

Lehrstuhl für Genetik  
der  
Technischen Universität München

# **Etablierung eines Transposon-Tagging-Systems in transgener Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

**Christine Schäfer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 11.12.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 14.01.2003 angenommen.

---

<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>4</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
<b>1. SYSTEMATIK UND HERKUNFT DER GERSTE .....</b>	<b>7</b>
<b>2. WIRTSCHAFTLICHE BEDEUTUNG UND VERWENDUNG DER GERSTE .....</b>	<b>8</b>
<b>3. GEWEBEKULTUR UND TRANSFORMATION .....</b>	<b>9</b>
<b>4. TRANSPOSON TAGGING.....</b>	<b>11</b>
<b>5. ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. CHEMIKALIEN UND ENZYME .....</b>	<b>17</b>
<b>2. PFLANZENANZUCHT UND -TRANSFORMATION .....</b>	<b>18</b>
2.1 Geräte und Materialien .....	18
2.2 Sonstige Geräte.....	19
<b>3. PLASMIDE .....</b>	<b>19</b>
<b>4. KONSTRUKTE FÜR DIE ETABLIERUNG DES ZWEI-KOMPONENTEN-SYSTEMS: .....</b>	<b>20</b>
<b>5. VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME UND ANZUCHT .....</b>	<b>22</b>
<b>6. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>23</b>
6.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation .....	23
6.1.1 <i>E. coli</i> : .....	23
6.1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : .....	23
6.2 Transformation von <i>Agrobacterium</i> über Tri-parental mating.....	24
6.3 Präparation von DNA .....	25
6.3.1 <i>E.coli</i> :.....	25
6.3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> :.....	25
6.3.3 Pflanzen: .....	26
6.4 Southern Blot-Hybridisierung.....	26
6.5 PCR.....	28
6.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	29
6.7 Analyse der Übergänge zwischen T-DNA und Pflanzen-DNA .....	29
<b>7. HERSTELLUNG TRANSFORMIERTER GERSTE-PFLANZEN .....</b>	<b>32</b>
7.1 Pflanzenmaterial .....	32
7.1.1 Untransformierte Pflanzen (Spenderpflanzen).....	32
7.1.2 Anzucht der Spenderpflanzen .....	32
7.1.3 Transformierte Pflanzen.....	34

---

7.2 Ernte und Isolierung unreifer Gersten-Embryonen .....	34
7.3 Transformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	35
7.3.1 Vorbereitung der Bakterien .....	35
7.3.2 Transformation von Gersten-Embryonen mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	35
7.4 Gewebekultur .....	36
7.4.1 Medien für die Kultur der Embryonen .....	36
7.4.2 Weitere Kultur der Embryonen .....	37
<b>8. ANALYSE TRANSGENER PFLANZEN .....</b>	<b>38</b>
8.1 GUS Histochemische Färbung .....	38
8.2 "BASTA"-Sprühtest .....	39
<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>1. GEWEBEKULTUR UND TRANSFORMATION .....</b>	<b>40</b>
1.1 Spezifischer Nachweis von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	40
1.2 Zerstörung der Keimachse .....	42
1.3 Etablierung der Transformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	43
<b>2. ETABLIERUNG DER TRANSFORMATIONS-METHODE .....</b>	<b>47</b>
2.1 Das <i>bar</i> -Gen als Selektions-Marker .....	47
2.2 <i>gus</i> als Reporter-Gen .....	48
2.3 Verwundung durch Partikel-Beschuß .....	49
2.4 Ist Partikel-Beschuß notwendig? .....	50
2.5 Vakuum-Infiltration .....	51
<b>3. ANALYSE DER MIT PDM805 TRANSFORMIERTEN PFLANZEN .....</b>	<b>57</b>
3.1 Gus-Färbung .....	57
3.2 Analyse durch Southern Blot .....	58
3.3 Analyse der T-DNA-Integrationsstellen .....	64
<b>4. TRANSFORMATION DES ZWEI-KOMPONENTEN-SYSTEMS UND ANALYSE DES TRANSGENEN GEWEBES .....</b>	<b>66</b>
4.1 <i>En/Spm</i> als molekulares Werkzeug .....	66
4.2 Klonierung der Konstrukte für das Zwei-Komponenten-System .....	67
4.2.1 Aktivierbare Komponente: nicht-autonomes Element <i>dSpm/En I6078</i> .....	68
4.2.2 Excisions-Reporter: <i>35SI6078gus-bar</i> .....	70
4.2.3 Aktivator-Komponente: <i>cwEn/Spm</i> .....	71
4.2.4 autonomes Element: <i>En/Spm</i> .....	71
4.3 Basta-Test für Pflanzen mit Insertion von <i>cwEn</i> und autonomen <i>En</i> .....	74
4.4 PCR-Footprint-Analyse .....	77
<b>DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
<b>1. ETABLIERUNG DER TRANSFORMATIONS-METHODE .....</b>	<b>79</b>
1.1. Voraussetzungen und Gegebenheiten für Gewebekultur und Transformation .....	79

---

1.2 Agrotransfer versus <i>particle bombardment</i> .....	81
1.3 T-DNA-Transfer und Konsequenzen für die Klonierung der Konstrukte.....	82
1.4 Klonierung der Konstrukte für das super-binäre Hybrid-Vektorsystem .....	84
1.5 Ermittlung einer effizienten Transformations-Methode .....	85
1.5.1 Verwundung der Embryonen durch Partikelbeschuß.....	85
1.5.2 Vakuum-Infiltration und Verwundung der Embryonen.....	86
1.6 Nachweis von <i>Agrobacterium</i> über Färbereaktion.....	87
1.7. Analyse der Pflanzen mit Konstrukten für <i>cwEn</i> und <i>En</i> .....	88
<b>LITERATUR .....</b>	<b>89</b>

## Abkürzungen

"	Zoll
$\Omega$	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
BAP	6-Benzylaminopurin
bar	Phosphinotricin-Acetyltransferase-Gen; vermittelt Resistenz gegen L-Phosphinotricin
BASTA	Formuliertes Herbizid mit dem Wirkstoff Phosphinotricin, eingetragenes Warenzeichen der Firma Hoechst
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CIP	Calf Intestine Phosphatase
cm	Centimeter
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F	Farad
Fa.	Firma
$F_x$	Filialgeneration
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde
<i>H. vulgare</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
$\text{H}_2\text{O}_{\text{ultrapur}}$	Wasser aus Filteranlage
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde

---

MS	Murashige-Skoog-Salze
nm	Nanometer
o.n.	Over night (Über Nacht)
OD	Optische Dichte
p	Piko
p.a.	Pro analysis
Psi	Pounds per square inch
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
T-DNA	Transferierte DNA
T <sub>x</sub>	Transformierte Generation bzw. Transformierte Filialgeneration
ÜN	Über Nacht bzw. Übernachtkultur
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VE-H <sub>2</sub> O	Vollentionisiertes Wasser
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
x	mal
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronic acid

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein auf *Agrobacterium tumefaciens* basierendes Transformationssystem etabliert, mit dem vier verschiedene Konstrukte für ein Transposon-Tagging-System in Gerste transformiert werden konnten.

Zur Etablierung der Transformation wurden der Vektor pDM805 und ein *Agrobacterien*-Stamm verwendet, mit dem bereits die Transformation von Gerste gelungen war (Tingay et al., 1996). Dieser Vektor enthält ein Herbizid-Resistenzgen (*bar*, verleiht Resistenz gegen das Herbizid BASTA) und das Glucuronidase-Reportergen. Transgene Callus-Linien und Pflanzen wurden mit einer Transformationsfrequenz von 0,7 – 3,3% erhalten und molekular durch Southern-Blot charakterisiert.

