 2,4-D/l wurde für die weiteren Experimente bevorzugt. Außerdem gilt, dass je geringer die 2,4-D-Konzentration ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit einer somaklonalen Variation (Jones, 2005).

### 4.3 DIE TRANSFORMATIONSVEKTOREN

Eine der vier Nutzkassetten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, befindet sich im Plasmid pS40-IPT. Das Plasmid wurde durch die Kombination des *HvS40* Promotors aus pS40-GUS (Krupinska *et al.*, 2002) und dem *ipt*-Gen mit *nos*-Terminator aus pSG516 (Gan and Amasino, 1995) neu konstruiert (Abb. 13). Der *HvS40*-Promotor ist ein ca. 2 kb großer Bereich stromaufwärts der das *HvS40*-Protein codierenden Region (Krupinska *et al.*, 2002). Das *HvS40*-Gen aus *Hordeum vulgare* und das *SAG12*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* (Lohman *et al.*, 1994) gehört zu den Seneszenz-assoziierten Genen (SAGs), deren Expression beim Eintritt der Seneszenz hochreguliert werden. Zusammen mit dem *ipt*-Gen und dem *nos*-Terminator war der *SAG12*-Promoter im Plasmid pSG516 erfolgreich in transgenem Tabak eingesetzt worden, wodurch es zu einer deutlichen Verzögerung der Blattseneszenz und einer vermehrten Blüten-, Biomasse- und Samenproduktion kam (Gan and Amasino, 1995). Ähnliche Konstrukte waren in Reis (Lin *et al.*, 2002), Mais (Young *et al.*, 2004), Salat (McCabe *et al.*, 2001) und Brokkoli (Che *et al.*, 2001) mit Erfolg verwendet worden. Das Plasmid wurde auch in Weizen eingeführt (Xi *et al.*, 2004a, b und Sykorova *et al.*, 2008).

Alle Nutzgene wurden zusammen mit dem Plasmid pGFPBAR als Träger der selektierbaren Marker- und Reporter genen in Cotransformation übertragen. Die Verwendung von *gfp* bei der Weizentransformation wurde bisher verschiedentlich berichtet (Jordan *et al.*, 2000; McCormack *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 1996; Huber 2002). Die *gfp*-Expression konnte gut im lebenden Weizengewebe beobachtet werden.

### 4.4 DIE TRANSFORMATION VON TRITICUM AESTIVUM L

#### 4.4.1 Die transiente Expression des *uidA*-Gens in pS40-GUS und in pSG506

Zunächst musste die Funktion des SAG12- (Lohman et al., 1994) und HvS40-Promotors (Krupinska *et al.*, 2002) in Klein-Brujo geprüft werden wofür das Reportergen *uidA* verwendet wurde. Die *uidA*-Gen-Kassette befand sich in den Plasmiden pS40-GUS und pSG506, die noch nicht für die Transformation von Weizen verwendet worden waren. Ihre Funktionsfähigkeit wurde in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben des Weizens auf der Ebene der transienten Expression untersucht. Die beiden Plasmide wurden zusammen mit der *gfp*-Kassette pGFPBAR biolistisch eingebracht, in der das *gfp*-Gen unter Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors steht. In der vorliegenden Arbeit wurde die transiente *gfp*-Expression in der Epidermis der untersuchten jungen und adulten (Abb. 24) aber nicht in den ausdifferenzierten älteren Geweben beobachtet. Der Anteil an transformierten Zellen war äußerst gering. Diese Beobachtungen stimmen mit Untersuchungen von Huber (2002) und Fettig (1999) überein, welche nachweisen konnten, dass die transiente Expression vor allem in den oberen beiden Zellschichten beschossener Karyopsen und Scutella unreifer Embryonen stattfand.

Das *HvS40*-Gen wurde in Gerstefahnenblättern unter natürlichen Seneszenzbedingungen exprimiert (Krupinska *et al.*, 2002; Dähnhart, 2003). Durch *in situ*-Hybridisierung wurde es ausschließlich im Mesophyllgewebe des Seneszenz-induzierten Gerstenprimärblattes lokalisiert (Krupinska *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu war die transiente Expression des *uidA*-Gens unter Kontrolle des *HvS40*-Promotors weder in Weizen- noch in Gerstengeweben (in verschiedenen Entwicklungsstadien) nachweisbar. Da die *gfp*-Expression zeigte, dass die Transformationsmethode nur die Epidermis- und nicht die Mesophyllzellen erreicht, ist gewebsspezifische Expression ein möglicher Grund für die ausbleibende Expression.

Eine andere Erklärung wäre, dass kein Gewebe in einem physiologischen Zustand war, in dem der *HvS40*-Promotor aktiv werden konnte (Entwicklungsspezifität der Expression).

Der Beschuss mit dem Konstrukt pSG506, welches das *uidA*-Gen unter Kontrolle des SAG12-Promotors enthält, zeigte, dass der Promotor in Weizen aktiv ist. Wie oben erwähnt, wurde aber das Mesophyll nicht erreicht. Die GUS-Aktivität zeigte sich in den oberen Zellschichten und der Epidermis seneszierender Blätter (Abb. 25). In Tabak-Pflanzen konnte die Aktivität von SAG12-GUS in allen Zellen von seneszierenden Blättern gezeigt werden (Grbić, 2002). Der SAG12-Promotor ist seneszenz-spezifisch, aber nicht blattspezifisch und wird auch in anderen seneszierenden Geweben und Blütenorganen exprimiert (Gan and Amasino 1997; Grbić, 2002). Seine Expression in jungen und reifenden Frucht-/Schale Körnern zeigt, dass der Promoter in Weizen sich nicht immer wie in *Arabidopsis* verhält. Und er ist auch nicht nur im seneszierenden Gewebe des Weizens sondern auch in anderen Entwicklungsstadien aktiv.

#### 4.4.2 Partikelbeschuss von unreifen Embryonen

Der Gentransfer durch Partikelbeschuss ist eine robuste und etablierte Technik zur Weizen-Transformation geworden, aber die Transformationseffizienz ist heutzutage immer noch gering mit Raten zwischen 0,13 % und 8,6 % (Bhalla *et al.*, 2006). Die bekannten Weizen-Transformationsmethoden unterscheiden sich in den physikalischen und biologischen Beschussparametern. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine große Anzahl mit dem Nutzen transformierter Pflanzen zu erhalten. Für die Weizensorte Klein Brujo war noch kein auf Partikelbeschusstechnik basierendes Transformationssystem bekannt. Um dieses zu etablieren wurden unter den Beschussbedingungen drei zellbiologische Variablen (Scutellarkallus-Induktionsmedium, osmotische Behandlung und Kallusinduktionsanfang (Vorkultur)) und drei physikalische Varianten (Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter, Beschussdruck und Durchmesser der Goldpartikel) verwendet. Die Etablierung der Transformationsmethode wurde in drei Experimenten (Tabellen 6, 7 und 8) nacheinander durchgeführt. Zum Vergleich mit der Sorte Klein Brujo wurde auch die hoch transformierbare Weizensorte Bobwhite, Linie SH 98 26 (Pellegrineschi *et al.*, 2002) eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit lag die beste Transformationseffizienz bei 10 % bei Klein Brujo und 4,1 % bei der Standardsorte Bobwhite. Ein Vergleich mit der Transformationseffizienz anderer Arbeitsgruppen, die verschiedene Transformationsmethoden bei Weizen verwendet haben, zeigt Folgendes: Rasco-Gaunt *et al.* (2001) 17 %; Varshney and Altpeter (2001) 2,0 %; Huber *et al.* (2002) 5 %; Pellegrineschi *et al.* (2002) 74 % und Pant *et al.*, (2009) 1 %. In der vorliegenden Arbeit wurden folgenden Transformationsparameter für ein optimales Ergebnis mit beiden Sorten eruiert: Verwendung des M3-Mediums, vier Tage Vorkultur mit osmotischer Behandlung, 9 cm Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter, 1,0 µm große Goldpartikel und 1350 psi Beschussdruck (Tab. 63). Der Partikelbeschuss wirkte sich negativ auf die Induktionsrate an embryogenen Scutellarkallus aus. Möglicherweise hatten die getroffenen Zellen des Scutellums die Fähigkeit zur Bildung von embryogenem Kallus verloren und sämtlicher embryogene Kallus war aus nicht beschädigten Zellschichten entstanden. Die wesentlichen Faktoren für das Erreichen einer hohen Transformationsrate scheinen die Wahl des Kallus-induktionsmediums, die Vorkultur und das osmotische Behandlungsmedium zu sein. Von den drei verwendeten Medien erbrachten die MS-Medien (Barcelo and Lazzeri, 1995, modifiziert) mit 0,5 M Mannit vor und nach dem Beschuss als osmotische Behandlung die höchste Scutellarkallus-Induktionsrate. In der Literatur finden sich verschiedentlich Hinweise auf eine osmotische Behandlung von Weizenexplantaten mit Mannit im Zusammenhang mit der Biolistik. Vermutlich geht die positive Wirkung des Osmotikums Mannit auf die Plasmolyse der

Zielzellen zurück. Dies reduziert das Ausströmen des Protoplasmas nach Penetration der Zellen durch die Goldpartikel (Huber, 2002). Der positive Effekt wurde durch eine lange Vorkulturdauer verstärkt. Für die Vorkultur der zu beschießenden unreifen Embryonen sind in der Literatur verschiedene Zeitspannen beschrieben (Klein and Jones, 1999) Keine Vorkultur, d.h. direkter Beschuss (Becker *et al.*, 1994; Pellegrineschi *et al.*, 2002), 1 Tag (Barro *et al.*, 1998), 1 bis 3 Tage (Rasco-Gaunt *et al.*, 2001; Sparks and Jones, 2009), vier bis sechs Tage (Huber *et al.*, 2002) und 14 Tage (Karunaratne *et al.*, 1996). Durch Vorkultur zwischen 20 und 120 Stunden konnten transgene Pflanzen bei Verwendung von M3- und M9-Medium erhalten werden. Erste Zellteilungen im Scutellum d.h. Kallus-Initiation wurden ab dem zweiten oder dritten Tag (Mathias, 1990) bzw. nach fünf Tagen *in-vitro* Kultur (Weeks *et al.*, 1993) beobachtet. Dieser Befund widerspricht der Behauptung von Klein and Jones (1999), dass die Embryonen nach einer Kulturdauer von ein bis vier Tagen noch nicht zu nachhaltiger Kallus-Proliferation fähig sind.

**Tab. 63: Zusammenfassung der besten Transformationsparameter für stabile Transformation für Klein Brujo und Bobwhite (Linie SH 98 26). %S.: %Saccharose und Vergleich mit Daten aus der Literatur**

Sorte	Diese Arbeit		Pellegrineschi <i>et al.</i> (2002)	Sparks and Jones (2009)
	Klein Brujo	Bobwhite	Bobwhite (Linie SH 98 26)	Verschiedene
<b>Biologische Parameter</b>				
Induktionsmedium	M3		MS / 3 %S	MSS 3AA / 2 9 %S
Osmotische Behandlung	M3 / 0,5 M Mannit		MS / 15 % Maltose	MSS 3AA / 2 9 %S
Tage nach Kallus-Initiation	4		Direkt	1-2
<b>Physikalische Parameter</b>				
Zielgewebeabstand (cm)	9		5	5,5
Beschussdruck (psi)	1350		900	650-900
Goldpartikel (µm)	1,0		0,6	0,6
<b>Transformationseffizienz (%)</b>	0,6 % - 10 %	1,4 % - 4,1 %	74 %	1,6 % - 6,6 %

#### 4.4.3 Gewebekultur

Ein weiterer Punkt, der verbesserungswürdig erschien, war die Dauer der Gewebekultur zwischen Embryonenpräparation und *ex-vitro* Kultur, die zwischen 9 und 12 Wochen in Anspruch nahm. Sie liegt im Bereich der kürzesten in der Literatur berichteten Gewebekulturphasen (8,5 bis 11,5 Wochen, Altpeter *et al.*, 1996). Die transgenen Pflanzen waren phänotypisch unauffällig. Jedoch hatten manche Pflanzen ganz oder partiell sterile Ähren. Die Sterilität trat unabhängig von einer erfolgreichen Transformation auf und kann daher nicht

auf die Fremdgenexpression zurückgeführt werden. Ihre Ursache dürfte in der Art der Gewebekultur liegen. Sterilität ist ein bekanntes Phänomen bei transgenen Getreiden (Iser *et al.*, 1998).

Insgesamt wurden 123 transgene Pflanzen gewonnen. Die angewendete Methode der Gewebekultur war sehr effektiv. Denn es wurden nur diejenigen Kalli, die von Anfang an keine GFP-Fluoreszenz gezeigt oder während der Regenerationphase die *gfp*-Expression verloren hatten, der Selektion mit PPT unterzogen. Im ersten Fall wurde „frühe“ Selektion mit PPT gesetzt, im zweiten Fall wurde der Selektionsdruck erst in der zweiten Runde (nach 6 Wochen, Rasco-Gaunt *et al.*, 2001) der Gewebekultur ausgeübt. Diese Methode unterschied sich von der Methode von Huber *et al.* (2002), die nur solche Kalli und Sprosse weiterkultivierten, die *gfp* exprimierten. Dabei wurde sehr früh mit PPT selektiert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete PPT-Konzentration lag mit 4 mg/l PPT im Rahmen der Literaturwerte (Rasco-Gaunt *et al.*, 2001: 3 mg/l; Pellegrineschi *et al.*, 2002: 5 mg/l; Sparks and Jones, 2009: 2-6 mg/l). Die Kombination der Gewebekulturstrategie mit der Anwendung der PPT-Behandlung während der *ex-vitro* Kultur unterband „Ausreißer“ oder „falsche Positive“ bei den überlebenden Pflanzen. Neben der Kontrolle der *gfp*-Expression und der Herbizid-Resistenz bei der *ex-vitro* Kultur musste auch die PCR-Analyse des *uidA*- oder *ipt*-Gens zur Identifizierung von transgenen Pflanzen herangezogen werden, da die drei übertragenen Gene auf zwei verschiedenen Vektoren lagen. Die PCR-Analyse zeigte, dass 97,4% der Transformanten beide Plasmide enthielten. Dieser hohe Anteil an cotransformierten Pflanzen ist vor dem Hintergrund der Literatur nicht überraschend (Altpeter *et al.*, 1996 a: 95,2 %; Barro *et al.*, 1997: 71,4 %; Leckband und Lörz, 1998: 67 %; Fettig, 1999: 89 %). Unter den Transformanten, die sich als *gfp*-negativ bei der *ex-vitro* Kultur erwiesen, hatten 36 % *gfp*-Expression bei der vorhergehenden *in-vitro* Kultur gezeigt. Jedoch zeigten sie weiterhin Aktivität des *bar*-Gens. Da nur das *bar*- und nicht das *gfp*-Gen exprimiert wurde, obwohl beide Gene auf demselben Plasmid liegen, handelt es sich möglicherweise um posttranskriptionales *gene-silencing* (Cannell *et al.* (1999). Chen *et al.* (1998, 1999) fanden, dass der *CaMV35S*-Promotor in Weizen eine Tendenz zum *Silencing* aufweist, wenn Enhancerelemente eingebaut sind. Eine Komponente des *gfp*-Konstrukts ist das HSP 70-Intron, das ein translationelles Enhancerelement ist (Huber, 2002). Die hohe Aktivität des *bar*-Gens unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors aus Mais wurde schon von Christensen *et al.* (1992) beschrieben. Sie fanden, dass der *Ubiquitin*-Promotor mit Intron (*Ubi1*) die höchste und stabilste konstitutive Expression in Weizen bewirkt. Jedoch berichten Anand *et al.* (2003), dass der *Ubiquitin*-Promotor in transgenem Weizen auch vom *gene-silencing*, allerdings in geringerem Umfang als der *CaMV35S*-Promotor betroffen ist.

## 4.5 ANALYSE DER REGENERATPFLANZEN

### 4.5.1 Nachweis der *HvS40*-GUS und *SAG12*-GUS in transgenen Weizenpflanzen

Der Begriff „Reportergen“ wird gewöhnlich im Zusammenhang mit der Quantifizierung einer Genexpression verwendet (Huber, 2002), also bevorzugt bei Promotoranalysen. In der vorliegenden Arbeit wurde das *uidA*-Gen zur Überprüfung der *HvS40*- und *SAG12*-Promotor-Aktivität in Weizen eingesetzt.

Die histochemische Analyse des *HvS40*-GUS wurde in Seneszenz-induzierten jungen Blättern, in natürlich seneszierenden Blättern, in Stängeln und Wurzeln und in verschiedenen Blütenteilen sowie in Körnern der drei transgenen T<sub>0</sub>-Pflanzen sowie in Wildtyppflanzen als Kontrolle durchgeführt. Drei Linien, die verdunkelt oder einer Behandlung mit Abscisinsäure unterzogen wurden, zeigten GUS-Aktivität. Die Aktivität von *HvS40*-GUS zeigte sich an der Schnittkante der Blätter oder in der Nähe von Infektionsherden (Abb. 21), die in den meisten Fällen Pilz-Infektionen waren. Damit hätte der Promotor auf die Infektion bzw. Verwundung statt auf die Seneszenz-Behandlung reagiert. An Gerstenblättern wurde gezeigt, dass sich das Transkript des *HvS40*-Gens nicht nur während der Seneszenz anreichert, sondern auch bei Pathogenbefall (Krupinska *et al.*, 2002). Es gab einen Hinweis, dass das *HvS40*-Gen durch einen gemeinsamen Signalweg der Pathogenabwehr und der Seneszenz reguliert wird (Krupinska *et al.*, 2002). Die Abwesenheit von Pathogenbefall könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Blätter auch im empfindlicheren fluorometrischen GUS-Test keine Expression zeigten.

Das Expressionsprofil des *HvS40*-Gens in Gerste zeigt, dass das Transkript- in Mesophyllzellen der Fahnenblätter sowohl bei natürlicher Seneszenz als auch nach Induktion der Seneszenz in Gerstenprimärblättern lokalisiert ist (Krupinska *et al.*, 2002; Dähnhardt, 2003). Bei allen in dieser Arbeit produzierten Weizen-Transformanten mit dem *HvS40*-Promotor ergab sich Aktivität nicht nur in Mesophyllzellen, sondern auch in anderen, z.B. in Epidermis- und Schließzellen (Abb.21). Manche Promotoren aus Monocotyledonen zeigen eine differentielle räumliche oder zeitliche Kontrolle der Expression in verschiedenen Getreidearten (Furtado *et al.*, 2009). Gerste und Weizen sind näher miteinander verwandt als mit Reis; so verwundert es nicht, dass die Spezifität der *cis*-Elemente in Samen und Endosperm von Weizen und Gerste ähnlich sind (Furtado *et al.*, 2009). Jedoch ergaben die *cis*-Elemente des *HvS40*-Promotors in Weizen keine Expression im Mesophyll wie bei der Gerste. Darüber hinaus war der *HvS40*-Promotor auch bei natürlicher Seneszenz nicht in der Lage, *Gus*-Expression in transgenem Weizen zu induzieren, was darauf hindeutet, dass die Regulationsmechanismen des Weizens die Gerste *HvS40*-Promotorsequenz nicht erkennen. Aber ein Konstrukt aus einem verkürzten *HvS40*-

Promotor (in dieser Arbeit, s. 3.5.1) und dem *ipt*-Gen wurde in seneszierenden Weizenblättern exprimiert, was durch RT-PCR-Analyse bei den verschiedenen Linien (s. 3.7.2) bestätigt wurde. Eine abweichende Promotoraktivität bei heterologer Expression wurde auch beim Gersten-*Isa*-Promotor in Weizen und beim Weizen-*Em*-Promotor in Gerste beobachtet (Furtado *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden auch andere Organe untersucht wie Stängel, Wurzeln, Blüten und Körner. Die Entwicklungsstadien der Proben lagen zwischen ein paar Tagen vor der Blütezeit und der Milchreife (milk development) der Körner. Gus-Expression fand sich in Wurzeln, Blüten und Körnern (ektopische Expression des *uidA*-Gens). Der HvS40-Promotor war nicht nur während der Seneszenz, sondern auch in jungem Gewebe, wie Fruchtknoten, Staubfaden, Deckspelzen und Vorspelzen aktiv (Abb. 22). Die Fruchtknotenwand, ein juveniles Gewebe, zeigte GUS-Aktivität. Bei den Staubblättern waren zuerst nur die Staubfäden gus-positiv, später auch die Staubbeutel. Die späte Expression von HvS40-GUS in den Antheren könnte tatsächlich mit der Seneszenz des Gewebes zusammenhängen, wie es für die Expression von SAG12-GUS wurde in Staubbeuteln und Narbe beobachtet worden ist (Grbić, 2002).