Zur Übertragung der Konstrukte für das Zwei-Komponenten-Tagging-System wurde ein "super-binäres" Hybrid-Vektorsystem und ein *Agrobacterien*-Stamm genutzt, mit der sehr erfolgreich die Transformation verschiedener Reis-Kultivare gelungen war (Hiei et al., 1997). Es wurden vier verschiedene Konstrukte hergestellt, die je eine der auf dem Mais-Transposon-System *En/Spm* basierende Komponenten für ein Zwei-Komponenten-Tagging-System, bzw. das autonome *En/Spm*-Element enthielten. Ein Konstrukt trug ein sogenanntes *dSpm*-Element, dem die Transposasen TNPA und TNPD fehlen (aktivierbare Komponente). Ein weiteres Konstrukt enthielt die als *cwEn* ("clipped wing") bezeichnete Aktivator-Komponente, welche die *En*-Transposasen exprimiert, der aber die terminal inverted repeats (TIR) fehlen, so daß es nicht selbst transponieren kann. Auf der Basis von Bialaphos-Resistenz konnten insgesamt 33 unabhängige Pflanzen-Linien regeneriert werden, die durch PCR auf Vorhandensein der Komponenten untersucht wurden. Transposition des autonomen *En*-Elementes in Gerste konnte durch eine Footprint-PCR-Analyse nicht nachgewiesen werden.

---

## Einleitung

### 1. Systematik und Herkunft der Gerste

Die systematisch zu den echten Gräsern (*Poaceae* oder *Gramineae*, eine Familie der Monocotyledonae) gehörende Saatgerste (*Hordeum vulgare* L.) stammt aus dem vorderasiatischen Raum und leitet sich von der Wildform *Hordeum spontaneum* KOCH ab. Unter allen Getreidearten scheint die Gerste am frühesten in Kultur genommen worden zu sein: sie wurde bereits von den Sumerern um 5000 v. Chr. angebaut. Sie verbreitete sich unter starker Formenaufspaltung und Einkreuzen mindestens einer weiteren Wildart – *Hordeum agriocrithon* ÅBERG – im nahen Osten und Mitteleuropa, aber auch im Fernen Osten. Heute wird sie vor allem in den gemäßigten Breiten rund um die Welt angebaut und gedeiht sowohl in den Subtropen als auch in Hochländern der Tropen, z. B. in den Anden. Alle Kulturgerstensorten sind diploid mit einem Chromosomensatz von  $2n = 14$  (Franke, 1996). Sie besitzen sieben cytologisch unterscheidbare Chromosomen mit ca.  $5,5 \times 10^9$  bp (Bennett und Smith, 1976).

Man unterscheidet zwischen einjährigen (Sommergerste) und einjährig überwinterten (Wintergerste) Formen, wobei zwar die Wintergerste einen höheren Ertrag erzielt, allerdings mehr Wärme und Wasser benötigt und länger bis zur Reife braucht. Weiterhin unterteilt man zweizeilige Formen mit größeren Körnern und mehrzeilige Formen mit sechs Zeilen, die meist kleinere Körner besitzen. Beiden Formenreihen liegt allerdings ein gemeinsamer Bauplan zu Grunde: an der Ährenachse stehen die Ährchen alternierend auf zwei Seiten. Je Spindelabsatz finden sich drei einblütige Ährchen, jedes mit zwei schmalen, zugespitzten Hüllspelzen. Bei den zweizeiligen Gersten sind nur die Mittelblüten fertil, bei den mehrzeiligen auch die beiden äußeren Blüten. Die Deckspelzen der Blüten tragen in der Regel sehr lange Grannen, es sind jedoch auch unbegrante Formen bekannt. Die Frucht entwickelt sich aus dem unterständigen Fruchtknoten – der eine einzige Samenanlage enthält –

und den Spelzen. Fruchtwand und Samenschale sind miteinander verwachsen. Diese Sonderform der Nussfrucht wird als Karyopse bezeichnet (Ehrendorfer, 1991). Mit Ausnahme der Nacktgerste sind die Früchte fest mit Deck- und Vorspelze verwachsen und lösen sich selbst beim Dreschen nicht heraus. Kulturgerste ist selbstfertil und kleistogam, d.h. die zwittrigen Blüten öffnen sich zur Bestäubung nicht, sondern bestäuben sich vor der Entfaltung selbst (Franke, 1996).

## **2. Wirtschaftliche Bedeutung und Verwendung der Gerste**

Gerste ist nach Weizen, Mais und Reis das wichtigste Getreide mit einer Weltproduktion von mehr als 141 Mio. Tonnen im Jahr 2001 (FAO, FAOSTAT Database).

Die Nutzung der Gerste gliedert sich in drei Bereiche. In vielen Ländern dient sie als Brotgetreide und liefert Graupen (entspelzte, polierte Körner) und Grütze (zerkleinerte Graupen). In Mitteleuropa ist die zweite Verwendungsform als Viehfutter vor allem in der Geflügel- und Schweinemast von größerer Bedeutung. Für diese beiden Bereiche werden vor allem die eiweißreicheren mehrzeiligen Formen angebaut. Der dritte Verwendungsbereich ist die Brauerei, für die stärkereiche, eiweißärmere Formen, sog. Braugersten, bevorzugt werden. Rund 10 % der globalen Gerstenernte werden für die Herstellung von Gerstenmalz für die Brauerei genutzt. Außerdem wird Gerste zur Herstellung von Kornbranntwein, insbesondere Whisky gebraucht (Franke, 1996).

Für Züchter ist vor allem der Ertrag der Pflanzen, die Qualität der Früchte (z.B. jeweilige Anteile von Amylose bzw. Amylopektin am Gesamtstärkegehalt, Protein – und Fettgehalt), aber auch Streßresistenz (Trockenheit, Salzgehalt des Bodens), Krankheitsresistenz (gegen Viren und Pilze) und Schädlingsresistenz (gegen Nematoden) von Bedeutung. Da über konventionelle züchterische Methoden eine neue Sorte nur unter großem Zeitaufwand erzeugt werden kann, wäre eine direkte Übertragung erwünschter Eigenschaften mit Hilfe der Gentechnik erstrebenswert. Zudem können auf diese Weise Kreuzungsbarrieren zwischen verschiedenen

---

Gattungen und Arten überwunden werden, so daß erwünschte Eigenschaften artfremder Organismen übernommen werden können.

### 3. Gewebekultur und Transformation

Um eine gentechnisch veränderte Getreidepflanze zu erzeugen, muß DNA in eine Einzelzelle innerhalb eines komplexen Explantates (z.B. ein unreifen Embryo, Gewebe der Blattbasis, Gewebe eines Sämlings), eines Zellaggregates (Zellsuspensions-Kulturen, vielzellige Strukturen, die aus Mikrosporen – unreifen Pollenkörnern – gewonnen werden können) oder in isolierte Protoplasten (zellwandlose Einzelzellen) eingebracht werden. Komplexe Explantate und Zellaggregate eignen sich ideal für eine Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder Partikelbeschuß, wohingegen Protoplasten besser für eine Transformation mittels Polyethylenglycol bzw. Elektroporation oder Mikroinjektion geeignet sind. Im Gegensatz zu dicotylen Pflanzen, die sehr einfach durch eine Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* transformierbar sind, gehören Monocotyle – und damit die Getreide – nicht zum natürlichen Wirtsspektrum von *Agrobacterium*. Deshalb ging man lange Zeit davon aus, daß diese Methode für die Transformation von Getreide nicht geeignet ist (Potrykus, 1990). Vor einigen Jahren gelang jedoch eine stabile Transformation unreifer Gerstenembryonen über Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* und stabile Integration der Fremd-DNA in das Wirtsgenom (Tingay et al. , 1997). Mittlerweile kann diese Transformationsmethode andere Transformationstechniken in vielen Fällen ersetzen. Generell muß bei der Transformation die DNA von einer Zelle aufgenommen, im Genom der Wirtszelle stabil integriert und exprimiert werden. Dann wird ein Selektionsdruck erzeugt, der Zellen mit einem Markergen – z.B. eine Antibiotika- oder Herbizidresistenz – von untransformierten Zellen unterscheidbar macht. Nur Zellen, welche das Markergen tragen und dieses auch exprimieren, überleben unter diesen Bedingungen.