Sowohl bei adulten und seneszierenden Blättern als auch bei anderen Organen wurde in dieser Arbeit keine Expression von SAG12-GUS beobachtet. Dieses Ergebnis war erstaunlich, weil transiente Expression des Konstrukts in der Epidermis der alten Weizenblätter (Abb. 24) beobachtet worden war. Außerdem wurde die Aktivität des SAG12-Promotors plus *ipt*-Gen durch RT-PCR-Analyse bewiesen (S. 3.6.3).

#### 4.5.2 Nachweis der Übertragung von Fremdgenen durch *Southern blot*-Analyse

Die zwei Sorten Klein Brujo und Bobwhite wurden durch Partikelbeschuss gleichzeitig mit dem Nutzgen- und dem Marker-/Reporterplasmid transformiert (Cotransformation, Yoder and Goldsbrough, 1994). Dabei wurden drei Genkassetten (*ipt*, *gfp* und *bar* mit jeweiligem Promotor) übertragen.

Im Rahmen dieser Arbeit war es aus räumlichen Gründen nicht möglich, Nachkommen von allen erhaltenen transgenen T<sub>0</sub>-Pflanzen (71 Pflanzen) anzuziehen und zu untersuchen. Daher musste selektiert werden. Das Auswahlkriterium war der Chlorophyllgehalt von abgeschnittenen vollentwickelten Fahnenblättern nach artifiziell induzierter Seneszenz, der bei allen T<sub>0</sub>-Pflanzen gemessen wurde. Die ausgesuchten Pflanzen waren sechs Linien der Sorte Klein Brujo (B-153, B-156, B-175.1, B-176, B-346, und B-355) mit dem pS40-*IPT*-Plasmid und zwei Linien der Sorte Bobwhite (Pw-317 und Pw-410) mit dem pSG516-Plasmid. In allen T<sub>0</sub>-Regeneraten konnte über *Southern blot*-Analysen die vollständige proteincodierende Region des eingeführten *ipt*-Gens nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den erwarteten Produkten fanden sich aber in den

meisten T<sub>0</sub>-Pflanzen weitere Hybridisierungssignale mit abweichendem Molekulargewicht. Diese Fragmente könnten zusätzlich integrierte, jedoch fragmentierte und/oder rearrangierte Genkopien darstellen. Rearrangierte multiple Genkopien wurde bei Transformation von Weizen mehrfach festgestellt (z.B. Altpeter *et al.*, 1996 b; Becker *et al.*, 1994; Iser *et al.*, 1999; Nehra *et al.*, 1994; Weeks *et al.*, 1993; Fettig, 1999; Huber, 2002). Durch Partikelbeschuss erzeugte Transformanten zeichnen sich durch multiple Insertionen der Fremd-DNA aus (Pedersen *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit lag die Anzahl der übertragenen Genkopien zwischen zwei und sieben. Huber (2002) gibt für das übertragene Nutzgen eine Kopienzahl von eins bis sieben an, Fettig (1999) zwischen eins und vier. Die Insertion mehrerer Kopien ist insofern unerwünscht, da es dadurch zu einer Cosuppression bzw. zum posttranskriptionalen *gene-silencing* kommen kann (Matzke und Matzke, 1998; Vasil, 1994). Transgene Pflanzen mit weniger DNA-Kopien und keiner fragmentierten und/oder rearrangierten DNA sind deshalb wünschenswert, weil sie einfacher auf molekularer Ebene zu charakterisieren sind. Zudem ist es weniger wahrscheinlich, dass sie von gene-silencing betroffen sind. Die Häufigkeit, in der durch Partikelbeschuss erzeugte transgene Pflanzen mit einer einzigen unveränderten Kopie erzeugt werden, ist jedoch gering (Jones, 2005). Obwohl viele Arbeiten darauf hindeuten, dass geringe transgene Kopienzahlen für die High-Level-Expression erforderlich sind, gibt es Hinweise von verschiedenen Autoren, dass auch das Gegenteil der Fall sein kann. Allerdings sollte jedes transgene Konstrukt intakt sein (Altpeter *et al.*, 2005b).

#### **4.6 ANALYSE DER NACHKOMMEN TRANSGENER REGENERATPFLANZEN**

##### **4.6.1 Expression des selektierbaren Markierungsgens *bar* und der Markierungs-Reportergen *gfp* in der T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub>- und T<sub>3</sub>-Generation**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kopienanzahl nur für das *ipt*-Gen untersucht. Für das *gfp*- und das *bar*-Gen wurde die Vererbung über die Expression dieser beiden Gene in der T<sub>1</sub>-, T<sub>2</sub>- und T<sub>3</sub>-Generation analysiert. Es zeigte sich, dass sich alle fremden Gene in einer Kopplungsgruppe befanden, also gemeinsam segregierten (vgl. Fettig, 1999, Altpeter *et al.*, 2005b). Auch konnte eine progressive Genstilllegung der *gfp*- und *bar*-Gene bei den Nachkommen beobachtet werden. Genstilllegung in Weizen scheint ein zufälliges aber progressives Phänomen zu sein (Anand *et al.*, 2003). Das ist eine Erklärung für die Beobachtung, dass es eine geringere Anzahl an Individuen mit *gfp*- oder *bar*-Expression im Vergleich zu der Anzahl an Individuen mit dem *ipt*-Gen gab. Jedoch war die Stilllegung dieser Gene unterschiedlich: Beim *gfp*-Gen war sie höher. Die beobachtete „späte“ unterschiedliche

Inaktivierung beider Gene in den Folgegenerationen kann mit einer Vielzahl von verschiedenen Genstilllegungs-Mechanismen zusammenhängen (Huber, 2002), wie z.B. ein transkriptionales und/oder ein posttranskriptionales *gene-silencing* (Demeke *et al.*, 1999; Cannell *et al.*, 1999). Auch könnten die verwendeten Promotoren den unterschiedlich hohen Expressions-Verlust von *gfp*- und *bar*-Gen erklären. In anderen Arbeiten, in welchen auch sowohl ein Markierungs- als auch ein Reporter-gen in Weizen verwendet worden ist, wurde die Inaktivierung der Gene entweder bei einem (Weeks *et al.*, 1993; Cannell *et al.*, 1999) oder bei beiden (Fettig, 1999; Huber 2002) gefunden. Cannell *et al.* (1999) untersuchten wie in dieser Arbeit, drei Generationen und beobachteten einen progressiven und sehr spezifischen Verlust nur eines der übertragenen Gene, nämlich des *uidA*-Gens. Die übertragenen Gene befanden sich wie hier in einem einzigen Plasmid

#### 4.6.2 Expression des Isopentenyltransferase-Gens

##### 4.6.2.1 Chlorophyllgehalt von T<sub>1</sub>-Pflanzen

Fischer und Feller (1994) konnten zeigen, dass die induzierte Seneszenz in jungen abgeschnittenen Weizenblättern hinsichtlich des Chlorophyll- und Proteinabbaus sowie der Aktivität von Peptidhydrolasen im Allgemeinen ähnlich wie die Seneszenz der Fahnenblätter während der Kornfüllungsphase verläuft.

Die sechs untersuchten transgenen Linien der T<sub>1</sub>-Pflanzen mit dem Konstrukt pS40-IPT zeigten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen am Anfang des Versuches im Bezug auf die Werte des Chlorophyllgehalts und des Chl *a* zu *b*-Verhältnisses keinen Unterschied. Am Ende des Versuches zeigte sich jedoch ein deutlich geringerer Chlorophyllverlust bei fünf von den sechs Transgenen ebenso wie bei den Pflanzen in BAP-Lösung gegenüber den Kontrollen, was auf eine Verzögerung der Seneszenz schließen lässt. Insofern könnte der signifikante und geringere Chlorophyllabbau bei den transgenen Pflanzen mit der Steigerung der endogenen Cytokininsynthese zusammen zuhängen. Die durch die größeren Standardabweichungen angedeutete unterschiedliche Expression des Fremdgens kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen den Grad der Homozygotie bei den T<sub>1</sub>-Pflanzen. Homozygote Pflanzen sollten das Fremdgen besonders stark exprimieren. Da nicht alle T<sub>1</sub>-Pflanzen homozygot waren, ist eine unterschiedliche Expression und damit ein unterschiedlich starker Effekt zu erwarten. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass *gene-silencing* (s. 4.5), in manchen der transgenen Pflanzen eingetreten ist. Zwar exprimierten die Transgenen das *gfp*- oder das *bar*-Gen, aber trotzdem kann, wie schon im vorher gehenden Kapitel angesprochen, die Stilllegung ganz spezifisch nur eines der Fremdgene betroffen haben (Cannell *et al.*, 1999,) wie es auch die Tabelle 56 zeigt.

Zusätzlich müsste berücksichtigt werden, dass das Fremdgen auch in mehreren Kopien (s. Tab. 35) in das Genom integriert worden sein konnte, was auch zu unterschiedlich starker Expression führen sollte. Weiterhin kann auch die Position der Insertion des Fremdgens eine Rolle in der Expression spielen (Altpeter *et al.*, 2005b). Wie schon im vorherigen Kapitel angesprochen, haben die untersuchten Linien verschiedene Fremdgenkopienzahlen, die höchstwahrscheinlich auch in unterschiedlichen Kompartimenten des Wirtsgenoms liegen.

Infolge des starken Chlorophyllabbaus in der Kontrolle ergaben sich keine großen Unterschiede mehr im Chlorophyll *a* : *b*-Verhältnis. Dagegen zeigte der schwächere Abbau des Chlorophylls in den Transgenen noch Unterschiede, wobei erwartungsgemäß (Lu *et al.* (2001) Chlorophyll *b* stärker abgebaut wurde als Chlorophyll *a*. Aber auch die Umwandlung von Chl *b* in Chl *a* wird diskutiert (Scheumann *et al.*, 1999; Hörtensteiner, 2009). Im Gegensatz dazu fanden Pant *et al.*, 2009 einen relativ höheren Chl *b*-Gehalt und ein niedrigeres Chl *a/b*-Verhältnis im seneszierenden Weizenblatt von transgenen SEE1-IPT Pflanzen im Vergleich zu nicht transgenen Pflanzen. Sie erklärten dies mit einer größeren Stabilität der LHCII Protein-Chlorophyll-Komplexe. In der vorliegenden Arbeit war dagegen das Chl *a/b*-Verhältnis bei den Transgenen höher, da das Chl *a* wegen der Seneszenz-Verzögerung weniger als das Chl *b* abgebaut wurde. Schroeder *et al.* (2001) fanden bei Blättern der transgenen *SAG12-ipt Nicotiana glauca*-Pflanzen ein höheres Chl *a/b*-Verhältnis, aber auch mehr Gesamtchlorophyll als bei Wildtyp-Kontrollpflanzen. Sie berichteten, dass der höhere Chlorophyllgehalt der Transgenen im Vergleich zur Kontrolle eine Folge des höheren Cytokiningehalts infolge der Aktivität des Fremdgens sei, der zur Verzögerung des Chlorophyllabbaus führt.

Die zwei hier untersuchten Linien der T<sub>1</sub>-Pflanzen mit dem Konstrukt pSG516 zeigten am Anfang des Versuches ebenfalls im Bezug auf das Chl *a/b*-Verhältnis keinen Unterschied zu den Kontrollpflanzen. Am Ende des Versuches wiesen wiederum die transgenen Linien und die Kontrollen in BAP-Lösung einen deutlich geringeren Pigmentabbau als die Kontrollen auf. Bei beiden Linien kann man die Seneszenz-Verzögerung auf die erhöhte endogene Cytokininsynthese zurückführen.

#### 4.6.2.2 Cytokiningehalt in Weizenfahnenblättern

In Weizenfahnenblättern wurden die biologisch aktiven Cytokine (Werner *et al.*, 2001) – also die freien Basen und die Ribosidfraktion – detektiert.

Der Cytokiningehalt wurde von den T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanzen der drei pS40-IPT Linien analysiert, die den geringsten Chlorophyll-Abbau zeigten. Dabei wurde in den drei Linien ein Zusammenhang zwischen Chlorophyll-Abbau und Cytokinin-Gesamtgehalt beobachtet, der zeigte, dass je

geringer der Chlorophyll-Abbau war, desto größer der Cytokinin-Gesamtgehalt war. In der Kornfüllungsphase lagen die Konzentrationen der drei gemessenen Cytokininspezies in den Transgenen um das 2,2 - 2,6-fache höher als bei den Wildtyp-Pflanzen und um das 1,5 - 1,8-fache höher als bei den Azygoten. Dabei war der Zeatinribosid-Gehalt sowohl bei freien Cytokinininen als auch bei den *O*-Glucosiden in drei Vierteln der Messungen der anteilmäßig höchste unter den drei detektierten Cytokinininen, wie bereits in anderen Seneszenz induzierten *ipt*-Pflanzen nachgewiesen wurde (Chang *et al.*, 2003). Barneix (2007) erwähnt den engen Zusammenhang der Seneszenz mit den Cytokinininen. Ihre endogenen Konzentrationen besonders der *t*-Zeatin-species sind in seneszierenden Blättern sehr niedrig (Pant, *et al.*, 2009). Die Cytokininabnahme wird von Buchanan-Wollaston *et al.* (2005) als ein Schlüsselsignal für den Anfang der Seneszenz gehalten; während dieses Prozesses nimmt die Cytokininkonzentration weiter ab (Lim *et al.*, 2007). Außerdem wurde festgestellt, dass in seneszenten Blättern zwei an der Cytokininsynthese beteiligten Gene herunterreguliert wurden und dagegen die Cytokinin-Oxidase hochreguliert wurde (Lim *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch RT-PCR-Analyse gezeigt, dass die Transgenen eine höhere Expression des *ipt*-Gens während der Kornfüllungsphase zeigten, die die letzte Entwicklungsphase des Weizens ist, als kurz nach der Blüte, die als Startpunkt der Seneszenz des Fahnenblatts eingeschätzt wird (Kajimura *et al.*, 2010). Aufgrund der stärkeren Expression des Schrittmachergens der Cytokininsynthese sollte sich auch eine höhere endogene Cytokininkonzentration ergeben, wie sie auch in Weizen (Daskalova *et al.*, 2002; Sykorova *et al.*, 2008) und anderen Pflanzenarten (Tabak: Jordi *et al.*, 2000; Cowan *et al.*, 2005; Salat: McCabe *et al.*, 2001; Petunie: Chang *et al.*, 2003) gemessen wurden. Die in dieser Arbeit gemessenen unterschiedlichen Cytokininkonzentrationen in den Fahnenblättern der transgenen Linien sind vermutlich auf unterschiedlich starke Expression des Fremdgens zurückzuführen (s. 4.6.2.1). Sykorova *et al.* (2008) untersuchten Weizenfahnenblätter von mit *SAG12-ipt* Konstrukt transformierten Pflanzen und fanden den Effekt auf die Cytokininkonzentration unbedeutend. Sie erklärten dies damit, dass der *Arabidopsis* *SAG12*-Promotor in einer heterologen einkeimblättrigen Pflanze keine vollständige Funktionskapazität zeigen kann. Bei der hier vorliegenden heterologen Expression des *HvS40*-Promotors in Weizen war der Cytokingehalt trotz des Vorliegens eines einkeimblättrigen Systems verhältnismäßig niedrig. Eine Erklärung hierfür könnte einerseits eine Schwäche des Promotors, andererseits eine partielle Fremdgenstilllegung sein. Da unter Gewächshaus-Bedingungen bei keiner transgenen Linie eine deutliche Verzögerung der Seneszenz sowohl in den Blättern als auch bei der ganzen Pflanze im Vergleich zu den Azygoten beobachtet wurde, könnte letztlich die akkumulierte

Cytokininkonzentration für einen physiologischen Effekt zu niedrig sein. Sykorova *et al.* (2008) beobachteten trotz einer nur unbedeutend höheren Cytokininkonzentration in transgenen Weizenpflanzen einen höheren Chlorophyllgehalt als in den Kontrollpflanzen, wenn die Pflanzen unter niedrigem Stickstoff-Angebot gewachsen sind. Es gibt also doch physiologische Effekte, die bereits bei einer geringfügigen Erhöhung des Cytokininspiegels auftreten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Steigerung der Expression des *ipt*-Gens in Weizenfahnenblätter unter der Kontrolle des *HvS40*-Promotors sowohl bei der induzierten Seneszenz als auch bei natürlicher Seneszenz (Tab. 56) bestätigt. Nach der RT-PCR Analyse kann eine unterschiedliche *ipt*-Expression bei künstlich induzierter und natürlicher Seneszenz ausgeschlossen werden. Allerdings ergab sich ein Unterschied auf physiologischer Ebene: Während der Chlorophyllabbau bei der induzierten Seneszenz verzögert war ergab sich bei der natürlichen Seneszenz kein Unterschied zu den Kontrollpflanzen: Die Blattseneszenz ist als letzte Stufe der Blattentwicklung ein sehr komplexer und hoch koordinierter Prozess, der nicht nur Abbauschritte, sondern auch Genexpression und Proteinsynthese umfasst (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), wobei auch die subzelluläre Integrität über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt (Robson *et al.*, 2004). Bei der Induktion der Seneszenz durch Abtrennen des betreffenden Organs von der Pflanze wird deren Integrität zerstört und bestimmte Regulationsmechanismen fallen aus, so z.B. der Export der Abbauprodukte durch das Phloem (Becker and Apel, 1993; Lu *et al.*, 2001; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Dadurch kann auch das gestörte Source/Sink Verhältnis die Blattseneszenz nicht nur im abgeschnittenen Organ, sondern auch in der Pflanze selbst induzieren und modulieren (Fischer and Feller, 1994). Außerdem wurden bereits in einigen Arbeiten die Genexpressions-Muster in Blättern während der natürlichen und induzierten Seneszenz verglichen. Trotz ähnlicher Genexpressions-Muster ergaben sich auch erhebliche physiologische Unterschiede in den Blättern (Arabidopsis: Weaver *et al.*, 1998; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Weizen: Kajimura *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur die Expression des *ipt*-Gens, sondern auch der Cytokininingehalt in der Linie pSG516 bei den T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanzen untersucht. Die Transgenen T<sub>1</sub>-Pflanzen zeigten eine 3,5-fach höhere Konzentration der drei bestimmten Cytokininspezies im Fahnenblatt während der Kornfüllungsphase gegenüber dem Wildtyp, wobei der Zeatinribosidgehalt am höchsten unter den freien Cytokininen war. Hingegen ergab sich bei den homozygoten T<sub>2</sub>-Pflanzen gegenüber den azygoten keine große Differenz. Diese Homozygoten erbrachten ein schwächeres RT-PCR Signal (Tab. 56) im Vergleich mit den pS40-IPT homozygoten Pflanzen, vielleicht aufgrund des schwächeren Promotors. Trotz erhöhter Cytokininkonzentrationen zeigte keine der untersuchten transgenen Pflanzen eine deutliche

sichtbare Verzögerung der Seneszenz gegenüber den Kontrollpflanzen oder den Azygoten. Dies entspricht auch dem Befund von Sykorova *et al.* (2008). Diese Autoren fanden in Weizen keine Seneszenzverzögerung bei der *SAG12-IPT* T<sub>1</sub>-Pflanzen gegenüber der Wildtypkontrolle, wenn die Pflanzen bei optimaler Stickstoffversorgung wuchsen. Im Gegensatz dazu zeigten transgene Pflanzen, die bei unzureichender Stickstoffversorgung gewachsen waren, Seneszenz-Verzögerung.