Während bei vielen Dicotylen ausdifferenzierte somatische Zellen ihre Fähigkeit zur Dedifferenzierung und Reembryonalisierung behalten, sind bei Monocotylen nur wenige somatische Bereiche der Pflanze zur Regeneration befähigt, nämlich

ausschließlich meristematische Gewebe (Lazzeri und Lörz, 1988). Ausdifferenzierte somatische Zellen hingegen verlieren ihre Fähigkeit zur erneuten Zellteilung vollständig. Aus diesem Grund eignen sich bei Getreiden generell nur wenige Explantat-Typen für die Induktion von Callus- bzw. Zellsuspensions-Kulturen, aus denen Regeneration möglich ist. Bei Gerste konnte gezeigt werden, daß Sproßapikalmeristem, Blattbasis, Mesocotyl, Wurzel, reife und unreife Embryonen in unterschiedlichem Ausmaß als Explantate für die Gewebekultur geeignet sind. Unreife Embryonen erwiesen sich dabei als die erfolgreichsten Explantate (Dale und Deambrogio, 1979). Auch Mikrosporen eignen sich für die Induktion einer Callus-Kultur (Jähne et al., 1991).

Die Induktion von embryogenem Callus ist der erste Schritt in der Entwicklung komplexerer Gewebekulturmethoden, wie z.B. Zellsuspensions- und Protoplastenkulturen. Bei Gerste, wie auch bei anderen Getreiden, ist die Regenerationsfähigkeit stark vom Genotyp abhängig. Gut geeignete Genotypen sind z.B. die Wintergestensorte "Igri" und die Sommergerstensorten "Dissa", "Kymppi" und "Golden Promise" (Lührs und Lörz, 1988). Vermutlich sind spezifische Gene für die Regenerationsfähigkeit verantwortlich (Taguchi-Shiobara et al., 1998).

Es wurde versucht, für die Transformation geeignete Systeme zur Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten für die wichtigsten Getreide zu entwickeln. Die ersten transgenen Pflanzen aus Protoplastenkulturen wurden von solchen Getreidearten regeneriert, die ein gutes Regenerationsvermögen zeigen: Reis (Toriyama et al., 1988), Zhang et al., 1988) und Mais (Rhodes et al., 1988). Bei Gerste konnten nur transformierte Callus-Linien erhalten werden (Lazzeri et al., 1991). Weil es bisher nicht möglich war, die Transformation von Protoplasten und die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten zu kombinieren, gelang es erst vor einigen Jahren, diese Technik für die Erzeugung transgener Gerste zu nutzen (Salmenkallio-Martilla et al., 1995, Funatsuki et al., 1995). Beide Gruppen verwenden Konstrukte, die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (*NPTII*) verleihen. Allerdings dauert es sehr lange, diese Systeme zu etablieren und die Regenerationsfähigkeit geht mit der Zeit schnell verloren, was zu abnormen, nicht-fertilen Regeneraten oder Regeneration von Albinos führt. Außerdem muß die Ausbeute an transgenen Pflanzen als relativ niedrig

betrachtet werden ( $10 \times 10^6$  Protoplasten für 12 transgene Pflanzen, die in Erde überführt werden konnten, Funatsuki et al., 1995).

Später wurde eine neue Technik zur Transformation monocotyle Pflanzen, die sogenannte "biolistische" Methode entwickelt (Sanford, 1987), bei der mit Plasmid-DNA beladene Wolfram- oder Goldpartikel (Durchmesser etwa 1  $\mu\text{m}$ ) mit hoher Geschwindigkeit in das intakte Pflanzengewebe eingebracht werden. Neu an dieser Methode war, daß die DNA direkt in komplexe Explantate eingebracht wird. Die Partikeltransformation wurde und wird von verschiedenen Gruppen genutzt, um transgene Gerste zu erzeugen.

Wie bereits erwähnt, steht seit 1997 eine weitere Transformationsmethode zur Verfügung, die sich des natürlichen Gen-Transfers mittels des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* bedient. Zwar gehören monocotyle Pflanzen nicht zum natürlichen Wirtsspektrum von *Agrobacterium*, durch Auswahl geeigneter Stämme und T<sub>1</sub>-Plasmide wurde es jedoch möglich, diese Barriere zu umgehen. Mittels dieser Technik sollte in dieser Arbeit ein Transposon-Tagging-System in Gerste etabliert werden.

#### **4. Transposon Tagging**

Als Transposons bezeichnet man mobile genetische Elemente, die ihre Position in einem Genom verändern können. Man unterscheidet dabei zwei Klassen von Transposons, bei denen die Transposition über einen unterschiedlichen Mechanismus stattfindet. Bei den sogenannten Retrotransposons transponiert eine Kopie des Elements über ein RNA-Intermediat, bei den klassischen Elementen erfolgt die Transposition über Excision und Reintegration direkt über DNA (Gierl und Saedler, 1992).

Diese klassischen Elemente können bei Insertion in funktionsfähige Gene diese inaktivieren und dadurch Mutationen hervorrufen. Häufig sind diese Mutationen instabil: verläßt das Transposon während der Entwicklung eines Organismus seinen

Ort im Genom, kann die Funktion des Gens wiederhergestellt werden und es entsteht ein Mosaik aus mutanten und nicht-mutanten (revertanten) Bereichen (Gierl und Saedler, 1992).