#### 4.6.2.3 Ertragsleistung der T<sub>2</sub>-Pflanzen

##### 4.6.2.3.1 Weizenpflanzen mit der Nutzenkassette *pS40-IPT*

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnte über die Ertragsleistung der homozygoten und der ihnen entsprechenden azygoten T<sub>2</sub>-Pflanzen der vier Linien berichtet werden, die in der RT-PCR-Analyse ein positives Ergebnis zeigten (Tab.56). Diese Generation wurde während ihres gesamten Lebenszyklus sorgfältig beobachtet und es wurden mehr Daten bzgl. ihrer Wachstumseigenschaften als bei T<sub>1</sub>-Pflanzen erfasst. Bei drei davon wurde eine Erhöhung des Cytokinidgehalts in seneszierenden Blättern bestätigt (s. 4.6.2.2), obwohl in allen vier Linien keine deutlich sichtbare Seneszenz-Verzögerung sowohl während der sequenziellen Seneszenz der Blattoorgane als auch während der Seneszenz der ganzen Pflanze im Vergleich zu den Azygoten festgestellt wurde. Das Korngewicht wird während der letzten Entwicklungsphase bestimmt. Diese Phase umfasst den Zeitraum nach der Anthese bis zur Reife. Das Korngewicht hängt teilweise von der Kornanzahl pro Ähre ab. Die Erhöhung der Kornanzahl kann aufgrund der niedrigeren verfügbaren Assimilat-Menge pro Korn (Source-Sink-Verhältnis) zu einem niedrigerem Korngewicht führen (Acevedo *et al.*, 2001). Da die Pflanzen keine verlängerte Lebensdauer der Blätter zeigten, stellt sich die Frage, welche Mechanismen zu mehr und schwereren Körnern in der Ähre geführt haben und wie die Körner mit den notwendigen Kohlenhydraten versorgt wurden. Bei der Kornfüllung hängt die Assimilatanlieferung von drei Hauptquellen bzw. Mechanismen im Spross ab. a) Die Photosynthese des Fahnenblattes und des vorletzten Blattes (inklusive der Blattscheide). b) Die Mobilisierung der Kohlehydrate, die vor der Anthese hauptsächlich in den Internodien gespeichert wurden. c) Die Photosynthese der Ähre. Der Anteil am Korngewicht, der sich aus diesen drei Quellen speist, variiert enorm innerhalb der Kultursorten und hängt stark von den Umweltbedingungen ab. Ungefähr 70 – 90 % des Kornertrags leitet sich von den frischen Photoassimilaten aus der Ähre und dem Fahnenblatt ab (Inoue *et al.*, 2004). Es ist mittlerweile allgemein akzeptiert, dass die Photosynthese der Ähre einen wichtigen Beitrag (12 – 42%) zum Kornertrag liefert (Tambussi *et al.*, 2007; Maydup *et al.*, 2010; Parry *et al.*, 2011). Die Homozygoten der zwei Linien hatten sowohl eine höhere

Blattanzahl als auch längere Fahnenblätter und Ähren als die Azygoten. Daraus kann sich eine höhere Photosyntheseleistung ergeben. Die Kornfüllung hat zwei Hauptphasen. Während der ersten Phase wird die Zellzahl des Endosperms bestimmt (Miralles, 2004). In dieser Periode befindet sich in der Regel im Endosperm eine hohe Konzentration an Cytokininen. Die Cytokinine könnten erforderlich für die Zellteilung sein (Yang *et al.*, 2003). Während der zweiten Phase werden neben der Kornfüllung auch die vegetativen Strukturen des Embryos gebildet (Miralles, 2004). Es wurde gezeigt, dass Cytokinin die Kornanzahl und die Kornentwicklung stimuliert, wenn es auf die heranwachsende Weizenähre aufgetragen oder ein *ipt*-Gen in Reis und Mais exprimiert wird (Sykorova *et al.*, 2008). Die Cytokinine scheinen auch die apikale Dominanz auf dem Niveau der Ähre bzw. den Ährchen aufzulösen, wo sie der so genannten semibasalen und medialen Dominanz entgegenwirken, welche ansonsten in eine schwache oder ausbleibende Entwicklung im distalen Ährchenteil münden würden (Pant *et al.*, 2009). Die *ipt*-Expression im Korn besonders in der frühen Entwicklungsphase ist eine interessante Strategie, um den Kornertrag zu steigern (Sykorova *et al.*, 2008), da sowohl die Entwicklung der Endospermzellen als auch die Sinkstärke dieser Zellen stimuliert werden könnte. In Mais wird die *ZmIPT2* im Endosperm vor allem in der basalen Transferzellschicht exprimiert und spielt vermutlich bei der Regulation der Sinkstärke während der Kornentwicklung eine Rolle (Werner and Schmölling, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des *uidA*-Gens unter der Kontrolle des *HvS40*-Promotors (s. 3.6.1.3) im Frühstadium der Kornentwicklung in den Hüllspelzen, Deckspelzen, Vorspelzen und in der Samenschale beobachtet. Wenn die *HvS40-ipt* der homozygoten Pflanzen ebenfalls in den gleichen Strukturen der Ähre exprimiert wäre, könnte dies eine Erklärung für die besseren Ergebnisse der Kornzahl pro Ähre, beim Korngewicht insgesamt und beim durchschnittlichen Korngewicht der homozygoten Pflanzen sein. Damit ließe sich auch der höhere Ernteindex der homozygoten Pflanzen der zwei Linien (8,1 % und 19,1 %) im Vergleich zu den azygoten Pflanzen erklären.

#### 4.6.2.3.2 Weizenpflanzen mit der Nutzenkassette *pSG516*

Vier Arbeiten (Daskalova *et al.*, 2002; Xi *et al.*, 2004a, b; Sykorova *et al.*, 2008) gibt es über transgenen Weizen mit einem *ipt*-Gen unter der Kontrolle des *SAG12*-Promotors. In diesen Veröffentlichungen wurden die transgenen Pflanzen mit Wildtyp-Pflanzen verglichen. Die Expression des Fremdgens konnte bei allen gezeigt werden, aber seine Expression ergab unterschiedliche Ergebnisse. Daskalova *et al.* (2002) fanden einen Cytokinin-Anstieg im Fahnenblatt, eine Verzögerung der Seneszenz und eine Steigerung der Ertragsleistung der transgenen Pflanzen, was durch die Verlängerung der *Source*-Aktivität erklärt wurde (Kamínek

*et al.*, 2003). Xi *et al.* (2004) veröffentlichten zwei Arbeiten mit einer Weizensorte, die vorzeitig senesziert, deren Ergebnisse sich jedoch widersprechen. In der ersten Arbeit (Xi *et al.*, 2004a) wird behauptet, dass *SAG12-ipt* spezifisch in seneszierenden Blättern exprimiert und die Blattseneszenz deutlich verzögert wurde. In der zweiten Arbeit (Xi *et al.*, 2004b) wurde berichtet, dass es keinen signifikanten Unterschied in den Blatt-Cytokiningehalten, der Blattseneszenz und den agronomischen Eigenschaften der transgenen Weizenpflanzen im Vergleich zum Wildtyp gab. Diese widersprüchlichen Ergebnisse wurden damit erklärt, dass entweder *gene-silencing* oder eine nur partielle Expression von *SAG12-ipt* vorlag. Sykorova *et al.* (2008) wiesen in den T<sub>1</sub>-Nachkommen einer transgenen Linie im Vergleich zum Wildtyp nach, dass der Cytokiningehalt, die Nitratassimilation und die Aktivität der Nitratereduktase erhöht war. Jedoch gab es keinen statistischen Unterschied der Ertragsleistung zwischen Transgenen und Wildtyp-Pflanzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Vergleich mit „Klein Brujo“ auch die Standardsorte Bobwhite untersucht. Bedauerlicherweise wies nur eine von den zwei transgenen Linien eine *ipt*-Expression im Fahnenblatt der homozygoten T<sub>2</sub>-Pflanzen auf. Es wurde aber keine signifikante Differenz zwischen den homozygoten und azygoten Pflanzen sowohl bei den morphometrischen Daten als auch bei den Ertragsparametern beobachtet. Bei den azygoten Pflanzen waren die Werte sogar leicht höher. Die Expression des *ipt*-Gens war bei einigen homozygoten Pflanzen schwach (Tab. 56). Ein wahrscheinlicher Grund könnte sein, dass der *SAG12*-Promotor aus *Arabidopsis* nicht optimal für die Expression in einkeimblättrigen Pflanze geeignet ist (Sykorova *et al.*, 2008). Die Cytokinin-Bestimmung zeigte in alternden Fahnenblättern keine Erhöhung (Tab. 53) und auch der Effekt von *SAG12-ipt* auf die Ertragsleistung der Sorte Bobwhite war gering. Diese Resultate stimmen mit denjenigen von Xi *et al.*, 2004b überein.

Das erste Screening der 22 argentinischen Weizenvarietäten zeigte; wie unterschiedlich eine Sorte auf die verschiedenen Phasen der *in vitro* Kultur reagieren kann. Eine Sorte hat unter keiner der *in vitro* Kultur-Bedingungen Kallus gebildet. In dieser Arbeit ist es gelungen, eine Sorte herauszufinden, die sehr gut embryogenen Kallus gebildet hat und anschließend zu einer ganzen Pflanze regeneriert werden konnte. Es ist bislang nicht möglich, eine Standard- *in vitro* Kultur-Bedingung für alle Sorten anzugeben. Deshalb sollte man neue Sorten unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen untersuchen.

Weizen gilt noch immer als schwer transformierbar. Trotzdem ist es im Rahmen dieser Untersuchungen gelungen, Transformations- Parameter für eine Sorte zu definieren, mit denen eine gute Transformationseffizienz erhalten wurde. Die schwankenden Ergebnisse bei

verschiedenen Versuchsdurchführungen zeigten, dass die bislang gefundenen Parameter auch noch von anderen, bisher nicht bekannten Faktoren abhängen.

Die Nutzung von einem Seneszenz-assoziierte Promotor aus Gerste in Weizen (beide sind *Poaceae*) hat gezeigt, dass die *HvS40*-Promotor-Länge die Gen-Expression im heterologen System Weizen beeinflusst hat. Obwohl der *HvS40*-Promotor unter beiden hier untersuchten Seneszenz-Bedingungen aktiv war, ist es jedoch nur bei der künstlich induzierten Seneszenz gelungen, den Chlorophyll-Abbau zu verzögern. Diese Ergebnisse bestätigen die Komplexität des Seneszenz-Prozesses in Pflanzen. Um den Weizen-Ertrag zu steigern, wäre die Erhöhung der Cytokinin-Produktion in den Körnern und/oder in den Blättern (mit Ausnahme des Fahnenblattes) zu empfehlen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Pflanzenzüchtung steht in den nächsten 50 Jahren vor enormen globalen Herausforderungen (die wachsende Weltbevölkerung, der fortschreitende Klimawandel, etc.). Sie kann jedoch einen wesentlichen Beitrag leisten, um die Produktivität der landwirtschaftlichen Flächen zu steigern, denn das Ertragspotenzial vieler Pflanzen ist noch nicht ausgeschöpft. Weizen ist zusammen mit Mais und Reis das meist angebaute Getreide der Welt. Ein Ziel der Gentechnikforschung am Weizen ist unter anderen die Wachstums- und Ertragsteigerung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Übertragung eines Isopentenyltransferase (*ipt*)-Gens in eine argentinische Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L.) die Cytokinin-Biosynthese unter der Kontrolle Seneszenz-spezifischer Promotoren in Weizen zu stimulieren. Das Enzym Isopentenyltransferase besitzt eine Schlüsselposition, da es die Schrittmacherreaktion in der Cytokinin-Biosynthese katalysiert. Seneszenz-assoziierte Gene (SAG) werden bei Eintritt der Seneszenz hochreguliert. Die Verwendung eines Seneszenz-spezifischen Promotors führte bei einigen Pflanzen (z.B. Tabak und Reis) zur verstärkten Expression des *ipt*-Gens in der letzten Lebensphase der Blätter, verbunden mit einer deutlichen Verzögerung der Blattseneszenz. Die auf diese Weise verzögerte Seneszenz wiederum vermindert in einer autoregulatorischen Schleife die Aktivität des Seneszenz-spezifischen Promotors und verhindert so eine Überproduktion der Cytokinine. Um den Seneszenz-Prozess der Weizenpflanze durch Stimulierung der Cytokininbiosynthese zu verzögern und so eine höhere Ertragsleistung zu erreichen, wurde eine bisher noch nicht übertragene Nutzgenkassette mittels Partikelbeschuss in eine argentinische Sommerweizenvarietät eingebracht. Diese Nutzgenkassette besteht aus der proteincodierenden Region des Isopentenyltransferase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* und dem Seneszenz-spezifischen *HvS40*-Promotor aus *Hordeum vulgare*. Parallel dazu wurden die Modell-Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L. Bobwhite SH 98 26) mit dem *ipt*-Gen unter der Kontrolle des Seneszenz-spezifischen *SAG12*-Promotors aus *Arabidopsis thaliana* transformiert und bis zur T<sub>2</sub>-Generation untersucht.

### 5.1 SCREENING VON 22 ARGENTINISCHEN SOMMERWEIZEN-VARIETÄTEN

Eine effektive Gewebekultur ist als Grundlage für die Erzeugung transgener Pflanzen unabdingbar. Leider ist die Transformationseffizienz bei Weizen nicht sehr hoch, wodurch die genetische Manipulation sehr erschwert ist. Ziel war es deshalb zunächst, optimale Bedingungen für die *in vitro* Kultur zu finden. Durch ein erstes Screening der unreifen Embryonen von 22

argentinischen Sommerweizenvarietäten dreier Saatgutbetriebe wurden geeignete argentinische Genotypen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur embryogenen Scutellarkallus-Bildung und zur Regeneration ganzer Pflanzen, ausgewählt. Für den Erfolg des ersten Schritts der Gewebekultur, der Kallusbildung, sind das geeignete Entwicklungsstadium der unreifen Embryonen sowie die Konzentration von 2,4-D als Hormon ausschlaggebend. Die Kombination der Embryo-Entwicklungsstadien H und W, die sich in der Länge des Embryos sowie des Scutellums unterscheiden, mit den zwei 2,4-D Konzentrationen 1 und 2 mg pro Liter L3-5 Medium ergab vier verschiedene Bedingungen denen alle Weizensorten ausgesetzt wurden. Insgesamt wurden 10091 unreife Embryonen hinsichtlich Scutellarkallus-Induktion, Kallusproliferation von der Scutellumoberfläche, vorzeitige Keimung unreifer Embryonen, Regeneration, Sprossbildung und Kultureffizienz getestet. Die besten Ergebnisse bei fünf von sechs der getesteten Parameter erbrachte die Kombination des Entwicklungsstadiums H und der Auxinkonzentration 1 mg 2,4-D /l medium, wobei die Zadoks Skala eine bessere Methode zur Definition des Entwicklungsstadiums war als die Zahl der Tage nach der Blüte. Die Induktion eines Scutellarkallus sowie die Regenerationsfähigkeit der unreifen Embryonen zur Pflanze waren vom Genotyp, vom Entwicklungsstadium und von der 2,4-D Konzentration im Medium abhängig. Hingegen war die Sprossbildung im Wesentlichen nur vom Genotyp abhängig. Aufgrund ihrer hohen Werte bei der Scutellarkallus-Bildung und der Regenerationsfähigkeit wurde „Klein Brujo“ von den 22 untersuchten argentinischen Sommerweizensorten als geeignetste Sorte ermittelt und für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Unreife Embryonen des Genotyps „Klein Brujo“ wurden in den Induktionsmedien L3-5 und MS (welches in dieser Arbeit optimiert wurde) kultiviert. Das modifizierte MS-Medium mit 3 % Maltose und 1 mg/l 2,4-D erbrachte eine Verbesserung hinsichtlich der Scutellarkallus-Bildung, der Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche, sowie der anschließenden Regeneration bzw. Kultureffizienz.

### **5.2 TRANSFORMATION DURCH PARTIKELBESCHUSS UND *IN VITRO* GEWEBEKULTUR DER UNREIFEN EMBRYONEN DES WEIZENS**

Für „Klein Brujo“ konnte ein auf Partikelbeschusstechnik basierendes Transformationssystem etabliert werden. Als selektierbares Markergen wurde das *bar*-Gen, als Marker- Reporter-gen das *gfp*-Gen verwendet. Beide Gene liegen auf dem Plasmid pGFPBAR und stehen unter der Kontrolle des *Ubiquitin*- bzw. des *CaMV 35S*-Promotors. Die Transformation erfolgte durch den gleichzeitigen Beschuss von Zellen mit zwei Plasmiden (Cotransformation): Eines trägt das Nutzgen (pS40-GUS, pSG506, pSG516 und pS40-IPT) und das andere das Marker- Reporter-

Gen (pGFPBAR). Das Plasmid pS40-IPT wurde durch die Kombination des um ca. 2 kb verkürzten *HvS40*-Promotors aus pS40-GUS und dem *ipt*-Gen mit dem *nos*-Terminator aus pSG516 neu konstruiert. Alle anderen Plasmide wurden zur Verfügung gestellt.

Für den Partikelbeschuss von embryogenem Scutellarkallus mit den Nutzgenen wurden drei Varianten der Zellkultur (Scutellarkallus-Induktionsmedium, osmotische Behandlung und Kallus-Induktionsanfang (Vorkultur)) und drei physikalische Varianten (Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter, Beschussdruck und Durchmesser der Goldpartikel) getestet. Nach der Optimierung der Beschussbedingungen ergaben sich drei Variable, die für eine hohe Transformationseffizienz von „Klein Brujo“ (10 % im besten Versuch) entscheidend waren: das Kallus-Induktionsmedium, die Vorkultur und das osmotische Behandlungsmedium.