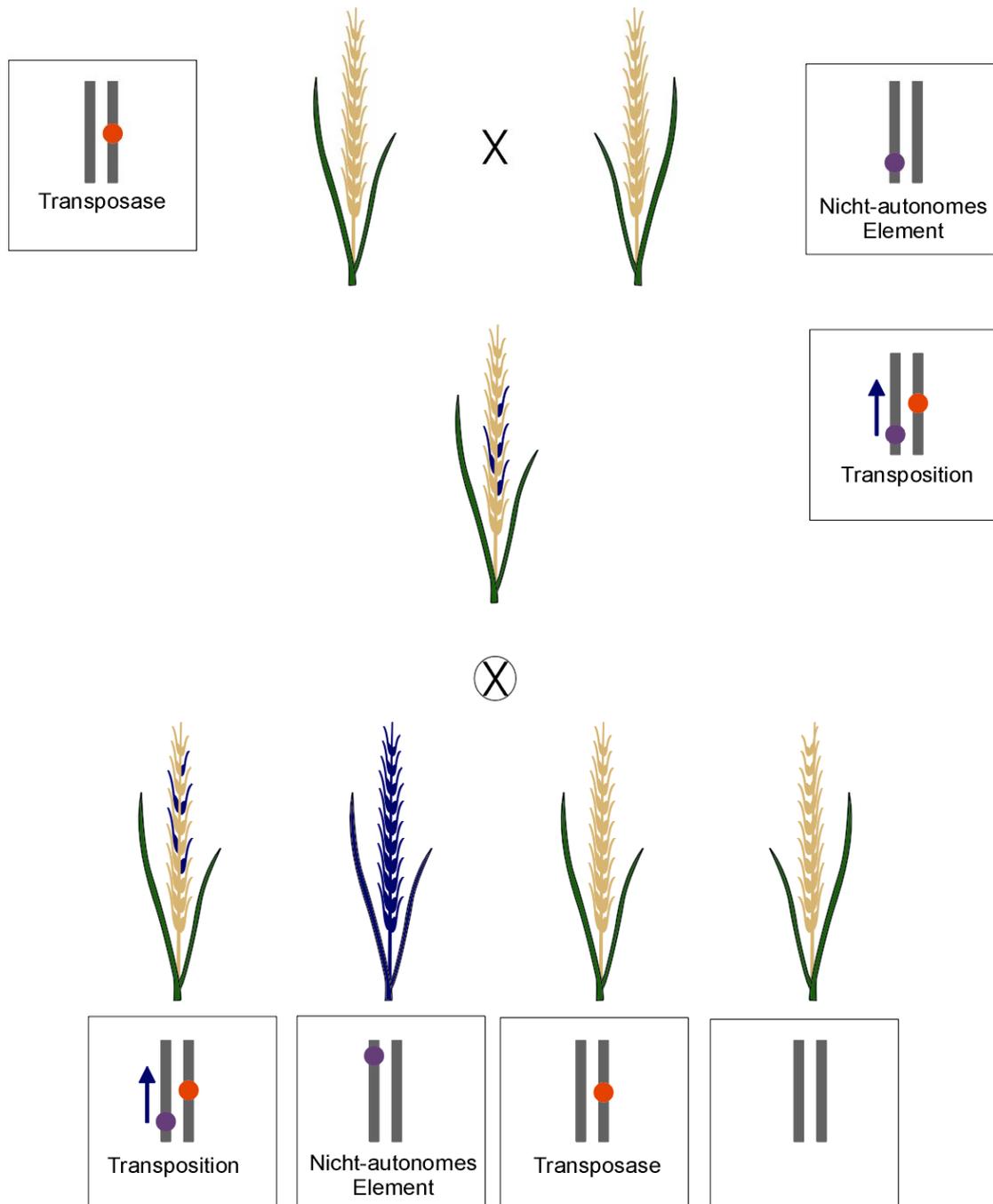
In Mais entdeckte Barbara McClintock zwei Familien klassischer transponierbarer Elemente, die sie als *Ac-Ds* (Activator-Dissociation) und *Spm* (Suppressor-mutator) bezeichnete (McClintock, 1948). 1953 entdeckte Peterson unabhängig davon das Enhancer-Element *En*. Da es sich bei *En* und *Spm* um das selbe Element handelt, wird es als *En/Spm*-Element bezeichnet. Sowohl *Ac-Ds* als auch *En/Spm* sind gut charakterisiert und stellen außerdem Prototypen von Elementfamilien dar, die im gesamten Pflanzenreich gefunden werden (Gierl und Saedler, 1992). Der Transpositionsmechanismus ist bei beiden Elementfamilien ähnlich: für die Transposition sind Proteine – die Transposasen – verantwortlich, die mit den Elementenden (terminale invertierte Sequenzwiederholungen – oder TIR für terminal inverted repeats) interagieren. Im Falle von *Ac-Ds* handelt es sich um eine Transposase (*Ac*-Transposase oder *Tpase*), bei *En/Spm* werden zwei Proteine (TNPA und TNPD) codiert (Gierl et al., 1988, Masson et al., 1989), die für die Transposition nötig sind. Ein Element, das alle für seine Transposition notwendigen Faktoren codiert, wird als autonomes Element bezeichnet. Man kennt aber auch nicht-autonome Elemente (sogenannte "defekte Elemente"), die nur unter bestimmten Umständen transponieren können. Meist sind bei den defekten Elementen Bereiche deletiert, die die Transposasen codieren. Werden die Transposasen von einem anderen Element der gleichen Elementfamilie zur Verfügung gestellt, ist Transposition möglich. Diese Kombination aus autonomen und nicht-autonomen Elementen wird als Zwei-Komponenten-System bezeichnet (Gierl und Saedler, 1992). Ein autonomes Element kann benutzt werden, um ein defektes Element der gleichen Elementfamilie zu aktivieren: es stellt dann dem defekten Element die Transposasen zur Verfügung. Wird ein solches Zwei-Komponenten-System in einen Organismus eingebracht, so kann Transposition in den Folgegenerationen durch Auskreuzen stabilisiert werden, weil dabei die beiden Komponenten getrennt werden. Man hat somit ein wichtiges Werkzeug für die Isolierung und Charakterisierung von Genen zur Hand (Gierl und Saedler, 1992). Wichtig ist dabei die Tatsache, daß Transposon-Insertionen und Transposition nicht auf somatische Zellen beschränkt ist, sondern auch in Keimzellen

auftritt und daher an die Folgegeneration vererbt werden kann (somatische und germinale Transposition).

Insertionsmutagenese mittels Transposons (Transposon Tagging) ist eine weitverbreitete Technik zur Isolierung von Genen, die erfolgreich bei Bakterien, Tieren und Pflanzen eingesetzt wurde (Saedler und Gierl, 1995). Bei Pflanzen wurde Transposon Tagging ursprünglich in Mais und *Antirrhinum majus* angewendet, weil in diesen Spezies aktive transponierbare Elementsysteme – genetisch und molekularbiologisch charakterisiert – vorliegen. Man kann ein solches charakterisiertes Transposon verwenden, um Gene zu isolieren, die durch Insertion des Elements mutiert wurden, wobei nur germinale Transpositionereignisse an die Nachkommen weitergegeben werden, die dann auf den mutanten Phänotyp untersucht werden. Dazu muß über das Genprodukt nichts bekannt sein, es ist nur notwendig, den durch die Insertion verursachten, mutanten Phänotyp zu identifizieren. Das Gen kann isoliert werden, indem man die das Element flankierenden Gen-Sequenzen kloniert (Gierl und Saedler, 1992).

Transposon Tagging mit den Mais-Elementen *Ac* bzw. *En/Spm* in anderen Pflanzenspezies ist nur möglich, wenn die Elemente auch im fremden Genom aktiv transponieren und reintegrieren. Es konnte gezeigt werden, daß *Ac* und *En/Spm* in einer Reihe von Pflanzenarten aktiv transponieren: *Ac* in Tomate (Jones et al., 1993) und Reis (Izawa et al., 1997), *En/Spm* in Tabak (Cardon et al., 1993a), *Arabidopsis thaliana* (Cardon et al., 1993b) und Kartoffel (Frey et al., 1989).

In unserer Arbeitsgruppe wurde versucht, ein auf *En/Spm*-Elementen basierendes Transposon-Tagging-System in Gerste zu etablieren, da diese Methode sich vor allem für Pflanzen wie Gerste mit relativ grossem Genom eignet, weil die Genomgröße die Leistungsfähigkeit der Methode nicht beeinflußt. Zu diesem Zweck sollte ein Zwei-Komponenten-System in Gerste eingeführt werdenm dessen Basis schematisch in Abbildung. 1 dargestellt ist:



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Zwei-Komponenten-Transposon-Tagging-Systems in Gerste

Ein Element ist dabei nicht in der Lage, die notwendigen Transposasen (TNPA und TNPD) zu bilden, die terminal inverted repeats sind jedoch vorhanden. Es wird daher als defektes Element (*dSpm*-Element) bezeichnet. Werden die Transposasen von einem zweiten Element zur Verfügung gestellt, ist Transposition möglich. Die Transposasen stammen von einem Element, dessen Enden so weit deletiert sind, daß es selbst ebenfalls nicht transponieren kann. Aufgrund der deletierten Enden wird es als "clipped wing"-Element (*cwEn*) bezeichnet. Jedes der beiden Elemente befindet sich in je einer Pflanze der  $T_1$ -Generation, die direkte Nachkommen der Primärtransformanten ( $T_0$ ) sind. Primärtransformanten können nicht verwendet werden, da sie zu verschiedenen Zeitpunkten regeneriert wurden und daher unterschiedlich alt sind. Die  $T_1$ -Pflanzen werden gekreuzt, um eine  $T_2$ -Generation zu erhalten, in der beide Komponenten des Zwei-Komponenten-Systems zusammenkommen. Durch die von *cwEn* produzierten Transposasen wird das *dSpm*-Element aktiviert und es kann zur Transposition kommen. In einer weiteren Folgegeneration ( $T_3$ ) können Transposoninsertionen im Genom durch Auskreuzen stabilisiert werden, da die Komponenten dabei wieder getrennt werden.

Ein *dSpm*-Element-Konstrukt wurde so hergestellt, daß sich das Element zwischen dem CaMV35S-Promotor und dem *gus*-Gen befindet. Da nach Transposition Promotor und Gen nicht länger getrennt sind und das Gen nach Excision des Transposons aktiv wird, bezeichnet man ein solches Konstrukt als Excisions-Reporter (Cardon et al., 1993a, Cardon et al., 1993b).

## 5. Ziel der Arbeit

Seit längerem wurde in der Arbeitsgruppe versucht, ein auf *En/Spm* basierendes Zwei-Komponenten-Tagging-System in Gerste zu etablieren. Bisher kam als Methode der Wahl nur der Partikelbeschuß in Frage. Die benötigten Konstrukte wurden dabei so hergestellt, daß ein Plasmid eine Tagging-Komponente trug, das Marker-Gen (hier: *bar*, das Resistenz gegen das Herbizid BASTA<sup>®</sup> verleiht) sich aber auf einem zweiten

Plasmid befand. Um transgene Pflanzen zu erzeugen, werden beide Plasmide zusammen auf Gold-Kügelchen präzipitiert und in das Zielgewebe eingebracht. Diese sog. Co-Transformation wurde ausgeführt, weil sie in der Auswahl der Promotoren für die Selektionsmarker mehr Freiheit lässt und unterschiedliche Promotoren für die Expression der Selektionsmarker auf ihre Eignung für die Selektion transgener Pflanzen getestet werden können. Ein gewisser Nachteil der Co-Transformation besteht allerdings darin, daß es möglich ist, Pflanzen zu regenerieren, die zwar den Selektionsmarker, nicht aber das Transposon enthalten, da auf Vorhandensein des Transposons nicht selektioniert werden kann. Die größte Schwierigkeit in der Etablierung des Systems bestand allerdings darin, daß die recht großen Plasmide oft fragmentierten und es nicht zu einem vollständigen Einbau der Transposon-Konstrukte kam, die aus diesem Grund dann auch nicht funktionsfähig waren. Um dieses Problem zu umgehen, war es das Ziel dieser Arbeit, ein auf *Agrobacterium tumefaciens* basierendes System zur Transformation von *En/Spm* zu etablieren. Dazu sollten die bereits beschriebenen *cw/En-*, *dSpm-* und Excisionsreporter-Konstrukte zusammen mit dem *bar*-Gen als Selektionsmarker in geeignete Vektoren eingebracht werden. Zudem sollte ein Konstrukt hergestellt werden, welches das autonome *En/Spm*-Element enthält, um untersuchen zu können, ob *En/Spm* in Gerste überhaupt transponiert. Da sich in diesem Fall das Ziel-Gen und das Marker-Gen auf der selben T-DNA befinden würden, sollten falsch-positive Pflanzen, die nur das Marker-Gen, nicht aber das Transposon enthalten, ausgeschlossen werden können.

Der Vorteil des *Agrobacterien*-Systems besteht darin, daß große Fragmente vollständig übertragen werden können. Durch die Entwicklung der sogenannten "super-binären" Hybrid-Vektorsysteme durch Hiei *et al.* (1994) wurde eine leichtere Handhabung der relativ großen Vektoren möglich. Die Konstrukte werden im Teil "Material und Methoden" genauer vorgestellt. Nach der Etablierung des eigentlichen Transformations-Systems mit dem binären Vektor pDM 805 (Tingay *et al.* 1997) sollten alle notwendigen Konstrukte in den super-binären Hybrid-Vektor pSB1 kloniert und mit dem *Agrobacterien*-Stamm LBA4404 in Gerste übertragen werden.

---

## Material und Methoden

### 1. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biomol (Hamburg)  
Bio-Rad (USA)  
Difco (USA)  
Fluka (Schweiz)  
Merck (Darmstadt, BRD)  
Roth (Karlsruhe, BRD)  
Serva (Heidelberg, BRD)  
Sigma-Aldrich (Deisenhofen, BRD)

Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden bezogen von:

Boehringer Mannheim  
Gibco BRL (USA)  
New England Biolabs (USA)  
Serva (Heidelberg, BRD)  
Stratagene (USA)

Radioaktiv markierte Nucleotide ( $^{32}\text{P}$   $\alpha$ -dCTP, 3000i/mol), sowie Hybond-N-Nylonmembran stammten von Amersham-Buchler (Braunschweig, BRD)

Die zur Sequenzierung und für PCR eingesetzten Oligonukleotide wurden von Sigma ARK im Auftrag synthetisiert.

## 2. Pflanzenanzucht und -transformation

### 2.1 Geräte und Materialien

Für die Pflanzenanzucht notwendigen Mediengrundstoffe, Vitamine und Hormone, sowie Antibiotika wurden von Boehringer Mannheim (BRD), Duchefa (Holland), Serva (Heidelberg, BRD) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Erde stammte von Firma Patzer (Sinntal-Jüssen), Agriperl Pflanzenperlite von Perlite Dämmstoff GmbH (Stuttgart) und "Dünger Wuxal Super plant food" von Aglucon GmbH (Düsseldorf, BRD). Transgene Pflanzen aus der Gewebekultur wurden in "Magenta"-Boxen GA7 der Firma Magenta Corp. (USA) bewurzelt.

Die "Particle Gun" PDS-1000/He Biolistic<sup>®</sup> Particle Delivery System der Firma Bio-Rad wurde verwendet, um Embryonen vor der Co-Inkubation mit *Agrobacterium tumefaciens* zu verwunden.

Die Co-Kultivation von Gerstenembryonen mit *Agrobacterium tumefaciens*, sowie alle weiteren Kulturschritte vom Callus bis zur bewurzelten Pflanze wurden in Gewebekulturschränken der Firma Ehret vom Typ KBK/LS 4330 durchgeführt. Alle in Erde überführten Pflanzen wurden in Pflanzenkammern vom Typ HPS 2000 von Heraeus-Voetsch kultiviert. Für die Gewebekultur benötigte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Basta	Hoechst
Bialaphos	Meiji Seika Kaisha Ltd, Japan
BAP	Sigma Chemical Corp., USA
2,4-D	Sigma Chemical Corp., USA

## 2.2 Sonstige Geräte

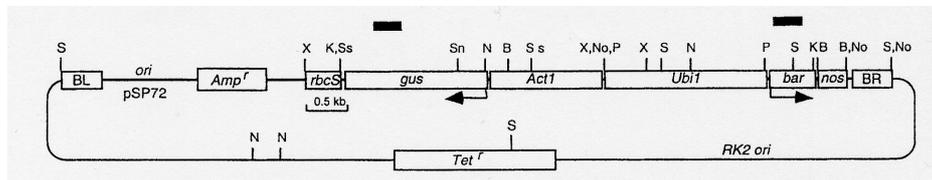
Zur Quantifizierung von DNA mit Hilfe von Bisbenzimid (Hoechst Dye 33258) wurde das Fluorimeter DyNAQuant 200 (Fa. Hoefer Pharmacia BioProducts, USA) verwendet. Die Anregungswellenlänge beträgt dabei 365 nm, die Emissionswellenlänge 460 nm.

*E.coli* und *Agrobacterium tumefaciens* wurden mit Hilfe des "Gene Pulser"-Elektroporators von Bio-Rad (USA) transformiert.

## 3. Plasmide

pRK2013 (Figurski *et al.*, 1979)

pDM 805 (Tingay *et al.*, 1997)



Durch die Lage des Selektions-Markers an der Rechten Grenze der T-DNA kann es vorkommen, daß selektierte Pflanzen zwar für *bar*, nicht aber für *gus* transgen sind. Der Transfer der T-DNA beginnt mit einem Einzelstrangsnitt an der Rechten Grenze, gefolgt von Neusynthese der DNA, wodurch der Einzelstrang verdrängt wird. An der Linken Grenze wird dieser Vorgang terminiert. Kommt es vorher zu einem Strangbruch, wird ein unvollständiges Konstrukt übertragen.