Die neu etablierte Gewebekulturstrategie führte zu einer Verkürzung der *in vitro* Kulturdauer zwischen Embryonenpräparation und *ex vitro* Kultur. Mit 9 bis 12 Wochen entspricht diese Kulturdauer einer der kürzesten, die man in der Literatur finden kann. Diese Methode der Gewebekultur zusammen mit der Verwendung von Phosphinothricin (PPT) als Selektionsmittel während der *ex vitro* Kultur minimierte die Anzahl sogenannter „Ausreißer“ oder „falscher Positiver“ unter den überlebenden Pflanzen und es wurde eine hohe Ausbeute an Cotransformanten (97,4%) erreicht. Allerdings ließen sich durch unabhängige Segregation keine Reporter- bzw. Selektionsgen-freien T<sub>1</sub>-Pflanzen kultivieren, wie es auch in anderen Arbeiten beschrieben wurde. Es zeigte sich, dass sich alle Fremdgene in einer Kopplungsgruppe befanden, also gemeinsam segregierten. Dies ist wahrscheinlich auf die Einfügung von Transgenen in einen einzigen Locus oder in eng miteinander verbundene Loci zurückzuführen. In der Folge der Generationen T<sub>0</sub> bis T<sub>3</sub> wurde ein progressives jedoch unterschiedliches *gene-silencing* des *bar*- und des *gfp*-Gens, die auf demselben Plasmid liegen, festgestellt. Es handelt sich vermutlich um posttranskriptionales *gene-silencing*.

Da es von Vorteil ist, Promotoren aus gleichen oder eng verwandten Pflanzenarten für gentechnische Zwecke zu verwenden, wurde der aus der Gerste stammende *HvS40*-Promotor eingesetzt. Seine im Zuge der natürlichen Seneszenz auftretende Expression kann in Gerstenblättern sowohl durch Dauer-Dunkelheit als auch durch Pathogenbefall induziert werden. In einem Vorversuch wurde zunächst die Funktionsfähigkeit der beiden Seneszenz-assoziierten Promotoren (*HvS40* und *SAG12*) im heterologen Weizensystem unter Verwendung des *uidA*-Reporter-Gens geprüft. Die histochemische Analyse des *HvS40*-GUS wurde in Seneszenz-induzierten jungen Blättern, in natürlich seneszierenden Blättern, in Stängeln und Wurzeln und in verschiedenen Blütenteilen sowie in Körnern der transgenen T<sub>0</sub>-Pflanzen durchgeführt. Im Vorversuch wurde der Promotor im Mesophyll durch Pathogenbefall (zumeist Pilzinfektionen)

induziert, jedoch nicht durch die Seneszenz des Blattes. Darüber hinaus war er auch in Epidermis- und Schließzellen aktiv, was bedeutet, dass die Mesophyll-spezifische Expression des *HvS40*-Promotors in dem heterologen System verloren ging. Außerdem wurde eine ektopische Expression des *uidA*-Gens in jungen Blütenorganen des Weizens beobachtet.

SAG12-GUS wurde weder in adulten noch in seneszierenden Blättern, noch in anderen Organen des Weizens exprimiert.

In allen T<sub>0</sub>-Regeneraten (sechs ausgesuchte Linien der Sorte „Klein Brujo“ mit dem pS40-IPT-Plasmid und zwei Linien der Sorte Bobwhite SH 98 26 mit dem pSG516-Plasmid) konnte über *Southern blot*-Analysen die vollständige proteincodierende Region des eingeführten *ipt*-Gens nachgewiesen werden. Die Anzahl der übertragenen Genkopien lag zwischen zwei und sieben. Das Konstrukt aus einem um 2 kb verkürzten *HvS40*-Promotor und dem *ipt*-Gen (pS40-IPT) wurde in Weizenblättern sowohl bei künstlich induzierter als auch bei natürlicher Seneszenz exprimiert. Dies wurde mittels RT-PCR der *ipt*-mRNA in T<sub>0</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanzen nachgewiesen. Die Fähigkeit des verkürzten *HvS40*-Promotors die Expression des *ipt*-Gens bei der Blattseneszenz von transgenem Weizen zu steuern, legt nahe, dass cis-Elemente, die als Repressoren auf die Expression bei einem seneszierenden Blatt einwirken, stromaufwärts des verkürzten Promotors lokalisiert waren. Es wurde bereits berichtet, dass Getreide-Promotoren nicht zwangsläufig in allen Getreidearten den gleichen Effekt zeigen. Dies kann sowohl an unterschiedlicher räumlicher- oder zeitlicher Expressionskontrolle als auch an der von der Promotorlänge abhängigen Promotoraktivität liegen.

### **5.3           PHYSIOLOGISCHE EFFEKTE DER ÜBERTRAGUNG DES *IPT*-GENS UND DER ERTRAGSLEISTUNG**

Um einen Hinweis auf die Funktion des *ipt*-Gens unter der Kontrolle von beiden SAG Promotoren zu bekommen wurde der Chlorophyll-Gehalt während der induzierten Seneszenz von voll entwickelten, abgeschnittenen Fahnenblättern von *ipt*-PCR-positiven transgenen T<sub>1</sub>-Pflanzen gemessen. Bei fünf von den sechs untersuchenden Transgenen zeigte sich ein deutlich geringerer Chlorophyll-Verlust was auf die Aktivität des *ipt*-Gens und eine erhöhte Cytokininkonzentration hindeutet. Das Chl *a/b*-Verhältnis war höher als bei den Kontrollen, da das Chl *a* während der Seneszenz-Verzögerung langsamer als das Chl *b* abgebaut wird. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den zwei Linien der T<sub>1</sub>-Pflanzen mit dem Konstrukt pSG516 beobachtet.

Der Gehalt der dominierenden Cytokinine, Isopentenyladenosin, Zeatinribosid und Dihydrozeatinribosid und der der *O*-Glucoside von Zeatinribosid- und Dihydrozeatinribosid,

wurde in seneszierenden Fahnenblättern von T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanzen der drei pS40-IPT Linien, die den geringsten Chlorophyll-Abbau zeigten, analysiert. Eine beinahe Verdopplung des Cytokinin-Gesamtgehaltes gegenüber der Azygoten konnte in Extrakten der seneszierenden Fahnenblätter nachgewiesen werden. In den meisten Fällen war der Zeatinribosid-Gehalt in der Kornfüllungsphase sowohl bei freien Cytokinin- als auch bei den *O*-Glucosiden der anteilmäßig höchste. Dies ist bereits von anderen seneszierenden *ipt*-Pflanzen bekannt. Die Ergebnisse der RT-PCR Analyse der transgenen Pflanzen zeigten eine höhere Expression des *ipt*-Gens während der Kornfüllungsphase verglichen mit der Anthese, die als Beginn der allmählichen Fahnenblattseneszenz gilt. Allerdings war der Cytokiningehalt in intakten Pflanzen trotz des Promoters aus Gerste aufgrund der hier vorliegenden heterologen Expression nicht ausreichend, um eine deutliche Seneszenz-Verzögerung hervorzurufen. Dieser Effekt von *ipt*-Expression kann durch den schwachen Promotor oder durch eine partielle Fremdgenstilllegung des übertragenen Gens zustande gekommen sein. Die stärkere Expression des *ipt*-Gens wurde durch RT-PCR Analyse sowohl bei der induzierten Seneszenz voll entwickelter, abgeschnittener Fahnenblätter als auch bei natürlicher Seneszenz bestätigt. Im Gegensatz zur Verzögerung des Chlorophyllabbaus bei der induzierten Seneszenz wurden keine entsprechenden Effekte bei der natürlichen Seneszenz beobachtet. Dieses unterschiedliche Verhalten zwischen natürlicher und induzierter Seneszenz in transgenen Weizenblättern bestätigt, dass beide Seneszenz-Prozesse unterschiedlich ablaufen.

In einer *SAG12-ipt* Linie wurde der Cytokiningehalt der T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanzen untersucht. Die Transgenen zeigten eine höhere Konzentration der drei gemessenen Cytokinine in der Kornfüllungsphase gegenüber der Wildtypkontrolle, aber keine signifikante Differenz gegenüber den azygoten Pflanzen. Das schwache Signal der *ipt*-mRNA nach RT-PCR deutet darauf hin, dass der *SAG12*-Promotor in seneszierenden Weizenblättern schwach exprimiert wird. Keine der untersuchten transgenen Pflanzen zeigten eine deutliche Verzögerung der Seneszenz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die T<sub>2</sub>-Generation während ihres gesamten Lebenszyklus sorgfältig verfolgt. Dabei wurden die homozygoten T<sub>2</sub>-Pflanzen der vier Klein Brujo-Linien und einer Linie der Sorte „Bobwhite SH 98 26“, die eine Expression des *ipt*-Gens nach RT-PCR-Analyse zeigten, mit den entsprechenden azygoten Pflanzen verglichen. Es wurde bei der Sorte „Bobwhite SH 98 26“ keine signifikante Differenz zwischen den homozygoten Pflanzen der *SAG12-ipt*-Linie und den azygoten Pflanzen sowohl bei den morphometrischen Daten als auch bei den Ertragsparametern gefunden. Bei der Sorte „Klein Brujo“ wurde in allen vier transgenen Linien keine deutlich sichtbare Seneszenz-Verzögerung sowohl während der sequenziellen Seneszenz der Blattorgane als auch während der monokarpischen Seneszenz der ganzen Pflanze

festgestellt. Allerdings zeigten zwei Linien gegenüber den Azygoten bei den Parametern Körner pro Ähre, Korngewicht insgesamt sowie durchschnittliches Korngewicht höhere Ergebnisse. Die Steigerung der Kornanzahl wurde durch ein niedrigeres Korngewicht nicht aufgewogen. Es ist heutzutage allgemein akzeptiert, dass die Photosynthese der Ähre einen wichtigen Beitrag zum Kornertrag liefert. Die höhere Blattanzahl sowie die längere Lebenszeit der Fahnenblätter und Ähren der zwei homozygoten Linien könnte die bessere Versorgung ihrer Körner erklären. So wurde die Expression des *HvS40*-Promotors mit Hilfe des *uidA*-Reporter-Gens in einem frühen Stadium der Körner in den Hüllspelzen, Deckspelzen, Vorspelzen und in der Samenschale beobachtet. Neben einer Bestätigung der Expression des *ipt*-Gens könnte sowohl die Steigerung des Cytokinin-Gehalts in der Weizenähre als auch in Endosperm-Zellen des Weizenkorns eine weitere Erklärung für die bessere Ertragsleistung der zwei transgenen Linien sein. Denn es wurde gezeigt, dass Cytokinin die Kornanzahl steigert und die Kornentwicklung stimuliert, wenn es auf die Ähre oder auf die oberirdischen Teile der Weizenpflanze aufgetragen wird.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollte versucht werden, eine Seneszenzverzögerung in den Blättern durch den Transfer des *ipt*-Gens unter Kontrolle des homologen Seneszenz-assoziierten Promotors zu erreichen, der aber nicht in Fahnenblatt aktiv ist. Dies könnte sich letztlich günstig auf das Ährenwachstum auswirken, so dass Ähren mit einer größeren Kornzahl und somit einem höheren Kornertrag entstehen würden.

## 6 SUMMARY

Plant breeding is facing in the next 50 years enormous global challenges (the world's growing population, the progressive climate change, etc.). However, it can significantly contribute to improving the productivity of agricultural areas, because the harvest potential of many plants is not yet fully exploited. Wheat besides corn and rice is the world's most cultivated cereal. One aim of genetic research on wheat is to improve its growth and productivity.

The aim of the present work was to stimulate cytokinin biosynthesis in a variety of Argentine summer wheat (*Triticum aestivum* L.) by the transfer of an isopentenyl transferase (*ipt*-) gene under the control of a senescence-specific promoter. The enzyme isopentenyl transferase is of key importance in that it catalyses the rate-limiting step in the biosynthesis of cytokinins. The expression of senescence-associated genes (SAGs) is increased upon the onset of senescence in leaves. The employment of a senescence-specific promoter has resulted in the enhanced expression of the *ipt*-gene in the later developmental stages of the leaves of some plants (e.g. tobacco and rice) that was associated with a significant delay of leaf senescence. Senescence delayed in this way reduces the activity of the senescence-specific promoter in an autoregulatory feedback loop, thereby preventing overproduction of cytokinins. In an attempt to delay the onset of senescence by stimulating cytokinin-biosynthesis and to accordingly achieve a higher harvest yield, a hitherto unemployed gene construct was transferred into a summer variety of Argentine wheat by particle bombardment. This gene construct consists of the protein-encoding region of the isopentenyl transferase gene from *Agrobacterium tumefaciens* and the senescence-specific *HvS40*-promoter from *Hordeum vulgare*. A parallel experiment the model spring wheat variety (*Triticum aestivum* L. "Bobwhite SH 98 26") was also transformed with the *ipt*-gene under the control of the senescence-specific *SAG12*-promoter from *Arabidopsis thaliana* and analyzed up to the T<sub>2</sub>-generation.

### 6.1 SCREENING OF 22 ARGENTINE SUMMER WHEAT VARIETIES

An effective tissue culture is indispensable as a basis for the production of transgenic plants. Unfortunately, transformation efficiency is not very high in wheat genetic manipulation is thus very difficult. An initial aim was therefore to identify optimal conditions for in vitro culture. In a first screening of the immature embryos of 22 Argentine summer wheat varieties from three seed breeders, suitable genotypes were selected with regard to their ability to form embryogenic scutellar callus and to the regeneration of whole plants. The appropriate developmental stage of the immature embryos and the concentration of 2,4-D to be used as a hormone are crucial for the

success of callus formation, the first step of tissue culture. The combination of the developmental stages H and W, which differ in the lengths of the embryo and the scutellum, with two different 2,4-D concentrations (1 and 2 mg per liter of L3-5 medium) resulted in four different culture conditions to which all of the wheat varieties investigated have been exposed.

Substantial differences were observed in 22 varieties with regard to the reciprocal effect of the two applied variables (developmental stage and 2,4-D concentration) on six cell culture parameters. A total of 10091 immature embryos were tested with regard to scutellar callus induction, callus proliferation on the scutellum surface, precocious immature embryo germination, regeneration, shoot formation and cultural efficiency. The best results for five of the six parameters tested were provided by the combination of developmental stage H and the auxin concentration of 1 mg 2,4-D/L medium, whereby the Zadoks scale is a better method for defining the stage of development than the number of days after anthesis. The induction of scutellar callus formation and the regenerative capacity of the immature embryos to grow into plants depended on each of the genotype, stage of development and concentration of 2,4-D in the medium. In contrast, shoot formation depended essentially only on the genotype. On the basis of its high rates of scutellar callus formation and high regeneration ability, “Klein Brujo” was determined to be the most suitable variety of all the 22 analyzed Argentine summer wheat varieties as and was used for further investigations. Immature embryos of the genotype “Klein Brujo” were cultivated on the induction media L3-5 and MS.

The MS medium was evaluated as to the effect of 3% and 9% maltose as well as of 1 or 2 mg 2,4-D/L on the six parameters specified above. The MS medium with 3% maltose and 1 mg 2,4 D/L resulted in an improvement of the scutellar callus formation, callus proliferation on the scutellum surface, subsequent regeneration and cultural efficiency of the wheat cultivar “Klein Brujo”.

## **6.2 TRANSFORMATION BY PARTICLE BOMBARDMENT AND *IN VITRO* TISSUE CULTURE OF IMMATURE EMBRYOS OF WHEAT**

A transformation system based on particle bombardment technology was established for “Klein Brujo”. The *bar*-gene was used as a selectable marker gene and the *gfp*-gene as a marker reporter gene. Both genes are located on the plasmid pGFPBAR and are under the control of the *ubiquitin*- and the *CaMV 35S*-promoter, respectively. The transformation was performed by the simultaneous bombardment of cells with two plasmids (co-transformation), one carrying the genes of interest (pS40-GUS, pSG506, pSG516 and pS40-IPT) and the other bearing the marker-reporter gene (pGFPBAR). The plasmid pS40-IPT was newly constructed by combining the

*HvS40*-promoter from pS40-GUS (shortened by about 2 kb) and the *ipt*-gene with the *nos* terminator from pSG516. All other plasmids were placed at our disposal.

To optimize the particle bombardment of embryogenic scutellar callus with the genes of interest, three aspects of the cell culture (scutellar callus induction medium, osmotic treatment and callus induction beginning (pre-culture)) and three physical variants (distance between target tissue and stopping screen, bombardment pressure and diameter of the gold particle) were tested. Three variables were found to be crucial for a high transformation efficiency of “Klein Brujo” (10% in the best experiment): the callus induction medium, the pre-culture and the osmotic treatment.

The newly established tissue culture strategy resulted in a shortening of the *in vitro* culture duration between embryo preparation and the onset of *ex vitro* culture. The 9 to 12 weeks of this duration is one of the shortest that can be found in the literature. This method of tissue culture - together with the use of phosphinothricin (PPT) as a selection agent during *ex vitro* culture - minimized the number of so-called “false positives” among the surviving plants and resulted in a high yield of co-transformants (97.4%). However, it was not possible to cultivate transgenic T<sub>1</sub>-plants by independent segregation that were free of the marker reporter gene or the selectable marker gene as has been described in other reports. It appeared that all of the introduced genes were present in a coupling group and therefore segregated together. This is probably due to the insertion of the transgenes into a single locus or into closely associated loci. In subsequent generations (T<sub>0</sub> to T<sub>3</sub>) a progressive but differential silencing of the *bar*- and the *gfp*-genes (located on the same plasmid) was observed, which an indication of post-transcriptional gene silencing is.

Since it is advantageous to use promoters from the same or closely related plant species for genetic purposes, the barley *HvS40*-promoter was employed. Its expression during the course of natural senescence in barley leaves can be induced by both continuous darkness and pathogen attack. In a preliminary experiment the functionality of both the senescence-associated promoters (*HvS40* and SAG12) in the heterologous system of wheat was examined using the *uidA* reporter gene. The histochemical assays of *HvS40*-GUS were carried out in senescence-induced young leaves, in naturally senescing leaves, in culm and roots and in different flower parts as well as in grains of transgenic T<sub>0</sub>-plants. The mesophyll specificity of the *HvS40*-promoter in barley was not observed in wheat. The promoter was also active in epidermis and guard cells, which indicated a loss of mesophyll specificity of the *HvS40*-promoter in the heterologous system. Furthermore the induction of the *HvS40*-promoter was only by pathogen attack, which was in most cases a fungal infection, but not by the leaf senescence. In addition, an ectopic expression of the *uidA*-gene in young flower organs of wheat was observed.

In all T<sub>0</sub>-plants (six selected lines of the cultivar “Klein Brujo” with the pS40-IPT plasmid and two lines of the cultivar “Bobwhite SH 98 26” with the pSG516-plasmid) the presence of the complete protein-encoding region of the introduced *ipt*-gene could be confirmed by Southern blot analysis. The number of the integrated gene copies was between two and seven. The construct of the shortened *HvS40*-promoter and the *ipt*-gene (pS40-IPT) was expressed in wheat leaves during the course of both artificially induced and natural senescence. This was detected by means of RT-PCR of *ipt*-mRNA in T<sub>0</sub>- and T<sub>2</sub>-plants. The ability of the shortened *HvS40*-promoter to direct the expression of the *ipt*-gene during the leaf senescence in transgenic wheat suggests that *cis*-elements acting as repressors of expression in a senescing leaf were located upstream of the shortened promoter. It was previously reported that cereal promoters do not necessarily have the same effect in all cereals. This can be due to differential spatial or temporal control of expression, as well as to dependence of the promoter activity on the length of the promoter. SAG12-GUS was expressed in neither adult nor senescing leaves, nor in other organs of wheat.