#### 4. Konstrukte für die Etablierung des Zwei-Komponenten-Systems:

pSB111 *dSpm/En-bar*

pSB111 *cw/En-bar*

pSB111 *35S6078gus-bar*

pSB111 *En/Spm-bar*

##### Konstrukt für Binäres System: pDM805 (Tingay et al., 1996)



*Act1*: Promotor, erstes Exon und Intron des Actin-Genes aus Reis

*gus*: Codierende Region des  $\beta$ -Glucuronidase-Genes aus *E. coli*

*rbcS*: 3' Terminator-Region aus dem Rubisco-Gen aus Reis

*Ubi1*: Promotor, erstes Exon und erstes Intron des Ubiquitin1-Genes aus Mais

*bar*: Codierende Region des Phosphinothricin-Acetyltransferase-Genes aus *Streptomyces hygroscopicus*

*nos*: 3' Terminator-Region aus dem Nopalinsynthase-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*

BR: Rechte Grenze der T-DNA (Right Border Sequence)

LB: Linke Grenze der T-DNA (Left Border Sequence)

##### Konstrukte für das Super-Binäre System zur Etablierung des Zwei-Komponenten-Tagging-Systemes

Alle Konstrukte wurden für die Verwendung im Vektor pSB111 hergestellt (Komari, 1990)

##### 1. aktivierbare Komponente: nicht-autonomes Element *dSpm/En* I6078

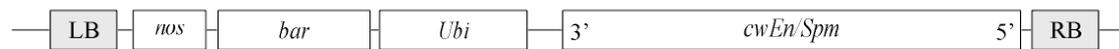
a) Konstrukt "Nr. 116 Ubi zu *dSpm*"



b) Konstrukt "Nr 117 ter zu *dSpm*"



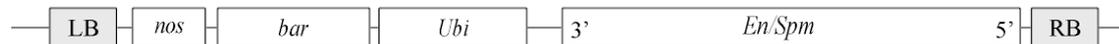
Beide Konstrukte wurden zur Transformation verwendet

2. Aktivator-Komponente *cwEn/Spm*3. Autonome Komponente *En/Spm*

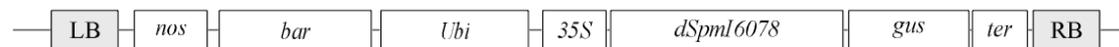
a) En 3' zu RB



b) En 5' zu RB



## 4. Excisions-Reporter



Alle für das Zweikomponenten-System benötigten Konstrukte wurden so hergestellt, daß sich der Selektionsmarker (hier: *bar*) an der Linken Grenze der T-DNA befand.

## 5. Verwendete Bakterienstämme und Anzucht

*E. coli*: MC 1061 (Casadaban and Cohen, 1980)  
 HB 101 (Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)  
 DH5 $\alpha$  (Hanahan 1983)  
 XL1 Blue (Bullock *et al.*, 1987)  
 Easypore (Eurogentec)  
 Sure (Eurogentec)

*Agrobacterium tumefaciens*:

AGL1 (Lazo *et al.* 1991)  
 LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1983)  
 EHA101 (Hood *et al.*, 1986)  
 EHA105 (Hood *et al.*, 1993)

*E. coli* wurde stets in dYT-Medium mit entsprechender Selektion über Nacht bei 37° C angezogen, *Agrobacterium tumefaciens* – abhängig vom Stamm – in YEB bzw. AB-Medium (LBA4404) für 2 Tage bei 28° C ebenfalls mit entsprechender Selektion.

Eine Übersicht über verwendete *Agrobacterien*-Stämme und die jeweiligen Selektionsantibiotika ist in Tabelle 1 angegeben:

Stamm	Chromosomale Resistenz	Resistenz auf dem Helfer-Plasmid	Resistenz auf dem Konstrukt
EHA 101	Chloramphenicol 25 mg/l	Kanamycin 50 mg/l	Spectinomycin 50 mg/l
LBA4404	Rifampicin 100 mg/l	-	Spectinomycin 50 mg/l
AGL1(pDM805)	Rifampicin 20 mg/l	-	Tetracyclin 5 mg/l

**Tabelle 1:** *Agrobacterium*-Stämme und Selektionsantibiotika

## 6. Molekularbiologische Methoden

### 6.1 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation

#### 6.1.1 *E. coli*:

1 l Medium mit 1 ml Übernachtskultur beimpfen, Zellen wachsen lassen, bis OD<sub>600</sub> 0,6 erreicht ist. Alle Geräte und Lösungen vorkühlen. Die Bakterien für 30 Minuten auf Eis stellen, anschliessend 15 Minuten bei 0°C, 4 000 g abzentrifugieren und das Medium vollständig abnehmen. Schrittweise in 1l, 0,5 l, 20 ml und 2 – 3 ml 10% Glycerin (eiskalt) resuspendieren. Aliquots von 40 µl in Reaktionsgefäße überführen und in flüssigem Stickstoff einfrieren. Diese können bei – 70°C aufbewahrt werden.

Die Elektroporation erfolgte in sterilen 0,2 cm-Küvetten mit einem Gene Transfection Pulser (Biorad) bei 2,5 kV Spannung, 200 Ω Widerstand und einer Kapazität von 25 µF. Selektiert wurden die transformierten Bakterien auf dYT-Medium mit den entsprechenden Selektionsantibiotika. Zur Transformation wurden 100 ng Plasmid-DNA bzw. 20 µl Ligations-Ansatz verwendet.

#### 6.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*:

Elektrokompente *Agrobacterien* wurden nach der Methode von Walkerpeach und Velten (1994) hergestellt und mit 100 ng Plasmid transformiert. Die Elektroporation erfolgte in sterilen 0,2 cm-Küvetten mit einem Gene Transfection Pulser (Biorad) bei 2,5 kV Spannung, 400 Ω Widerstand und einer Kapazität von 25 µF. Selektiert wurden die transformierten Bakterien auf YEB- bzw. AB-Medium (LBA4404) mit den entsprechenden Selektionsantibiotika.

## 6.2 Transformation von *Agrobacterium* über Tri-parental mating

Alternativ wurden Plasmide über Tri-parental mating (Ditta *et al.*, 1980) in *Agrobacterium* eingebracht. Dafür wurden die entsprechenden *Agrobacterium* und *E.coli*-Stämme und der Überträgerstamm mit dem Plasmid pRK2013 ((Figursky *et al.* 1979, Knauf and Nester, 1982) über Nacht ohne Selektion angezogen, in einem Reagenzglas 1:1 vermischt und über Nacht bei 28°C in einem Roller inkubiert. Je 100 – 200 µl konnten am folgenden Tag auf AB-Medium mit geeigneter Selektion ausplattiert werden. Auf diesem Minimalmedium überlebte nur *Agrobacterium tumefaciens*, nicht jedoch *E.coli*. Nicht-transformierte *Agrobacterien* wiederum wurden durch das zugegebene Antibiotikum am Wachstum gehindert.

Nach 2 – 5 Tagen Inkubation bei 37°C wurden einzelne Kolonien sichtbar, die nun gepickt und auf neuen Platten erneut zu Einzelkolonien ausgestrichen werden konnten (Inkubation 2 Tage bei 28°C). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und nur gleichmäßig schnell wachsende Kolonien weiter untersucht. Um korrekte Insertion des Plasmides festzustellen, wurden Plasmid-Minipräparation und Restriktionsanalyse durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass es sich um *Agrobacterium tumefaciens* handelte, wurden die Zellen zum einen mikroskopisch untersucht, zum anderen auf Lactose-haltigem Medium ausgestrichen, über Nacht inkubiert und am folgenden Tag mit Benedicts-Reagenz überschichtet. Deutliche Gelbfärbung des Mediums um die Kolonien entsteht, indem Lactose zu 3-Ketolactose umgewandelt wird. Diese Farbreaktion ist spezifisch für *Agrobacterium tumefaciens* (Bernaerts and DeLey, 1963).

Zur Transformation von Embryonen wurden stets mehrere Einzelkolonien vereinigt.

## 6.3 Präparation von DNA

### 6.3.1 *E.coli*:

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach Übernacht-Kultur in dYT-Medium mit der jeweils dem Stamm und dem darin enthaltenen Plasmid entsprechenden Antibiotika-Selektion. Die DNA wurde daraufhin aus 2 ml Kultur mittels Boiling Lysis (Sambrook et al. 1989) isoliert. Präparationen im Midi-Massstab erfolgten über Säulen der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers, bzw. über alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979).

### 6.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*:

Die Bakterien wurden je nach Stamm in YEB- bzw. AB-Medium (LBA4404) für 2 Tage bei 28° C angezogen.

Die Präparation genomischer DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte nach der Methode von Golds *et al.* (1990). Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Ebert und An isoliert:

Eine Einzelkolonie wird in 50 ml Medium und entsprechender Selektion 2 d bei 28°C angezogen. Insgesamt 3 – 5 ml der Suspension (je nach Zell-Dichte) abzentrifugieren (3 min, 14 000 rpm), Überstand verwerfen und das Pellet in 100µl eiskaltem Lysis-Puffer (50mM Glucose, 25 mM Tris-Cl, pH 5,8, 10 mM EDTA, 4 mg/l Lysozym frisch) resuspendiert. 10 sec vortexen und 30 Minuten bei RT inkubieren. Erneut vortexen, 200 µl 0,2 M NaOH, 1,0 % SDS zugeben, 10 – 30 Minuten bei RT inkubieren. 150 µl eiskaltes NaOAc, pH 4,8 zugeben. Schütteln, 5 Minuten auf Eis inkubieren, 5 Minuten zentrifugieren (14 000 rpm). Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen und mit gleicher Menge Phenol/Chloroform ausschütteln. Ausfällen der DNA durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol (-20°C), 5 Minuten bei

RT, 14 000 rpm zentrifugieren. Waschen in 1 ml 70 % Ethanol (-20°C), 3 Minuten zentrifugieren. Ethanol vollständig abnehmen und Pellet trocknen. In 50 µl TE aufnehmen.

### 6.3.3 Pflanzen:

Genomische DNA aus Gerste-Blättern wurde mit der Methode von Dellaporta *et al.* (1983) isoliert. Als Ausgangsmaterial dienten dabei 3 – 5 ausgewachsene Blätter (entsprechend etwa 2 - 5g). Vor dem letzten Fällungsschritt wurde die DNA einer RNase-Behandlung (20 µg/Probe, Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten) und einer anschließenden Phenol-Extraktion unterzogen. Stand aufgrund des Alters der Pflanzen nur sehr wenig Blatt-Material (100 mg) zur Verfügung, wurde das DNeasy Plant Mini/Maxi-Kit der Firma Qiagen verwendet.

### 6.4 Southern Blot-Hybridisierung

10 µg genomischer DNA aus Gerstebblättern wurden mindestens 3 h bis über Nacht mit dem entsprechenden Restriktionsenzym inkubiert, ausgefällt und die Fragmente auf 1 % Agarose-Gelen in TAE-Puffer bei 30 V über Nacht (mindestens 16 h) aufgetrennt. Der Southern-Blot und die Hybridisierung wurden nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Nylon-Membran durchgeführt.

Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde erfolgte unter stringenten Bedingungen in einer Lösung aus 3x SSPE, 0.1 % SDS, 100 µg/ml fragmentierter Heringsperma-DNA, 0.02 % w/v Ficoll/Polyvinylpyrrolidon bei 65 °C. Die Inkubation mit der radioaktiven Sonde erfolgte über Nacht. Im Anschluss wurden die Blots bei 65 °C gewaschen: bis zu 5 Minuten mit 2x SSPE/0.1 % SDS, 15 Minuten mit 1x SSPE/0.1x SDS, 5 Minuten mit 0.1xSSPE/0.1% SDS.

Sollte die Membran erneut mit einer zweiten Sonde hybridisiert werden, wurde die zuvor verwendete radioaktive Sonde auf folgende Weise entfernt: die Membran wurde auf ein mit 0,4 M NaOH getränktes Whatman-Filterpapier in einer Glasschale gelegt und 30 Minuten bei 45° C inkubiert. Im Anschluss daran wurde für weitere 15 Minuten ebenfalls bei 45° C in 0.1 % SSPE, 0.1 % SDS und 0.2 M Tris/HCl unter Schütteln neutralisiert.

Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente (50 – 100 ng) erfolgte nach der "random primed" Methode von Feinberg und Vogelstein (1983). Pro Reaktion wurden 50 µCi <sup>32</sup>P α-dCTP eingesetzt. Nicht eingebaute Nucleotide wurden per Hochsalzfällung mit Ammoniumsulfat entfernt.

Die in Tabelle 2 angegebenen DNA-Fragmente wurden zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden verwendet:

<b>Sonde</b>	<b>Bindungsstelle</b>	<b>Herstellung</b>
bar	<i>bar</i>	<i>SalI</i> – <i>SalI</i> -Fragment aus <i>bar</i>
gus	<i>gus</i>	PCR-Fragment aus <i>gus</i>
dSpm	<i>dSpm</i>	<i>EcoRV</i> - <i>XbaI</i> -Fragment aus <i>dSpm</i>

**Tabelle 2:** radioaktiv markierte Sonden für Southern-Blot

## 6.5 PCR

Alle Reaktionen wurden im MultiCycler PTC 225 Tetrad der Firma Biozym mit Taq-Polymerase der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl mit 10 – 100 ng Plasmid-DNA, bzw. 100 – 1000 ng genomischer Gersten-DNA als Matrize. Ausserdem enthielten die Reaktionsansätze: 0.4 µM beider Primer, 250 µM je dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1x BSA, 1 x Reaktionspuffer und 1 u Taq-Polymerase.

Amplifikation erfolgte nach folgenden Protokollen:

**GUS:** 1 min 94°C Denaturierung, 30 sec Annealing, 55°C, 90 sec Extension 72°C, 30 Zyklen. Auffüllen nicht vollständig amplifizierter Fragmente 5 min, 72°C, Endtemperatur: 20°C für 5 min.

**BAR:** 1 min 94°C Denaturierung, 30 sec Annealing, 64°C, 90 sec Extension 72°C, 40 Zyklen. Auffüllen nicht vollständig amplifizierter Fragmente 5 min, 72°C, Endtemperatur: 20°C für 5 min.

**FOOT:** Vollständiges Aufschmelzen der DNA: 94°C 5 min, 1 min 94°C Denaturierung, 30 sec Annealing, 51°C, 90 sec Extension 72°C, 40 Zyklen. Auffüllen nicht vollständig amplifizierter Fragmente 5 min, 72°C, Endtemperatur: 20°C für 5 min.

Nach der Amplifikation wurden 10 – 20 µl des Ansatzes auf ein 2 % Agarose-Gel aufgetragen und aufgetrennt.

---

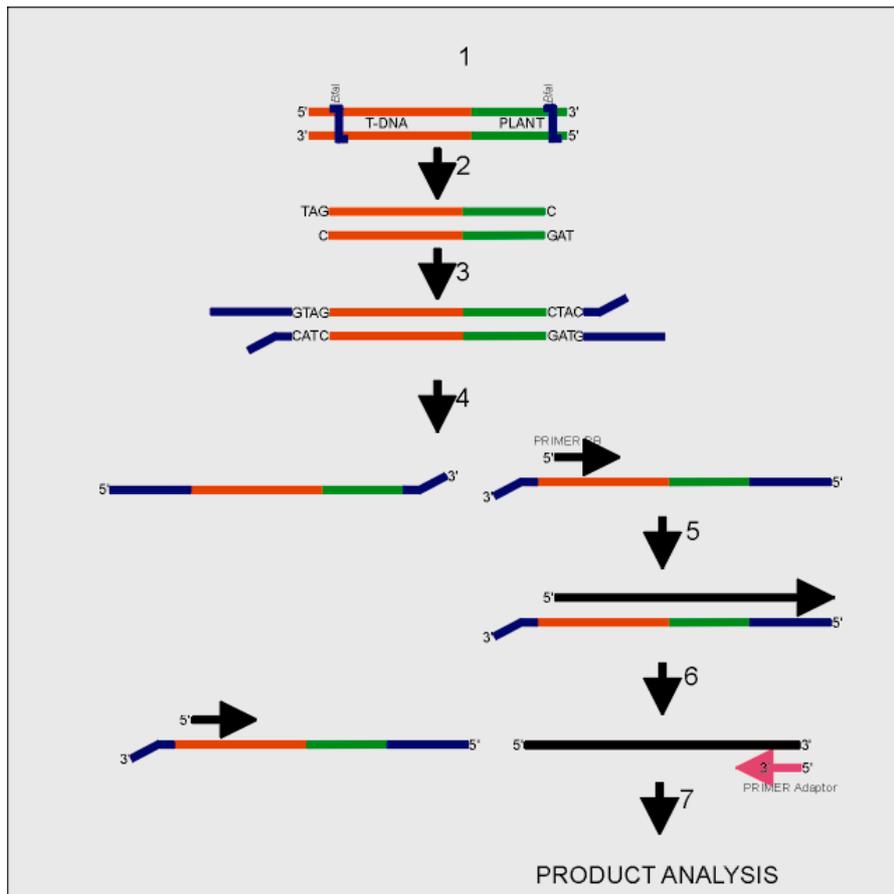
## 6.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die zu sequenzierenden Plasmide wurden entweder über Säulen der Firma Qiagen laut Angaben des Herstellers aus *E.coli* präpariert oder bei Verwendung anderer Methoden über Säulen der Firma Machery-Nagel (Düren) gereinigt und 10 – 30 ng pro Sequenzreaktion eingesetzt. Für die Sequenzierung wurde die Methode des Cycle-Sequencing verwendet. Das PCR-Protokoll lautet: 26 Zyklen: 95°C, 20 sec, 50°C, 15 sec, 60°C 1 min. Die Reaktionen wurden mit einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA) aufgetrennt und mit Hilfe des Programmes SeqMan (DNA-Star, Lasergene) analysiert.