### **6.3           PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF THE TRANSFER OF THE IPT-GENE AND YIELD PERFORMANCE**

The chlorophyll content of young, healthy detached flag leaves of positive *ipt*-PCR transgenic T<sub>1</sub>-plants was measured during induced senescence in to obtain an indication of the function of the *ipt*-gene under the control of both of the SAG promoters. Five of the six examined transgenes showed a significantly reduced chlorophyll loss, which suggests activity of the *ipt*-gene and an increased cytokinin concentration. The Chl a/b ratio was higher than in the controls, since Chl a was degraded more slowly than Chl b during the senescence delay. Similar results were observed in the two lines of T<sub>1</sub>-plants with the construct pSG516.

The content of the dominant cytokinins - adenine, zeatin riboside and dihydrozeatin riboside, and the *O*-glucosides derived from zeatin riboside and dihydrozeatin riboside - were analyzed in senescing flag leaves of the T<sub>1</sub>- and T<sub>2</sub>-plants of the three pS40-IPT lines showing the lowest chlorophyll degradation. A near doubling of the total cytokinin content as compared to the azygous plants could be detected in the extracts of senescing flag leaves. In most cases the zeatin riboside content constituted the highest proportion of both free and *O*-glucosides cytokinins during the grain filling stage. This was already known for other senescing *ipt*-plants. According to the results of the RT-PCR analysis, the transgenes showed a higher expression of the *ipt*-gene during the grain filling stage than after anthesis, which is considered to mark the onset of the gradual senescence of flag leaf. However, the cytokinin content in intact plants was not sufficient

to result in a significant delay of senescence in spite of the heterologous expression stemming from the barley promoter expression. This effect of *ipt*-expression may have been due to the weak promoter or to partial silencing of the transferred gene. The increased expression of the *ipt*-gene was confirmed by RT-PCR analysis of the induced senescence of young, healthy detached flag leaves as well as of naturally senescing wheat leaves. In contrast to the delay in chlorophyll degradation in induced senescence, no such effects were observed during natural senescence. This difference in behavior between natural and induced senescence in transgenic wheat leaves confirmed that the two senescence processes are different.

The cytokinin content of the T<sub>1</sub>- and T<sub>2</sub>-plants of a single SAG12-*ipt* line was determined. The transgenes showed a higher concentration of the three measured cytokinins during the grain filling phase than did the wild-type control plants, but no significant difference was observed in comparison to the azygous plants. The weak signal of *ipt*-mRNA determined by RT-PCR suggests that the SAG12 promoter is weakly expressed in senescing wheat leaves. None of the transgenic plants exhibited a distinct delay of senescence.

The T<sub>2</sub>-generation was monitored carefully throughout its life cycle during the course of the present work. The homozygous T<sub>2</sub>-plants of the four “Klein Brujo” lines and one line of the variety “Bobwhite SH 98 26” that showed expression of the *ipt*-gene by RT-PCR analysis were compared with the corresponding azygous plants. No significant difference was found between the homozygous plants of the SAG12-*ipt* line and the azygous plants of the “Bobwhite SH 98 26” variety in either the morphometric data or the yield parameters. No clearly visible delay of senescence was detected in any of the four transgenic lines of the variety “Klein Brujo” during either the sequential senescence of the leaf organs or during the canopy-wide monocarpic senescence triggered by reproductive development. However, two lines showed higher values in the parameters grain number per ear, total grain weight, grain weight per ear and average grain weight in comparison to the azygous plants. The increase in grain number was not compensated for by a lower grain weight. It is now generally accepted that ear photosynthesis makes an important contribution to the final grain yield. The more numerous leaves as well as the greater size of the flag leaves and spikes in the two homozygous lines could explain the better supply to the grains of these plants. Thus, the expression of the HvS40-promoter as detected by the uidA-reporter-gene was observed at an early developmental stage of the grains in the glumes, lemmas, palea and seed coat. In addition to confirming the expression of the *ipt*-gene, the increase in the cytokinin content of the wheat spikes and the endosperm cells of the wheat grain can provide a further explanation for the improved yield performance of the two transgenic lines. It has been

## SUMMARY

---

shown that cytokinin increases the grain number and stimulates the development of the grain when it is applied to the ear or to the whole aerial part of wheat plants.

Based on the results of this work it should be tried to achieve a delay of senescence of the seedling leaves by transfer of *ipt*-gene under control of homologous senescence-associated promoter, whose activity doesn't work in the flag leaf. This finally could have favorable impact on the spike growth, so that ears could produce more grains and thereby raise productivity.

7 ANHANG

7.1.1 Chlorophyllgehalt in T<sub>0</sub>-Pflanzen.

Der Chlorophyllgehalt von abgeschnittenen vollentwickelten Fahnenblättern der mutmaßlich transgenen und Wildtyp-Pflanzen wurde am Ende des Seneszenz-Induktionsversuchs (unter 2.3.5 beschrieben) gemessen, um die Funktion des *ipt*-Gens unter der Kontrolle beider Seneszenz-assoziiierter Promotoren zu prüfen.

Wildtyp und mutmaßlich transgene Pflanzen waren unter gleichen Bedingungen gewachsen und wurden auch im gleichen Alter beprobt. Der Versuch wurde dreimal für jedes Individuum durchgeführt. Nachdem bei abgeschnittenen Blättern zwischen sieben und zehn Tagen Seneszenz induziert (wie in 2.2.8.2 beschrieben) wurde, wurde die Chlorophyllkonzentration (mg/ml) ermittelt

Einen Überblick kann man über die zwei Sorten und die zwei Konstrukte in Tabelle 64 erhalten. Von 71 Pflanzen hatten nur 14 (19,7%) einen Chlorophyllgehalt, der über dem durchschnittlichen Wert für Wildtyppflanzen lag.

**Tab. 64: Übersicht über den Chlorophyllgehalt des Fahnenblatts von mutmaßlichen transgenen T<sub>0</sub>-Pflanzen und vom Wildtyp. Der Chlorophyllgehalt des Wildtyps entspricht dem Durchschnitt von 16 Pflanzen. n.u. (nicht untersucht).**

Sorte: Brujo Konstrukt: pS40-IPT	Chlorophyllgehalt (mg/ml)
B-153	0,70
B-156	1,66
B-165	0,30
B-166	0,09
B-169	n.u.
B-175.1	1,64
B-175.2	0,17
B-176	0,80
B-177	n.u.
B-178	n.u.
B-179	0,07
B-179.1	0,32
B-179.2	0,25
B-179.3	0,45
B-179.4	0,11

## ANHANG

B-184	n.u.
B-185	0,94
B-185.1	0,74
B-186.1	0,14
B-186.2	0,24
B-187	1,54
B-187.1	0,21
B-187.2	n.u.
B-196	0,14
B-214	0,39
B-216	0,12
B-218	n.u.
B-224	n.u.
B-241	0,39
B-242	n.u.
B-244	0,10
B-245	0,35
B-246.1	0,76
B-246.2	0,29
B-248	0,04
B-249	0,54
B-275	n.u.
B-277	n.u.
B-279	0,67
B-293.1	1,22
B-293.2	0,30
B-338	n.u.
B-339	0,17
B-344.1	0,29
B-344.2	0,18
B-344	0,20
B-346	0,93
B-346.1	n.u.
B-347	n.u.

ANHANG

B-354	0,11
B-355	1,04
Wildtyp Brujo	0,53
<b>Sorte: Bobwhite Konstrukt: pS40-IPT</b>	<b>Chlorophyllgehalt (mg/ml)</b>
Bw-34	0,29
Bw-87	0,40
Bw-517	n.u.
Bw-993	0,91
Bw-1483	0,44
Wildtyp Bobwhite	0,84
<b>Sorte: Brujo Konstrukt: pSG516</b>	<b>Chlorophyllgehalt (mg/ml)</b>
P-538	tot
P-644	0,41
P-686	tot
P-709	tot
P-859	tot
P-1143	tot
P-1237	tot
Wildtyp Brujo	0,40
<b>Sorte: Bobwhite Konstrukt: pSG516</b>	<b>Chlorophyllgehalt (mg/ml)</b>
Pw-25	n.u.
Pw-28	n.u.
Pw-67	0,11
Pw-86	n.u.
Pw-205	n.u.
Pw-317	0,22
Pw-410	0,27
Wildtyp Bobwhite	0,42

## 7.2 ÄHRE UND KORNANSATZ DER T<sub>0</sub>-PFLANZEN

Bei der Kontrolle wurden 5 Pflanzen untersucht, bei den T<sub>0</sub>-Pflanzen jeweils nur eine. Die transgenen Pflanzen der Sorte Brujo erzeugten unterschiedlich viele Ähren und fertile Karyopsen (Tabelle 65). Das gleiche gilt für die Sorte Bobwhite und deren T<sub>0</sub>-Pflanzen (Tabelle 56).

**Tab. 65: Zahl der Ähren- und Kornansatz der T<sub>0</sub>-Pflanzen der Sorte Brujo. Konstrukt: pS40-IPT.**

Pflanzen	Ähren insgesamt	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre (Durchschnitt)	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)
<b>B-153</b>	10,0	420	42	17,2	41,0
<b>B-156</b>	6,0	5	0,8	24	4,8
<b>B-175.1</b>	8,0	301	37,6	9,5	31,6
<b>B-176</b>	6,0	24	4	1	41,6
<b>B-346</b>	22,0	668	30,4	13,5	20,2
<b>B-355</b>	14,0	350	25	7,7	22,1
<b>Kontrolle (n=5)</b>	6,6	160,2	24,8	5,8	3,5

**Tab. 66: Zahl der Ähren- und Kornansatz der T<sub>0</sub>-Pflanzen der Sorte Bobwhite. Konstrukt:pSG516**

Pflanzen	Ähren insgesamt	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre (Durchschnitt)	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)
<b>Pw-317</b>	11,0	229	20,8	8,8	38,3
<b>Pw-410</b>	7,0	341	48,7	15,1	44,4
<b>Kontrolle (n = 5)</b>	7,5	296,5	39,4	8,1	27,3

7.2.1 Chlorophyllgehalt der T<sub>1</sub>-Pflanzen

7.2.1.1 Abbau des Chlorophylls in den Linien mit dem Konstrukt pSG516

**Tab. 67: Chlorophyll a und b der Linie Pw-317 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. n: Stichprobengröße. T: Transgene; K: Kontrolle (Wildtyp); K-B: Kontrolle in BAP-Lösung (Zusatz von Benzylaminopurin zum Medium (22,2 µM))**

Pflanzen	Am Anfang des Versuches			Am Ende des Versuches			Abbau in Prozenten	
	Chl a (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl b (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl a : Chl b	Chl a (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl b (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl a : Chl b	Chl a	Chl b
<b>T. (n=9)</b>	23,0 ± 4,0 <sup>a</sup>	17,5 ± 4,0 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,7 ± 3,1 <sup>a</sup>	1,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	74,9 ± 12,2 <sup>a</sup>	88,6 ± 7,7 <sup>a</sup>
<b>K. (n=6)</b>	23,1 ± 2,1 <sup>a</sup>	14,3 ± 2,1 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,9 <sup>bc</sup>	0,6 ± 0,3 <sup>bc</sup>	2,2 ± 0,4 <sup>bc</sup>	94,5 ± 3,3 <sup>bc</sup>	96,0 ± 1,9 <sup>bc</sup>
<b>K.-B (n=5)</b>	22,0 ± 5,9 <sup>a</sup>	13,7 ± 5,9 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,5 ± 3,7 <sup>ac</sup>	0,8 ± 1,1 <sup>ac</sup>	2,8 ± 0,5 <sup>ac</sup>	88,9 ± 14,0 <sup>ac</sup>	93,2 ± 9,3 <sup>ac</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach **Kruskal Wallis Test**.

7.2.1.2 Abbau des Chlorophylls in den Linien mit dem Konstrukt pS40-IPT

**Tab. 68: Chlorophyll a und b der Linie B-153 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. n: Stichprobengröße. T: Transgene; K: Kontrolle (Wildtyp); K-B: Kontrolle in BAP-Lösung (Zusatz von Benzylaminopurin zum Medium (22,2 µM))**

Pflanzen	Am Anfang des Versuches			Am Ende des Versuches			Abbau in Prozenten	
	Chl a (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl b (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl a : Chl b	Chl a (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl b (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl a : Chl b	Chl a	Chl b
<b>T. (n=13)</b>	21,1 ± 2,0 <sup>a</sup>	11,5 ± 1,2 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,6 ± 3,8 <sup>a</sup>	1,8 ± 1,6 <sup>a</sup>	2,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	79,4 ± 17,7 <sup>a</sup>	84,2 ± 14,5 <sup>a</sup>
<b>K. (n=8)</b>	22,8 ± 4,2 <sup>a</sup>	13,6 ± 4,3 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,5 <sup>ab</sup>	0,6 ± 0,4 <sup>ab</sup>	2,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	93,1 ± 5,8 <sup>a</sup>	96,2 ± 2,2 <sup>a</sup>
<b>K.-B (n=7)</b>	20,6 ± 4,4 <sup>a</sup>	13,3 ± 3,9 <sup>ac</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,5 ± 4,8 <sup>ac</sup>	3,6 ± 2,6 <sup>ac</sup>	2,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	60,7 ± 21,1 <sup>a</sup>	73,6 ± 18,1 <sup>a</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach **Kruskal Wallis Test**.

**Tab. 69: Chlorophyll a und b der Linie B-156 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. n: Stichprobengröße. T: Transgene; K: Kontrolle (Wildtyp); K-B: Kontrolle in BAP-Lösung (Zusatz von Benzylaminopurin zum Medium (22,2 µM))**

Pflanzen	Am Anfang des Versuches			Am Ende des Versuches			Abbau in Prozenten	
	Chl a (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl b (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl a : Chl b	Chl a (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl b (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl a : Chl b	Chl a	Chl b
<b>T. (n=3)</b>	21,8 ± 1,6 <sup>a</sup>	12,2 ± 2,4 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	9,5 ± 6,7 <sup>a</sup>	5,1 ± 4,7 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	55,5 ± 31,3 <sup>a</sup>	60,7 ± 30,7 <sup>a</sup>
<b>K. (n=4)</b>	21,6 ± 5,8 <sup>a</sup>	12,5 ± 6,0 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	96,3 ± 3,7 <sup>bc</sup>	97,7 ± 1,0 <sup>bc</sup>
<b>K.-B (n=3)</b>	21,3 ± 6,9 <sup>a</sup>	10,5 ± 3,7 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,3 ± 7,1 <sup>a</sup>	3,3 ± 3,0 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	66,9 ± 27,7 <sup>ad</sup>	73,7 ± 23,7 <sup>ad</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach **Kruskal Wallis Test**.

**Tab. 70: Chlorophyll *a* und *b* der Linie B-175.1 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. n: Stichprobengröße. T: Transgene; K: Kontrolle (Wildtyp); K-B: Kontrolle in BAP-Lösung (Zusatz von Benzylaminopurin zum Medium (22,2 µM))**

Pflanzen	Am Anfang des Versuches			Am Ende des Versuches			Abbau in Prozenten	
	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>
<b>T. (n=9)</b>	20,0 ± 2,7 <sup>a</sup>	8,8 ± 2,6 <sup>a</sup>	2,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	1,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,1 ± 1,7 <sup>a</sup>	90,6 ± 9,4 <sup>a</sup>	93,8 ± 7,0 <sup>a</sup>
<b>K. (n=7)</b>	23,0 ± 4,5 <sup>a</sup>	13,5 ± 4,6 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	1,8 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,4 <sup>ac</sup>	2,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	92,7 ± 6,2 <sup>ac</sup>	96,0 ± 2,3 <sup>a</sup>
<b>K.-B (n=6)</b>	20,8 ± 4,8 <sup>a</sup>	13,3 ± 3,9 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,1 ± 5,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 2,9 <sup>bc</sup>	2,6 ± 0,4 <sup>bc</sup>	63,3 ± 21,9 <sup>bd</sup>	75,0 ± 19,4 <sup>a</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach Kruskal Wallis Test.

**Tab. 71: Chlorophyll *a* und *b* der Linie B-176 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. n: Stichprobengröße. T: Transgene; K: Kontrolle (Wildtyp); K-B: Kontrolle in BAP-Lösung (Zusatz von Benzylaminopurin zum Medium (22,2 µM))**

Pflanzen	Am Anfang des Versuches			Am Ende des Versuches			Abbau in Prozenten	
	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Chl <i>b</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	Verhältnis Chl <i>a</i> : Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>
<b>T. (n=9)</b>	19,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	9,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	1,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	80,6 ± 13,7 <sup>a</sup>	85,9 ± 12,2 <sup>a</sup>
<b>K. (n=8)</b>	22,8 ± 4,2 <sup>a</sup>	13,7 ± 4,3 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,5 <sup>ab</sup>	0,6 ± 0,4 <sup>ab</sup>	2,7 ± 0,9 <sup>bc</sup>	93,1 ± 5,8 <sup>a</sup>	96,2 ± 2,2 <sup>a</sup>
<b>K.-B (n=7)</b>	20,6 ± 4,4 <sup>a</sup>	13,0 ± 3,7 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,5 ± 4,8 <sup>ac</sup>	3,6 ± 2,6 <sup>ac</sup>	2,5 ± 0,7 <sup>ad</sup>	60,7 ± 21,1 <sup>a</sup>	73,6 ± 18,1 <sup>a</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach Kruskal Wallis Test.

## 7.2.2 Ertragsleistung der T<sub>2</sub>-Pflanzen

## 7.2.3 Vier Linien mit Nutzgenkassette pS40-IPT

**Tab. 72: Überblick über „morphometrische Daten“ der Linie B-346. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem höheren Wert. \*Gemessen wurden der Haupttrieb und zwei Treiber.**

B-346	Pflanzenhöhe (cm)	Blattanzahl*	Gesamt Bestockungsgrad	Anzahl fruchtbare Bestock.	Ährelänge* (cm)	Fahnenblatt- länge* (cm)	Peduncle* (cm)
<b>Homozygot (n=6)</b>	<b>63,3 ± 3,1<sup>a</sup></b>	<b>8,8 ± 1,0<sup>a</sup></b>	6,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	<b>9,3 ± 0,3<sup>a</sup></b>	<b>45,8 ± 3,6<sup>a</sup></b>	25,9 ± 0,7 <sup>a</sup>
<b>Azygot (n=5)</b>	60,2 ± 5,3 <sup>a</sup>	8,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	<b>6,8 ± 1,6<sup>a</sup></b>	<b>6,8 ± 1,6<sup>a</sup></b>	8,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	41,6 ± 5,0 <sup>a</sup>	22,2 ± 2,1 <sup>b</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach Mann-Whitney U-Test

## ANHANG

**Tab. 73: Überblick über „morphometrische Daten“ der Linie B-355. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem höheren Wert. \*Gemessen wurden der Haupttrieb und zwei Treiber.**

B-355	Pflanzenhöhe (cm)	Blattanzahl*	Gesamt Bestockungsgrad	Anzahl fruchtbare Bestock.	Ährelänge* (cm)	Fahnenblattlänge* (cm)	Peduncle* (cm)
<b>Homozygot (n=6)</b>	58,8 ± 3,4 <sup>a</sup>	<b>8,3 ± 0,5<sup>a</sup></b>	<b>8,5 ± 1,0<sup>a</sup></b>	<b>8,5 ± 1,0<sup>a</sup></b>	<b>9,0 ± 0,5<sup>a</sup></b>	<b>40,9 ± 3,9<sup>a</sup></b>	21,7 ± 2,2 <sup>a</sup>
<b>Azygot (n=3)</b>	<b>60,5 ± 3,0<sup>a</sup></b>	8,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	7,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	7,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	8,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	<b>40,9 ± 0,9<sup>a</sup></b>	<b>23,0 ± 1,0<sup>a</sup></b>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach Mann-Whitney U-Test

**Tab. 74: Überblick über „Ertragsparameter“ der Linie B-346. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem höheren Wert.**

B-346	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)	Biomasse (g)	Ernte Index
<b>Homozygot (n=6)</b>	<b>240,0 ± 21,9<sup>a</sup></b>	<b>38,1 ± 2,4<sup>a</sup></b>	<b>9,9 ± 1,1<sup>a</sup></b>	41,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	<b>19,3 ± 2,1<sup>a</sup></b>	<b>0,52 ± 0,1<sup>a</sup></b>
<b>Azygot (n=5)</b>	214,0 ± 28,3 <sup>a</sup>	32,2 ± 3,8 <sup>b</sup>	9,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	<b>43,9 ± 1,2<sup>b</sup></b>	18,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	<b>0,52 ± 0,0<sup>a</sup></b>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach Mann-Whitney U-Test

**Tab. 75: Überblick über „Ertragsparameter“ der Linie B-355. n: Stichprobengröße. Werte ± Standardabweichung. Fett gedruckte Zahlen entsprechen dem höheren Wert.**

B-355	Gesamtzahl der Körner	Körner pro Ähre	Korn-Gewicht insgesamt (g)	Durchschnittliches Korngewicht (mg)	Biomasse (g)	Ernte Index
<b>Homozygot (n=6)</b>	<b>220,8 ± 23,3<sup>a</sup></b>	26,2 ± 3,4 <sup>a</sup>	9,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	43,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	<b>20,2 ± 1,4<sup>a</sup></b>	<b>0,48 ± 0,0<sup>a</sup></b>
<b>Azygot (n=3)</b>	213,3 ± 45,5 <sup>a</sup>	<b>28,8 ± 9,4<sup>a</sup></b>	<b>9,8 ± 2,6<sup>a</sup></b>	<b>45,3 ± 3,0<sup>a</sup></b>	20,1 ± 3,1 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,1 <sup>a</sup>

Mittelwerte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p<0,01) nach Mann-Whitney U-Test

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A-Box	Motiv verantwortlich für die Repression durch Zucker
<i>bar</i>	Gen für Phosphinothricin-N-acetyltransferase
BIOHAZ	Das Gremium für Biologische Gefahren
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	komplementäre DNA
CIMMYT	<i>Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo/ International Maize and Wheat Improvement Center</i>
<i>Chl</i>	Chlorophyll
cv.	Cultivar
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DIG	Digoxygenin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations/ Welternährungsorganisation</i>
<i>gfp</i>	Gen für green fluorescent protein
GFP	green fluorescent protein
GMO	<i>genetically modified organism</i>
GUS	Glucuronidase
GV	gentechnisch veränderte
h	Stunde
H	Weizenembryonentwicklungsstadium mit ungefähr 1,54 mm Embryo- und 1,30 mm Scutellumlänge.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HvS	<i>Hordeum vulgare</i> Seneszenz
<i>ipt</i>	Isopentenyl-Transferasegen
kb	Kilobasenpaare
L.	Linné
L3-5	L3-Medium mit 5 µM 2,4-D
M	Mol pro Liter
min	Minute
MS	Murashige-Skoog Medium
MU	4-Methylumbelliferon
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid
<i>pat</i>	Phosphinothricin-N-acetyltransferase-Gen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PPT	Phosphinothricin
psi	pounds per square inch
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S.A.	Aktiengesellschaft

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

SAG	Seneszenz-assoziierten Gen ( <i>senescence associated gene</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Ubi	Ubiquitin
<i>uidA</i>	Gen für $\beta$ -Glucuronidase
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
W	Weizenembryonentwicklungsstadium mit ungefähr 2,23 mm Embryo- und 2 mm Scutellumlänge.
X-Gluc	5-Brom-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid
AP	<u>alkalische Phosphatase</u>
CSPD	<i>Chemilumineszenz-Substrat</i> für die alkalische Phosphatase

## 9 LITERATUR

- Acevedo E, Silva P, Silva H.** 2002. Wheat growth and physiology. *BREAD WHEAT, Improvement and Production. FAO Plant Production and Protection Series No. 30.* <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4011E/y4011e06.htm>.
- Ahuja PS, Pental D, Cocking EC.** 1982. Plant-Regeneration from Leaf Base Callus and Cell-Suspensions of *Triticum-aestivum*. *Zeitschrift Für Pflanzenzuchtung-Journal of Plant Breeding* **89**, 139-144.
- Almouslem N, Amleh M, A. Najjar.** 2005. Callus induction and plant regeneration of wheat via isolated immature scutella culture: technology and applications. [http://ipac.kacst.edu.sa/edoc/2005/146250\\_1.PDF](http://ipac.kacst.edu.sa/edoc/2005/146250_1.PDF).
- Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Stoger E, Vasil.** 1996a. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) plants. *Plant Cell Reports* **16**, 12-17.
- Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Vasil IK.** 1996b. Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nat Biotechnol* **14**, 1155-9.
- Altpeter F, Diaz I, McAuslane H, Gaddour K, Carbonero P, Vasil IK.** 1999. Increased Insect Resistance in Transgenic Wheat Stably Expressing Trypsin Inhibitor Cme. *Molecular-Breeding* **5**, 53-63.
- Altpeter F, Varshney A, Abderhalden O, Douchkov D, Sautter C, Kumlehn J, Dudler R, Schweizer P.** 2005a. Stable Expression of a Defense-Related Gene in Wheat Epidermis Under Transcriptional Control of a Novel Promoter Confers Pathogen Resistance. *Plant Molecular Biology* **57**, 271-283.
- Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix PJ, Fauquet C, Huang N, Kohli A, Mooibroek H, Nicholson L, Nguyen TT, Nugent G, Raemakers K, Romano A, Somers DA, Stoger E, Taylor N, Visser R.** 2005b. Particle Bombardment and the Genetic Enhancement of Crops: Myths and Realities. *Molecular Breeding* **15**, 305-327.
- Alvarez ML, Guelman S, Halford NG, Lustig S, Reggiardo MI, Ryabushkina N, Shewry P, Stein J, Vallejos RH.** 2000. Silencing of Hmw Glutenins in Transgenic Wheat Expressing Extra Hmw Subunits. *Theoretical-and-Applied-Genetics*, **100**, 319-327.
- Anand A, Trick HN, Gill BS, Muthukrishnan S.** 2003. Stable Transgene Expression and Random Gene Silencing in Wheat. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 241-251.
- Baga M, Chibbar RN and Kartha KK.** 1999. Expression and Regulation of Transgenes for Selection of Transformants and Modification of Traits in Cereals. *I.K. Vasil (ed), Molecular Improvement of Cereal Crops. Kluwer Academic Publishers*, 83-131.
- Bapat SA, Joshi CP, Mascarenhas AF.** 1988. Occurrence and Frequency of Precocious Germination of Somatic Embryos Is a Genotype - Dependent Phenomenon in Wheat. *Plant Cell Reports* **7**, 538-541.
- Barcelo P and Lazzeri PA.** 1995. Transformation of Cereals by Microprojectile Bombardment of Immature Inflorescence and Scutellum Tissues. In: *Methods in Molecular Biology, Plant Gene*

*Transfer and Expression Protocols*, Vol. 49., pp. 113-123.

**Barneix A. J.** 2007. Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology* **164**, 581-590.

**Barro F, Rooke L, Bekes F, Gras P, Tatham AS, Fido R, Lazzeri PA, Shewry PR, Barcelo P.** 1997. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in functional properties. *Nature Biotechnology* **15**, 1295-1299.

**Barro F, Cannell ME, Lazzeri PA, Barcelo P.** 1998. The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theoretical-and-Applied-Genetics* **97**, 684-695.

**Barro F, Martin A, Lazzeri PA, Barcelo P.** 1999. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica* **108**, 161-167.

**Barry G, Kishore G, Padgett S, Taylor M, Kolacz K, Weldon M, Re D, Eichholtz D, Fincher K, Hallas L.** 1992. Inhibitors of Amino Acid Biosynthesis: Strategies for Imparting Glyphosate Tolerance to Crop Plants. **7**, 139-145.

**Beck E, and Scheibe R.** 2003. Senescence and ageing in plants and cyanobacteria. *Physiologia Plantarum* **119**, 1-4.

**Becker W and Apel K.** 1993. Differences in gene-expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* **189**, 74-79.

**Becker D, Brettschneider R, Lorz H.** 1994. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal* **5**, 299-307.

**Berna A, Bernier F.** 1997. Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein. *Plant Molecular Biology* **33**, 417-429.

**Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD.** 1983. A chimaeric antibiotic-resistance gene as a selectable marker for plant-cell transformation. *Nature* **304**, 184-187.

**Bhalla PL.** 2006. Genetic engineering of wheat - current challenges and opportunities. *Trends in Biotechnology* **24**, 305-311.

**Blechl AE and Anderson OD.** 1996. Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nature Biotechnology* **14**, 875-879.

**Bliffeld M, Mundy J, Potrykus I, Futterer J.** 1999. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical-and-Applied-Genetics* **98 (6-7)**, 1079-1086.

**Bradford MM.** 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

**Brinch-Pedersen H, Olesen A, Rasmussen SK, Holm PB.** 2000. Generation of transgenic wheat (*Triticum-aestivum* L.) for constitutive accumulation of an aspergillus phytase. *Molecular Breeding* **6**, 195-206.

**Brinch-Pedersen H, Hatzack F, Sorensen LD, Holm PB.** 2003. Concerted Action of

Endogenous and Heterologous Phytase on Phytic Acid Degradation in Seed of Transgenic Wheat (*Triticum-aestivum* L.). *Transgenic Research* **12**, 649-659.

**Brinch-Pedersen H, Hatzack F, Stoger E, Arcalis E, Pontopidan K, Holm PB.** 2006. Heat-stable phytases in transgenic wheat (*Triticum-aestivum* L.): Deposition pattern, thermostability, and phytate hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4624-4632.

**Brisibe E, Gajdosova A, Olesen A, Andersen S.** 2000. Cytodifferentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat. *Journal of Experimental Botany* **51**, 187-96.

**Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ.** 2005. Comparative Transcriptome Analysis Reveals Significant Differences in Gene Expression and Signalling Pathways Between Developmental and Dark/Starvation-Induced Senescence in Arabidopsis. *Plant Journal* **42**, 567-585.

**Bundesverband Deutscher Pflanzenzüchter e.V.** 2011. Lange Tradition. [http://www.bdp-online.de/de/Pflanzenzuechtung/Zuechtung\\_und\\_Forschung/Lange\\_Tradition/](http://www.bdp-online.de/de/Pflanzenzuechtung/Zuechtung_und_Forschung/Lange_Tradition/).

**Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.** 2010. [http://www.bvl.bund.de/DE/06\\_Gentechnik/gentechnik\\_node.html](http://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/gentechnik_node.html)

**Burrows, M., Franc, G., Rush, C., Blunt, T., Ito, D., Kinzer, K., Olson, J., O'Mara, J., Price, J., Tande, C., Ziems, A. and Stack, J.** 2009. Occurrence of viruses in wheat in the Great Plains region, 2008. *Online. Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2009-0706-01-RS.

**Callis J, Fromm M, Walbot V.** 1987. Introns increase gene-expression in cultured maize cells. *Genes & Development* **1**, 1183-1200.

**Cannell ME, Doherty A, Lazzeri PA, Barcelo P.** 1999. A Population of wheat and tritordeum transformants showing a high degree of marker gene stability and heritability. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 772-784.

**Chang HS, Jones ML, Banowetz GM, Clark DG.** 2003. Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with P<sub>SAG12</sub>-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiology* **132**, 2174-2183.

**Chawla HS, Cass LA, Simmonds JA.** 1999. Developmental and environmental regulation of anthocyanin pigmentation in wheat tissues transformed with anthocyanin regulatory genes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **35**, 403-408.

**Chen WP, Gu X, Liang GH, Muthukrishnan S, Chen PD, Liu DJ, Gill BS.** 1998. Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 1296-1306.

**Chen WP, Chen PD, Liu DJ, Kynast R, Friebe B, Velazhahan R, Muthukrishnan S, Gill BS.** 1999. Development of Wheat Scab Symptoms Is Delayed in Transgenic Wheat Plants That Constitutively Express a Rice Thaumatin-Like Protein Gene. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 755-760.

**Cheng M, Fry JE, Pang SZ, Zhou HP, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan YC.** 1997. Genetic transformation of wheat mediated by agrobacterium tumefaciens. *Plant*

*Physiology*. **115(3)**, 971-980.

**Chibbar RN, Kartha KK, Leung N, Qureshi J, Caswell K.** 1991. Transient expression of marker genes in immature zygotic embryos of spring wheat (*triticum-aestivum*) through microprojectile bombardment. *Genome* **34**, 453-460.

**Chomczynski P.** 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**, 532-537.

**Chong K, Bao SL, Xu T, Tan KH, Liang TB, Zeng JZ, Huang HL, Xu J, Xu ZH.** 1998. Functional analysis of the *ver* gene using antisense transgenic wheat. *Physiologia Plantarum* **102** (1), 87-92.

**Chowdhury SH, Kato K, Yamamoto Y, Hayashi K.** 1991. Varietal Variation in Plant-Regeneration Capacity From Immature Embryo Among Common Wheat Cultivars. *Japanese Journal of Breeding* **41**, 443-450.

**Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH.** 1992. Maize Polyubiquitin Genes - Structure, Thermal Perturbation of Expression and Transcript Splicing, and Promoter Activity Following Transfer to Protoplasts by Electroporation. *Plant Molecular Biology* **18**, 675-689.

**Clausen M, Krauter R, Schachermayr G, Potrykus I, Sautter C.** 2000. Antifungal Activity of a Virally Encoded Gene in Transgenic Wheat. *Nature Biotechnology* **18**, 446-449.

**Cowan AK, Freeman M, Bjorkman PO, Nicander B, Sitbon F, Tillberg E.** 2005. Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Planta* **221**, 801-814.

**Dangl JL, RA Dietrich, H Thomas.** 2000. Senescence and programmed cell death. *B Buchanan, W Gruissem, R Jones, eds, Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists Press, Rockville, MD.* 1044-1100.

**Danilova SA.** 2007. The Technologies for Genetic Transformation of Cereals. *Russian Journal of Plant Physiology* **54**, 569-581.

**Daskalova Sasha, Sorokin A, Scott N W, Slater A, Fowler M R., Kaminek M, Gaudinova A, Trckova M, Elliott M C.** 2002. Enhancement of Wheat Grain Yields by Delaying Leaf Senescence. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal* **38**.

**Dagüstü N.** 2008. Comparison of Callus Formation and Plantlet Regeneration Capacity From Immature Embryo Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes. *Agriculture and Environmental Biotechnology* 778-781.

**Dekeyser, R., B. Claes, R. DeRycke, M. Habets, M. van Montagu and A. Caplan.** 1990. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell* **2**: 591-602. *Plant Cell* **2**, 591-602.

**Demeke T, Hucl P, Baga M, Caswell K, Leung N, Chibbar RN.** 1999. Transgene Inheritance and Silencing in Hexaploid Spring Wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 947-953.

**Die transGEN Datenbank.** 2010. Weizen.  
<http://www.transgen.de/datenbank/pflanzen/78.weizen.html>.

**Doshi KM, Eudes F, Laroche A, Gaudet D.** 2007. Anthocyanin Expression in Marker Free

Transgenic Wheat and Triticale Embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **43**, 429-435.

**Dähnhardt D.** 2003. Untersuchungen zur Regulation der seneszenzabhängig exprimierten Gene hpd und HvS40 der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und subzelluläre Lokalisierung des HvS40 Proteins. *Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*.

**Eckes P, Rosahl S, Schell J, Willmitzer L.** 1986. Isolation and Characterization of a Light-Inducible, Organ-Specific Gene From Potato and Analysis of Its Expression After Tagging and Transfer Into Tobacco and Potato Shoots. *Molecular & General Genetics* **205**, 14-22.

**Estruch JJ, Prinsen E, Vanonckelen H, Schell J, Spena A.** 1991. Viviparous Leaves Produced by Somatic Activation of an Inactive Cytokinin-Synthesizing Gene. *Science* **254**, 1364-1367.

**European Food Safety Authority.** 2010. Genetisch veränderte Organismen. <http://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/gmo.htm>.

**Feller U., Kleist M.** 1986. Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. *Lambers H., Neeterson J.J., Stulen I. (Hrsg.), Fundamental ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht*.

**Fennell S, Bohorova N, van Ginkel M, Crossa J, Hoisington D.** 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 Elite CIMMYT bread wheats. *Theoretical and Applied Genetics* **92**, 163-169.

**Fettig S.** Expression eines chimären Stilbensynthasegens in Weizen (*Triticum aestivum* L.). *Dissertation, Universität Hohenheim, Verlag U.E. Grauer, Stuttgart*.

**Fettig S and Hess D.** 1999. Expression of a Chimeric Stilbene Synthase Gene in Transgenic Wheat Lines. *Transgenic-Research*, **8 (3)**, 179-189.

**Fischer A and Feller U.** 1994. Senescence and Protein-Degradation in Leaf Segments of Young Winter-Wheat - Influence of Lead Age. *Journal of Experimental Botany* **45**, 103-109.

**Folling L and Olesen A.** 2001. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. *Plant Cell Reports* **20**, 629-636.

**Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** 2010. The Trade and Market Division of FAO under Global Information and Early Warning System (GIEWS). *Food Outlook, Global Market Analysis*. <http://www.fao.org/docrep/012/ak349e/ak349e00.pdf>.

**Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC.** 1983. Expression of Bacterial Genes in Plant-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **80**, 4803-4807.

**Fromm M, Taylor LP, Walbot V.** 1985. Expression of Genes Transferred Into Monocot and Dicot Plant-Cells by Electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 5824-5828.

**Furtado A, Henry RJ, Pellegrineschi A.** 2009. Analysis of Promoters in Transgenic Barley and Wheat. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 240-253.

**Gadaleta A, Giancaspro A, Blechl AE, Blanco A.** 2008. A Transgenic Durum Wheat Line

That Is Free of Marker Genes and Expresses 1dy10. *Journal of Cereal Science* **48**, 439-445.

**Gan S and RM. Amasino.** 1995. Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science (Washington-D-C)* **270**, 1986-1988.

**Gan S and RM. Amasino.** 1996. Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *Bioessays* **18**, 557-565.

**Gan S and RM. Amasino.** 1997. Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). *Plant Physiol* **113**, 313-319.

**Gill BS, Appels R, Botha-Oberholster AM, Buell CR, Bennetzen JL, Chalhoub B, Chumley F, Dvorak J, Iwanaga M, Keller B, Li W, McCombie WR, Ogihara Y, Quetier F, Sasaki T.** 2004. A Workshop Report on Wheat Genome Sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. *Genetics* **168**, 1087-96.

**Godwin I D., Williams S B., Pandit P S., Laidlaw H K. C.** 2009. Multifunctional Grains for the Future: Genetic Engineering for Enhanced and Novel Cereal Quality. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **45**, 383-399.

**Gopalakrishna Sailesh, Singh Purnima, Singh Nagendra K.** 2003. Transient Expression of Foreign Genes in Mature Wheat Embryo Explants Following Particle Bombardment. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **9**, 217-223.

**Grbic V.** 2003. Sag2 and sag12 protein expression in senescing arabidopsis plants. *Physiologia Plantarum* **119**, 263-269.

**Gregersen P L., Holm P B., Krupinska K.** 2008. Leaf Senescence and Nutrient Remobilisation in Barley and Wheat. *Plant Biology* **10**, 37-49.

**Gruszka Vendruscolo Eliane Cristina, Schuster Ivan, Pileggi Marcos, Scapim Carlos Alberto, Correa Molinari Hugo Bruno, Marur Celso Jamil, Esteves Vieira Luiz Gonzaga.** 2007. Stress-Induced Synthesis of Proline Confers Tolerance to Water Deficit in Transgenic Wheat. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1367-1376.

**Grüne Gentechnik.** 2010. Warum die moderne Pflanzenzüchtung nicht darauf verzichten kann. KWS SAAT AG. [www.kws.de](http://www.kws.de).

**Haccius B.** 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus-cultures. *Phytomorphology* **28**, 74-81.

**Haliloglu K, Baenziger PS.** 2003. Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Wheat Transformation. *Cereal Research Communications* **31**, 9-16.

**Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of escherichia-coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.

**Hansen G. and MD. Chilton.** 1996. "agrolistic" Transformation of Plant Cells: Integration of T-Strands Generated in Planta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14978-14983.

**Harvey A, Moisan L, Lindup S, Lonsdale D.** 1999. Wheat Regenerated From Scutellum Callus as a Source of Material for Transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **57**, 153-156.

- He DG, G Tanner, KJ Scott.** 1986. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Science* **45**, 119-124.
- He DG, Y M Yang, KJ Scott.** 1988. A Comparison of Scutellum Callus and Epiblast Callus Induction in Wheat the Effect of Genotype Embryo Age and Medium. *PLANT-SCI (SHANNON)* **57 (3)**, 225-234.
- He DG, A Mouradov, Y M Yang, E Mouradova, KJ Scott.** 1994. Transformation of Wheat (*Triticum-aestivum* L.) Through Electroporation of Protoplasts. *Plant-cell-rep. Berlin, W. Ger. : Springer International* **14 (2/3)**, 192-196.
- Henry Y. and De Buyser J.** 1990. Wheat anther culture: agronomie performance of doubled haploid lines and the release of a new variety "Florin". *Y. P. S. BAJAJ (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Wheat Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg*. **13**.
- Hensel G, Kastner C, Oleszczuk S, Riechen J, Kumlehn J.** 2009. Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *International Journal of Plant Genomics* **2009**, 835608.
- Hensel G, Himmelbach A, Chen W, Douchkov DK, Kumlehn J.** 2011. Transgene expression systems in the triticeae cereals. *Journal of Plant Physiology* **168 (1)**, 30-44.
- Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB.** 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in arabidopsis. *Plant Cell* **5**, 553-564.
- Heppner S.** 2009. Vegetative Vermehrung einheimischer Baumarten in Südecuador, Physiologische Grundlagen und deren Umsetzung. *Dissertation, Universität Bayreuth*.
- Herrera-Estrella L, Deblock M, Messens E, Hernalsteens JP, Vanmontagu M, Schell J.** 1983. Chimeric Genes as Dominant Selectable Markers in Plant-Cells. *Embo Journal* **2**, 987-995.
- Hoertensteiner Stefan.** 2009. Stay-Green Regulates Chlorophyll and Chlorophyll-Binding Protein Degradation During Senescence. *Trends in Plant Science* **14**, 155-162.
- Hooykaas P and Schilperoort R.** 1992. Agrobacterium and Plant Genetic Engineering. *Monographs in Systematic Botany; 10 Years Plant Molecular Biology* 15-38.
- Hu T, Metz S, Chay C, Zhou HP, Biest N, Chen G, Cheng M, Feng X, Radionenko M, Lu F, Fry J.** 2003. Agrobacterium-Mediated Large-Scale Transformation of Wheat (*Triticum-aestivum* L.) Using Glyphosate Selection. *Plant Cell Reports* **21**, 1010-1019.
- Huber M, Hahn R, Hess D.** 2002. High transformation frequencies obtained from a commercial wheat (*Triticum-aestivum* L. Cv. 'combi') By microbombardment of immature embryos followed by gfp screening combined with ppt selection. *Molecular Breeding* **10**, 19-30.
- Huber M.** 2002. Optimierung des Weizentransformationssystem und Versuche zur Beeinflussung des Carotinoidmetabolismus von Weizen (*Triticum aestivum* L.) durch Transformation mit Phytoensynthasegenen. *Dissertation, Universität Höhenheim. Verlag: der andere Verlag*.
- Humbeck K, Quast S, Krupinska K.** 1996. Functional and Molecular Changes in the

Photosynthetic Apparatus During Senescence of Flag Leaves From Field-Grown Barley Plants. *Plant Cell and Environment* **19**, 337-344.

**Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.

**Inoue T, Inanaga S, Sugimoto Y, An P, Eneji AE.** 2004. Effect of Drought on Ear and Flag Leaf Photosynthesis of Two Wheat Cultivars Differing in Drought Resistance. *Photosynthetica* **42**, 559-565.

**International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications.** 2009. [www.isaaa.org](http://www.isaaa.org).

**Iser M.** 1995. Versuche zum indirekten Gentransfer in Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) und Weizen (*Triticum aestivum* L.). *Dissertation, Universität Hohenheim und Verlag U.E. Grauer, Stuttgart*.

**Iser M, Fettig S, Scheyhing F, Viertel K, Hess D.** 1999. Genotype-Dependent Stable Genetic Transformation in German Spring Wheat Varieties Selected for High Regeneration Potential. *Journal-of-Plant-Physiology* **154**, 509-516.

**Jahne A, Lazzeri PA, Jagergussen M, Lorz H.** 1991. Plant-regeneration from embryogenic cell-suspensions derived from anther cultures of barley (hordeum-vulgare l). *Theoretical and Applied Genetics* **82**, 74-80.

**Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.** 1987. Gus Fusions - Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher-Plants. *Embo Journal* **6**, 3901-3907.

**Jones HD.** 2005. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science* **41**, 137-147.

**Jordan MC.** 2000. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Reports* **19**, 1069-1075.

**Jordi W, Schapendonk A, Davelaar E, Stoopen GM, Pot CS, Visser R van, Rhijn J A, Gan S, Amasino R.** 2000. Increased Cytokinin Levels in Transgenic Psag12-Ipt Tobacco Plants Have Large Direct and Indirect Effects on Leaf Senescence, Photosynthesis and N Partitioning. *Plant Cell and Environment* **23** (3), 279-289.

**Kajimura T, Mizuno N, Takumi S.** 2010. Utility of Leaf Senescence-Associated Gene Homologs as Developmental Markers in Common Wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 851-859.

**Kaminek M, Solcova B, Motyka V, Daskalova S, Elliot MC.** 2003. Exploitation of mechanisms regulating cytokinin levels to improve cereals. *Machackova I, Romanov GA, eds. Phytohormones in plant biotechnology and agriculture. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.* 109-128.

**Karunaratne S, Sohn A, Mouradov A, Scott J, Steinbiss HH, Scott KJ.** 1996. Transformation of wheat with the gene encoding the coat protein of barley yellow mosaic virus. *Australian Journal of Plant Physiology*. **23** (4), 429-435.

**Kempe K, Rubtsova M, Gils M.** 2009. Intein-Mediated Protein Assembly in Transgenic Wheat: Production of Active Barnase and Acetolactate Synthase From Split Genes. *Plant Biotechnol J* **7**,

283-97.

**Keresa S, Baric M, Sarcevic H, Marchetti S.** 2004. Callus Induction and Plant Regeneration From Immature and Mature Embryos and Immature Inflorescences of Eight Croatian Winter Wheat Cultivars (*Triticum-aestivum* L.). *Bodenkultur* **54**, 155-161.

**Kirby EJM.** 1988. Analysis of Leaf, Stem and Ear Growth in Wheat From Terminal Spikelet Stage to Anthesis. *Field Crops Research* **18**, 127-140.

**Kishore GM, Padgett SR, Fraley RT.** 1992. History of Herbicide-Tolerant Crops, Methods of Development and Current State-of-the-Art - Emphasis on Glyphosate Tolerance. *Weed Technology* **6**, 626-634.

**Kleber-Janke T and Krupinska K.** 1997. Isolation of Cdna Clones for Genes Showing Enhanced Expression in Barley Leaves During Dark-Induced Senescence as Well as During Senescence Under Field Conditions. *Planta* **203**, 332-340.

**Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC.** 1992. High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids Into Living Cells. *Biotechnology. Stoneham, Mass. : Butterworth Publishers.* **24**, 384-386.

**Klein TM and Jones TJ.** 1999. Methods of genetic transformation: The gene gun. *Vasil IK (ed). Molecular Improvement of Cereal Crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands* 21-42.

**Kloti A, Iglesias V A, Wunn J, Burkhardt P K, Datta S K, Potrykus I.** 1993. Gene Transfer by Electroporation Into Intact Scutellum Cells of Wheat Embryos. *Plant-cell-rep. Berlin, W. Ger. : Springer International.* **12 (12)**, 671-675.

**Koncz C, Olsson O, Langridge WHR, Schell J, Szalay AA.** 1987. Expression and Assembly of Functional Bacterial Luciferase in Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 131-135.

**Krupinska K, Haussuhl K, Schafer A, Van Der Kooij TAW, Leckband G, Lorz H, Falk J.** 2002. A Novel Nucleus-Targeted Protein Is Expressed in Barley Leaves During Senescence and Pathogen Infection. *Plant Physiology* **130**, 1172-1180.

**Kumlehn J and Hensel G.** 2009. Genetic Transformation Technology in the Triticeae. *Breeding Science* **59**, 553-560.

**Leckband G and Lorz H.** 1998. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **96**, 1004-1012.

**Lee GH, Rodgers L, Taylor BH.** 1995. Beta-Glucuronidase as a Marker for Clonal Analysis of Tomato Lateral Roots. *Transgenic Research* **4**, 123-131.

**Li Y, Hagen G, Guilfoyle TJ.** 1992. Altered Morphology in Transgenic Tobacco Plants That Overproduce Cytokinins in Specific Tissues and Organs. *Developmental Biology* **153**, 386-395.

**Lim Pyung Ok, Kim HYO Jung, Nam Hong Gil.** 2007. Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115-136.

**Lin YJ, Cao ML, Xu CG, Chen H, Wei J, Zhang QF.** 2002. Cultivating Rice with Delaying

- Leaf-Senescence by PSAG12-IPT Gene Transformation. *Acta Botanica Sinica* **44**, 1333-1338.
- Loerz H, Baker B, Schell J.** 1985. Gene Transfer to Cereal Cells Mediated by Protoplast Transformation. *Molecular and General Genetics* **199**, 179-182.
- Lohman K N, Gan S, John MnC and Amasino R M.** 1994. Molecular Analysis of Natural Leaf Senescence in Arabidopsis Thaliana. *Physiologia-Plantarum* **92 (2)**, 322-328.
- Lonsdale DM, Lindup S, Moisan LJ, Harvey AJ.** 1998. Using firefly luciferase to identify the transition from transient to stable expression in bombarded wheat scutellar tissue. *Physiologia Plantarum* **102 (3)**, :447-453.
- Low PF, Davey BG, Lee KW, Baker DE.** 1968. Clay Sols versus Clay Gels: Biological Activities Compared. *Science* **161**, 897.
- Ludwig SR, Bowen B, Beach L, Wessler SR.** 1990. A Regulatory Gene as a Novel Visible Marker for Maize Transformation. *Science* **247**, 449-450.
- Talukder M., Shamsuddin A, Rahman H and Hassan L.** 2004. Effect of Media Components on Nature of Callus and Subsequent Regeneration of Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Cult.* **14 (2)** , 113-121.
- Maddock SE, Lancaster VA, Risiott R, Franklin J.** 1983. Plant-regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (triticum-aestivum). *Journal of Experimental Botany* **34**, 915-926.
- Magnusson I, Bornman CH.** 1985. Anatomical observations on somatic embryogenesis from scutellar tissues of immature zygotic embryos of *Triticum aestivum*. *Physiol Plant Copenhagen : Scandinavian Society for Plant Physiology* **63 (2)**, 137-145.
- Marcotte WR, Russell SH, Quatrano RS.** 1989. Abscisic Acid-Responsive Sequences From the Em Gene of Wheat. *Plant Cell* **1**, 969-976.
- Mascarenhas D, Mettler IJ, Pierce DA, Lowe HW.** 1990. Intron-Mediated Enhancement of Heterologous Gene-Expression in Maize. *Plant Molecular Biology* **15**, 913-920.
- Mathias RJ.** 1990 Factors affecting the establishment of callus cultures in wheat. *Bajaj YPS (F\_xl) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* **13**, 25-45.
- Maydup M L, Antonietta M, Guiamet J J, Graciano C, Lopez J R, Tambussi E A.** 2010. The Contribution of Ear Photosynthesis to Grain Filling in Bread Wheat (*Triticum-aestivum* L.). *Field Crops Research* **119** , 48-58.
- McCabe MS, Garratt LC, Schepers F, Jordi WJ, Stoopen GM, Davelaar E, van Rhijn JH, Power JB, Davey MR.** 2001. Effects of P(SAG12)-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol* **127**, 505-16.
- Miralles DJ.** 2004. Consideraciones sobre ecofisiologķa y manejo de Trigo. *Informaci3n tķcnica de trigo. Campańa 2004. Publicaci3n Miscelķnea Nŗ 101. Mayo 2004.* 1-7.
- Mitic N, Nikolic R, Ninkovic S, Miljus-Djukic J, Neskovic M.** 2004. Agrobacterium-Mediated Transformation and Plant Regeneration of *Triticum-aestivum* L. *Biologia Plantarum* **48**, 179-184.

- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F.** 2011. Ros Signaling: the New Wave? *Trends in Plant Science* **16**, 300-309.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-&.
- Muthukrishnan S, Liang GH, Trick HN, Gill BS.** 2001. Pathogenesis-Related Proteins and Their Genes in Cereals. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **64**, 93-114.
- Nehra NS, Chibbar RN, Leung N, Caswell K, Mallard C, Steinhauer L, Baga M, Kartha KK.** 1994. Self-Fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile with two distinct gene constructs. *Plant-Journal* **5: 2**, 285-297.
- Nooden LD, Guiamet JJ, John I.** 1997. Senescence Mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**, 746-753.
- Odell J, Caimi P, Sauer B, Russell S.** 1990. Site-Directed Recombination in the Genome of Transgenic Tobacco. *Molecular & General Genetics* **223**, 369-378.
- Oerke EC.** 2006. Crop Losses to Pests. *Journal of Agricultural Science* **144**, 31-43.
- Ogawa Y, Tsuruoka T, Inouye S, Niida T.** 1973. Studies on a new antibiotic SF-1293. *Sci Rep Meiji Seika* **13**, 42-48.
- Ogawa T, Kawahigashi H, Toki S, Handa H.** 2008. Efficient Transformation of Wheat by Using a Mutated Rice Acetolactate Synthase Gene as a Selectable Marker. *Plant Cell Reports* **27**, 1325-1331.
- Olsen O, Wang XZ, Von Wettstein D.** 1993. Sodium-Azide Mutagenesis - Preferential Generation of A.t -] G.c Transitions in the Barley Ant18 Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8043-8047.
- Omirulleh S, Ismagulva A, Karabaev M, Meshi T & Iwabuchi M.** 1996. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into cells of wheat (*Triticum-aestivum* L.) mature embryos. *Plant Cell Rep.* **16**, 133-136.
- Vasil JPA, Reggiardo MI, Ravizzini RA, Altabe SG, Cervigni GDL, Spitteler MA, Morata MM, Elias FE, Vallejos RH.** 1996. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Reports.* **15 (12)**, 877-881.
- Oszvald M, Gardonyi M, Tamas C, Takacs I, Jenes B, Tamas L.** 2008. Development and Characterization of a Chimaeric Tissue-Specific Promoter in Wheat and Rice Endosperm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **44**, 1-7.
- Ow DW, Jacobs JD, Howell SH.** 1987. Functional Regions of the Cauliflower Mosaic Virus-35s Rna Promoter Determined by Use of the Firefly Luciferase Gene as a Reporter of Promoter Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 4870-4874.
- Özgen M, Turet M, Ozcan S, Sancak C.** 1996. Callus Induction and Plant Regeneration From Immature and Mature Embryos of Winter Durum Wheat Genotypes. *Plant Breeding* **115**, 455-458.

- Özgen M, Turet M, Altinok S, Sancak C.** 1998. Efficient Callus Induction and Plant Regeneration From Mature Embryo Culture of Winter Wheat (*Triticum-aestivum* L.) Genotypes. *Plant Cell Reports* **18**, 331-335.
- Ozias-Akins P and Vasil IK.** 1982. Plant Regeneration from Cultured Immature Embryos and Inflorescences of *Triticum-aestivum* L (Wheat) - Evidence for Somatic Embryogenesis. *Protoplasma* **110**, 95-105.
- Pang Sheng Zhi, Deboer David L, Wan Yuechun, Ye Guangning, Layton Jeanne G, Neher Margaret K, Armstrong Charles L, Fry Joyce E, Hinchee Maud A W, Fromm Michael E.** 1996. An Improved Green Fluorescent Protein Gene as a Vital Marker in Plants. *Plant-Physiology (Rockville)* **112**, 893-900.
- Pant D R, Bhattarai T, Beck E, Fettig S.** 2009. Genetic Transformation of Nepalese Spring Wheat (*Triticum-aestivum* L.) Cultivars With Ipt Gene Under the Regulation of a Senescence Enhanced Promoter From Maize. *Pak J Biol Sci* **12**.
- Parry Martin A. J., Reynolds Matthew, Salvucci Michael E., Raines Christine, Andralojc P John, Zhu Xin-Guang, Price G Dean, Condon Anthony G., Furbank Robert T.** 2011. Raising Yield Potential of Wheat. Ii. Increasing Photosynthetic Capacity and Efficiency. *Journal of Experimental Botany* **62**, 453-467.
- Pastori GM, Wilkinson MD, Steele SH, Sparks CA, Jones HD, Parry AJ.** 2001. Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *Journal of Experimental Botany* **52**, 857-863.
- Patnaik, D. and P. Khurana.** 2001. Wheat Biotechnology: A minireview. *Elec J Biotech* **4**, 74-102.
- Patnaik, D. and P. Khurana.** 2003. Genetic Transformation of Indian Bread (T-Aestivum) and Pasta (T-Durum) Wheat by Particle Bombardment of Mature Embryo-Derived Calli. *Bmc Plant Biology* **3** (5), 1-11.
- Pedersen C. Zimny J. Becker D. Jahnegartner A. Lorz H.** 1997. Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by fluorescence in situ hybridization. *Theoretical & Applied Genetics.* **94** (6-7), 749-757.
- Pellegrineschi A, Mclean S, Salgado M, Velazquez L, Hernandez R, Brito RM, Noguera M, Medhurst A, Hoisington D.** 2001. Transgenic Wheat Plants: a Powerful Breeding Source. *Euphytica* **119**, 133-136.
- Pellegrineschi A, Noguera LM, Skovmand B, Brito RM, Velazquez L, Salgado MM, Hernandez R, Warburton M, Hoisington D.** 2002. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. *Genome* **45**, 421-30.
- Pennell RI and Lamb C.** 1997. Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* **9**, 1157-1168.
- Pereira JF, Zhou GF, Delhaize E, Richardson T, Zhou MX, Ryan PR.** 2010. Engineering Greater Aluminium Resistance in Wheat by Over-Expressing Taalmt1. *Annals of Botany* **106**, 205-214.
- Permingeat HR, Alvarez ML, Cervigni GDL, Ravizzini RA, Vallejos RH.** 2003. Stable Wheat Transformation Obtained Without Selectable Markers. *Plant Molecular Biology* **52**, 415-

419.

**Peters W, Ritter J, Tiller H, Valdes O, Renner U, Fountain M, Beck E.** 2000. Growth, Ageing and Death of a Photoautotrophic Plant Cell Culture. *Planta* **210**, 478-487.

**Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE.** 1989 Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **975 (3)**, 384-394

**Quirino BF, Noh YS, Himmelblau E, Amasino RM.** 2000. Molecular Aspects of Leaf Senescence. *Trends in Plant Science* **5**, 278-282.

**Rasco-Gaunt S, Riley A, Barcelo P, Lazzeri PA.** 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports* **19**, 118-127.

**Rasco-Gaunt S, Riley A, Cannell M, Barcelo P, Lazzeri PA.** 2001. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment . *Journal of Experimental Botany* **52**, 865-874.

**Rasco-Gaunt S, Liu D, Li CP, Doherty A, Hagemann K, Riley A, Thompson T, Brunkan C, Mitchell M, Lowe K, Krebbers E, Lazzeri P, Jayne S, Rice D.** 2003. Characterisation of the Expression of a Novel Constitutive Maize Promoter in Transgenic Wheat and Maize. *Plant Cell Reports* **21**, 569-576.

**Razzaq A ZMHW.** 2009. Genetic Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.): A Review. *Triticeae Genomics and Genetics* **1 (2)**, 1-7.

**Redway FA, Vasil V, Lu D, Vasil IK.** 1990. Identification of Callus Types for Long-Term Maintenance and Regeneration From Commercial Cultivars of Wheat (*Triticum-Aestivum* L). *Theoretical and Applied Genetics* **79**, 609-617.

**Robson PRH, Donnison IS, Wang K, Frame B, Pegg SE, Thomas A, Thomas H.** 2004. Leaf senescence is delayed in maize expressing the agrobacterium ipt gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 101-112.

**Sakakibara H.** 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449.

**Sanford JC, Smith FD, Russell JA, Wu R.** 1993. Optimizing the Biolistic Process for Different Biological Applications. *Recombinant-DNA.-Part-H.; Methods in Enzymology* **217**; 55 ref. 483-509.

**Schaaf J, Walter MH, Hess D.** 1995. Primary Metabolism in Plant Defense. Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues. *Plant-Physiology* **108: 3**, 949-960.

**Schaz U.** Analyse des Wachstums von Tabakpflanzen bei ambierter (360 ppm) und erhöhter (700 ppm) CO<sub>2</sub>-Konzentration. *Dissertation, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth* **2003**.

**Scheumann V, Schoch S, Rudiger W.** 1999. Chlorophyll B Reduction During Senescence of Barley Seedlings. *Planta* **209**, 364-370.

- Scheyhing F.** 1999. Transformation von Weizen (*Triticum aestivum* L.) mit chimären Pilzresistenzgenen zur Verbesserung der Phytopathogenabwehr. *Dissertation, Universität Hohenheim, Verlag U.E. Grauer, Stuttgart.*
- Schopfer P, Brennicke A.** 2010. Pflanzenphysiologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, (7. Auflage )708 pp.*
- Schroeder KR, Stimart DP, Nordheim EV.** 2001. Response of nicotiana alata to insertion of an autoregulated senescence-inhibition gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**, 523-530.
- Scott, KJ, He, DG., Yang, YM.** 1990. Somatic embryogenesis in wheat. *Biotechnology in agriculture and forestry, ed. Y.P.S. Bajaj* **13**, 45-67.
- Sears RG and Deckard EL.** 1982. Tissue-Culture Variability in Wheat - Callus Induction and Plant-Regeneration. *Crop Science* **22**, 546-550.
- Sheen J. Hwang SB. Niwa Y. Kobayashi H. Galbraith DW.** 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant Journal.* **8 (5)**, 777-784.
- Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H.** 1989. Fertile Transgenic Rice Plants Regenerated From Transformed Protoplasts. *Nature* **338**, 274-276.
- Simmonds J, Cass L, Harris L, Allard S.** 2001. Wheat aleurone regulatory region. *Her Majesty the Queen in right of Canada, as represented by the Minister of Agriculture, Ontario, Canada* **1253 (1)**.
- Simmonds J, Cass L, Routly E, Hubbard K, Donaldson R, Bancroft B, Davidson A, Hubbard S, Simmonds D.** 2004. Oxalate Oxidase: a Novel Reporter Gene for Monocot and Dicot Transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **40**, 49A.
- Singh N and Chawla HS.** 1999. Use of Silicon Carbide Fibers for Agrobacterium-Mediated Transformation in Wheat. *Current Science* **76**, 1483-1485.
- Smart CM.** 1994. Gene-Expression During Leaf Senescence. *New Phytologist* **126**, 419-448.
- Sorokin A, Ke X, Chen D, Elliott M.** 2000. Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *PLANT SCIENCE* **156 (2)**, 227-233.
- Sparks CA and Jones HD.** 2009. Biolistics Transformation of Wheat. *Methods in Molecular Biology* **478**, 71-92.
- Srivastava Vibha, Anderson Olin D, Ow David W.** 1999. Single-Copy Transgenic Wheat Generated Through the Resolution Of Complex Integration Patterns. *Proceedings-of-the-National-Academy-of-Sciences-of-the-United-States-of-America* **96 (20)**, 11117-11121.
- Stoger E, Williams S, Christou P, Down RE, Gatehouse JA.** 1999. Expression of the Insecticidal Lectin From Snowdrop (*Galanthus Nivalis* Agglutinin; Gna) in Transgenic Wheat Plants: Effects on Predation by the Grain Aphid *Sitobion Avenae*. *Molecular-Breeding* **5 (1)**, 65-73.
- Stoger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, Fischer R.** 2000. Cereal Crops as Viable Production and Storage Systems for Pharmaceutical Scfv Antibodies. *Plant Molecular Biology* **42**, 583-590.

**Strauch E, Wohlleben W, Puhler A.** 1988. Cloning of a Phosphinothricin N-Acetyltransferase Gene From *Streptomyces-Viridochromogenes* Tu494 and Its Expression in *Streptomyces-Lividans* and *Escherichia-Coli*. *Gene* **63**, 65-74.

**Sykorova B, Kuresova G, Daskalova S, Trckova M, Hoyerova K, Raimanova I, Motyka V, Travnickova A, Elliott MC, Kaminek M.** 2008. Senescence-induced ectopic expression of the *A. tumefaciens ipt* gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield. *Journal of Experimental Botany* **59**, 377-387.

**Russel-Kikkert J.** 1993. The biolistic? PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **33**, 221-226.

**Tachibana K, Watanabe T, Sekizawa Y, Takematsu T.** 1986. Action Mechanism of Bialaphos.1. Inhibition of Glutamine-Synthetase and Quantitative Changes of Free Amino-Acids in Shoots of Bialaphos-Treated Japanese Barnyard Millet. *Journal of Pesticide Science* **11**, 27-31.

**Talukder M., Shamsuddin A, Rahman H and Hassan L.** 2004. Effect of Media Components on Nature of Callus and Subsequent Regeneration of Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Cult.* **14** (2) , 113-121.

**Tambussi EA, Bort J, Guiamet JJ, Nogues S, Araus JL.** 2007. The Photosynthetic Role of Ears in C(3) Cereals: Metabolism, Water Use Efficiency and Contribution to Grain Yield. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**, 1-16.

**Tenover FC, Gilbert T, Ohara P.** 1989. Nucleotide-Sequence of a Novel Kanamycin Resistance Gene, Apha-7, From *Campylobacter-Jejuni* and Comparison to Other Kanamycin Phosphotransferase Genes. *Plasmid* **22**, 52-58.

**Thomas H, Donnison I.** 2000. Back From the Brink: Plant Senescence and Its Reversibility. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **52**, 149-62.

**Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J.** 1987. Characterization of the Herbicide-Resistance Gene Bar From *Streptomyces-Hygroscopicus*. *Embo Journal* **6**, 2519-2523.

**Tör M, Mantell S H, Ainsworth C.** 1992. Endophytic Bacteria Expressing  $\beta$ -Glucuronidase Cause False Positives in Transformation of *Dioscorea* Species. *Plant Cell Reports* **11**, 452-456.

**Vain, P, McMullen, M.D., Finer, J.J.** 1993. Osmotic Treatment Enhances Particle Bombardment-Mediated Transient and Stable Transformation of Maize. *Plant-Cell-Rep. Berlin, W. Ger. Springer International* **12** (2), 84-88.

**Van Den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, Bedbrook JR.** 1985. A Chimeric Hygromycin Resistance Gene as a Selectable Marker in Plant Cells. *Plant Molecular Biology* **5**, 299-302.

**Varshney Alok and Altpeter Fredy.** 2001. Stable Transformation and Tissue Culture Response in Current European Winter Wheats (*Triticum-aestivum* L.). *Molecular Breeding* **8**, 295-309.

**Vasil IK.** 1987. Developing cell and tissue-culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *Journal of Plant Physiology* **128**, 193-218.

**Vasil IK.** 1994. Molecular Improvement of Cereals. *Plant molecular biology. Dordrecht:*

*Kluwer Academic Publishers. 25 (6), 925-937.*

**Vasil V, Vasil IK.** 1982. Characterization of an embryogenic cell-suspension culture derived from cultured inflorescences of *pennisetum-americanum* (pearl millet, gramineae). *American Journal of Botany* **69**, 1441-1449.

**Vasil, V., Clancy, M., Ferl, R.J., Vasil, I.K., Hannah, L.C.** 1989. Increased Gene Expression by the First Intron of Maize Shrunken-1 Locus in Grass Species. *Plant-Physiol. Rockville, Md. : American Society of Plant Physiologists* **91 (4)**, 1575-1579.

**Vasil V, Brown SM, Re D, Fromm ME, Vasil IK.** 1991. Stably Transformed Callus Lines From Microprojectile Bombardment of Cell-Suspension Cultures of Wheat. *Bio-Technology* **9**, 743-747.

**Vasil V, Castilo A M, Fromm M E, Vasil I K.** 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* **10**, 667-674.

**Vasil V, Srivastava V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK.** 1993. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio-Technology* **11**, 1553-1558.

**Viertel, K., M. Iser, A. Schmid and D. Hess.** 1997. Indirekter Gentransfer in Weizen über isolierte Sproßspitzen. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **38**, 17-39.

**Viertel K, Schmid A, Iser M, Hess D.** 1998. Regeneration of german spring wheat varieties from embryogenic scutellar callus. *Journal of Plant Physiology* **152**, 167-172.

**Wagner, G. und Hess, D.** 1973. *In vitro*-Befruchtungen bei *Petunia hybrida*. *Z. Pflanzenphysiol.* **69**, 262-269.

**Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM.** 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol* **37**, 455-69.

**Weeks J, Anderson O, Blechl A.** 1993. Rapid Production of Multiple Independent Lines of Fertile Transgenic Wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol* **102**, 1077-1084.

**Weeks J, Koshiyama K, Maier-Greiner U, Schaeffner T, Anderson O.** 2000. Wheat transformation using cyanamide as a new selective agent. *Crop Science* **40**, 1749-1754.

**Weir B, Gu X, Wang MB, Upadhyaya N, Elliott AR, Brettell RIS.** 2001. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visual marker. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 807-818.

**Wenck A, Pugieux C, Turner M, Dunn M, Stacy C, Tiozzo A, Dunder E, Van Grinsven E, Khan R, Sigareva M, Wang WC, Reed J, Drayton P, Oliver D, Trafford H, Legris G, Rushton H, Tayab S, Launis K, Chang YF, Chen DF, Melchers L.** 2003. Reef-Coral Proteins as Visual, Non-Destructive Reporters for Plant Transformation. *Plant Cell Reports* **22**, 244-251.

**Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmulling T.** 2001. Regulation of Plant Growth by Cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10487-10492.

- Werner Tomas and Schmuelling Thomas.** 2009. Cytokinin Action in Plant Development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527-538.
- Wernicke W and Milkovits L.** 1986. The Regeneration Potential of Wheat Shoot Meristems in the Presence and Absence of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Protoplasma* **131**, 131-141.
- Wiley PR, Tosi P, Evrard A, Lovegrove A, Jones HD, Shewry PR.** 2007. Promoter Analysis and Immunolocalisation Show That Puroindoline Genes Are Exclusively Expressed in Starchy Endosperm Cells of Wheat Grain. *Plant Molecular Biology* **64**, 125-136.
- Wohlleben W, Arnold W, Broer I, Hillemann D, Strauch E, Puhler A.** 1988. Nucleotide-Sequence of the Phosphinothricin N-Acetyltransferase Gene From *Streptomyces-Viridochromogenes-Tu494* and Its Expression in *Nicotiana-Tabacum*. *Gene* **70**, 25-37.
- Wright M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Reed J, Kramer C, Chang Y, Novitzky R, Wang H, Artim-Moore L.** 2001. Efficient Biolistic Transformation of Maize (*Zea Mays* L.) And Wheat (*Triticum-aestivum* L.) Using the Phosphomannose Isomerase Gene, Pmi, as the Selectable Marker. *Plant Cell Reports* **20**, 429-436.
- Wu H, Sparks C, Amoah B, Jones HD.** 2003. Factors Influencing Successful *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation of Wheat. *Plant Cell Reports* **21**, 659-668.
- Xi. Y., Y. Lin, O. Zhang, W. Hou and M. Lu.** 2004a. Studies on Introduction of Leaf Senescence-inhibition Gene P-(SAG12)-IPT into Common Wheat through Pollen-tube Pathway. *Acta Agronomica Sinica* **30** (6) , 608-12.
- Xi Y, Zhang O, Lin Y, Hou W and Lu M.** 2004b. Introduction of leaf senescence-inhibiting gene PSUB SAG12-IPT into common wheat via *Agrobacterium tumefaciens* soaked seeds. *Scientia Agricultura Sinica.* **37**, 1235-1238.
- Yang JC, Zhang JH, Wang ZQ, Zhu QS, Liu LJ.** 2003. Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant Cell and Environment* **26**, 1621-1631.
- Yoder JI and Goldsbrough AP.** 1994. Transformation Systems for Generating Marker-Free Transgenic Plants. *Bio-Technology* **12: 3**, 263-267.
- Young TE, Giesler-Lee J, Gallie DR.** 2004. Senescence-induced expression of cytokinin reverses pistil abortion during maize flower development. *Plant Journal* **38**, 910-922.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF.** 1974. Decimal code for growth stages of cereals. *Weed Research* **14**, 415-421.
- Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Vanmontagu M, Schell J.** 1983. Ti-Plasmid Vector for the Introduction of Dna Into Plant-Cells Without Alteration of Their Normal Regeneration Capacity. *Embo Journal* **2**, 2143-2150.
- Zeng JZ, Wu YQ, Wang DJ, Zhang J, Ma ZR, Zhou ZY.** 1998. Genetic Expression in Progeny of Transgenic Plants Obtained by Using Pollen-Tube Pathway (or Delivery) Method and Approach to the Transformation Mechanism. *Chinese Science Bulletin* **43**, 798-803.
- Zhang HM, Yang H, Rech EL, Golds TJ, Davis AS, Mulligan BJ, Cocking EC, Davey MR.** 1988. Transgenic Rice Plants Produced by Electroporation-Mediated Plasmid Uptake Into Protoplasts. *Plant Cell Reports* **7**, 379-384.

- Zhang S, Warkentin D, Sun B, Zhong H, Sticklen M.** 1996. Variation in the inheritance of expression among subclones for unselected (uid) and selected (bar) transgenes in maize (*zea mays* l). *Theoretical & Applied Genetics* **92** (6), 752-761.
- Zhang L, French R, Langenberg W, Mitra A.** 2001. Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease. *Transgenic research* **10** (1), 13-9.
- Zhang CJ, Chen GX, Gao XX, Chu CJ.** 2006. Photosynthetic decline in flag leaves of two field-grown spring wheat cultivars with different senescence properties. *South African Journal of Botany* **72**, 15-23.
- Zhou H, Arrowsmith JW, Fromm ME, Hironaka CM, Taylor ML, Rodriguez D, Pajean ME, Brown SM, Santino CG, Fry JE.** 1995. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Reports* **15**, 159-163.
- Zhuang J, Jia X, Chen G.** 1984. Studies on Induction of Plant Differentiation in Pollen Callus of Wheat. *Acta Genetica Sinica* **05**. 001-007.

### DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. em. Erwin Beck für seine langjährige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Sebastian Fettig für die Überlassung des Themas. Seine Ideen und stete Diskussionsbereitschaft sowie die konstruktive Arbeitsatmosphäre haben erheblich zur erfolgreichen Durchführung der Doktorarbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Stephan Clemens danke ich für seine Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Dr. Deepak Pant und Dr. Ulrich Sentner für die gute gemeinsame Zeit und die anregenden Diskussionen.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung molekularbiologischer Laborarbeiten möchte ich mich bei Pia Schuster und Heidi Jäger bedanken.

Ich danke auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls Pflanzenphysiologie für die Herzlichkeit, das Teilen von Freud und Leid des wissenschaftlichen Lebens und die Hilfsbereitschaft.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Eduardo Sanchez, Dr. Marcia Mazzuca, Dr. Sina Heppner, PD Christiane Reinbothe, Dr. Paul Ziegler, Ursula Ferrera, Prof. Dr. Heiko Rödel, Anton Wölfel, Markus Greissing, Christiane Jakob, Sabrina Sattler, Wolfgang Weiß, Dr. Kristin Roos und Dr. Oscar Valdés für ihre Hilfe.

Für die Überlassung von Vektoren und die Weizensorten danke ich: Prof. Dr. Krupsinska, Dr. Huber Mathias, José Buck S.A, Criadores Klein S.A. und Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern danke ich für die moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Bei dem Katolischen Akademischen Austauschdienst, der Vater und Sohn Eiselen Stiftung und The International Club bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

## ERKLÄRUNG

---

### **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderer Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, 08. Februar 2012

.....  
(Eduardo Daniel Souza Canada)