## 6.7 Analyse der Übergänge zwischen T-DNA und Pflanzen-DNA

Die Methode der *Amplification of Insertion Mutagenised Sites* (AIMS) wurde verändert nach Frey *et al.* (1998) angewendet.

Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht über die einzelnen Schritte der Methode:



**Abbildung 2:** AIMS zur Analyse von T-DNA-Integrationen in transgenen Gerstepflanzen. In Schritt 1 wurde die Pflanzen-DNA mit *BfaI* geschnitten. An die dabei entstandenen 2 bp-Überhänge (Schritte 2) konnte im 3. Schritt Adaptor-DNA ligiert werden. Mit einem T-DNA spezifischen Primer wurde in Schritt 5 eine lineare PCR durchgeführt. Das dabei entstandene Produkt diente als Template einer erneuten PCR-Reaktion, in der T-DNA spezifische Primer und Primer, die für die Adaptor-DNA spezifisch waren, eingesetzt wurden. Das entstandene PCR-Produkt wurde aufgereinigt und sequenziert.

Die für die PCR-Amplifizierungen und Sequenz-Reaktionen verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt, wobei Primer für die Sequenzierung stets durch "Seq" gekennzeichnet sind.

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5' – 3'</b>
Bar to Ubi	GCC TAA TCT CAA CTG GTC TCC TC
Bar x	GGA GAG GAG ACC AGT TGA GAT TAG
Bar y	CTC AGA TCT GGG TAA CTG GCC TAA
cw 3' Ende	GAG TGT GGG GTT TTG GAG ATC TC
cw fwd	CCA GAT CTA CAG AAT AAT CAA GC
cw rev	GGA TGA TTA TAG GGA AGG AG
En 3' to RB	CAC CAG GAT CAG TAC GTT AAG TTG
En 5' to RB	GCA GAA ACA TTT TGC TTA CGC
Foot RB 1	CAC TGA TAG TTT AAA CTG AAG GCG GG
Foot RB 2	CTG AAG GCG GGA AAC GAC AAT C
Foot RB 3	GAC AAG CCG TTT ACG TTT GGA AC
Foot RB 4 near MCS	GTT TGG AAC TGA CAG AAC CG
Foot RB into En	TAA GGG AGT CAC GTT ATG ACC CCC
Foot Ubi	GGT AAT TTT TTA TAA CTT AGA CAT GC
Foot Ubi into En	TTA TCT CTA GAG AGG GGC ACG ACC
Foot vector left	CAT GCA AGC TGG GGG ATC CTC GAG
Foot vector right	GTT TAC CCG CCA ATA TAT CCT GTC A
RB into En	TAA GGG AGT CAC GTT ATG ACC CCC
Rb into En	TAA GGG AGT CAC GTT ATG ACC CCC
RB-En short	TTA AGG GAG TCA CGT TAT GAC
Ubi to En	TTA TCT CTA GAG AGG GGC ACG ACC
Ubi footprint	GAG TCC TGT TGT CAA AAT ACA C
Ubi foot 23	CCC TAA ACC CTA AAT GGA TGT AC
Seq 3' to LB	GAG TGT CGG TTG CTT GTT GAA CC
Seq 5' to RB	GCC GAA ACA AGC GCT CAT GAG C
Seq Bar Ter	GCA TGG TGG ATG GCA TGA TGT TGG
Seq Bar Ubi	GTT AAC GAT ATC ACA AAC CGC GG
Seq cw 5' to RB	CCT TAC CAC GTA CGT TCC TCT AC
Seq nos to En-LB	GAT AAA TTA TCG CGC GCG GTG TC
Seq psb11 to RB	GCT CCG TCG TCA GGC TTT CC
Seq RB-Sequenz	GTT TAC CCG CCA ATA TAT CC
Seq Ubi to 3'En	GTA GAG TAA AGT TTA AAT ATA

**Tabelle 3:** Primer für PCR-Reaktionen und Sequenzierung.

---

## 7. Herstellung transformierter Gerste-Pflanzen

### 7.1 Pflanzenmaterial

#### 7.1.1 Untransformierte Pflanzen (Spenderpflanzen)

Saatgerste *Hordeum vulgare* L. "Golden Promise". Das verwendete Saatgut stammt ursprünglich aus dem Carlsberg Institut, Kopenhagen, desweiteren wurde Saatgut eigener Spenderpflanzen weiterverwendet.

Die Sorte "Golden Promise" ist eine zweizeilige Sommergerste, die aufgrund ihrer Eignung für Transformation und Gewebekultur verwendet wird (Wan und Lemaux, 1994). Bei den im folgenden als "Samen" bezeichneten Früchte der Gerste handelt es sich im botanischen Sinn um die für Gräser typischen Karyopsen (Ehrendorfer, 1991).

#### 7.1.2 Anzucht der Spenderpflanzen

Samen werden auf feuchtem Filterpapier in einem Plexiglasbehälter 3 – 4 Tage bei 24°C und 16 h Licht in einem Ehret KBK/LS 4330 Gewebekulturschrank vorgekeimt. Die kräftigsten Keimlinge werden einzeln in ein 1:1-Gemisch aus autoklavierter Erde Typ P und Perlite in 8 cm-Töpfe ausgepflanzt, in eine Heraeus Vötsch HPS 2000 Pflanzenkammer gebracht und gleichmässig feucht gehalten (ca. 10 ml pro Tag und Topf). Nach etwa 7 Tagen werden die Pflanzen in grössere Töpfe (20 cm Durchmesser) verpflanzt (1 : 3 Gemisch aus Erde Typ T und Perlite) und nach folgendem Schema mit Wasser und Dünger versorgt:

Wasser – und Düngergaben pro Pflanze							
Woche	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
1	500				500		
2	500				500		
3	100	100	100	100	100	100	100
4	200	200	200	200	200	200	200
5	400	400	400	400	400	400	400
6	500	500	500	500	500	500	500
7	500	500	500	500	500	500	500
8	500/10	500	500	500	500	500	500
9	500/10	500	500	500	500	500	500
10	500/10	500	500	500	500	500	500
11	500/10	500	500	500	500	500	500
12	500/10	500	500	500	500	500	500

**Tabelle 4:** Versorgung der Pflanzen mit Wasser und Düngerlösung

Düngerlösung: 0,1 % v/v Wuxal Super Plant food in VE-H<sub>2</sub>O.

Wachstumsbedingungen in der HPS 2000 Pflanzenkammer:

80 % Luftfeuchtigkeit

16 h Tag/ 16°

8 h Nacht/ 12°

Lichtintensität:	in Topfhöhe (ca. 20 cm)	400 $\mu$ Einstein/m <sup>2</sup> s
	in Pflanzenhöhe (100 cm)	600 – 700 $\mu$ Einstein/m <sup>2</sup> s

Die Entwicklungsdauer nach dem Auskeimen bis zur Ernte der unreifen Embryonen betrug ca. 12 – 14 Wochen.

Sollten nach Abschluss der Experimente noch Samen geerntet werden, verblieben die Pflanzen in der Pflanzenkammer, bis sie sich in allen Teilen deutlich gelb-braun verfärbt hatten. Gleichzeitig wurden die Wassergaben so eingeschränkt, dass die Erde nicht vollständig austrocknete. Danach konnten die Pflanzen in einen Raum gebracht werden, in dem die Samen einige Wochen lang ausreifen und abtrockneten. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Pflanzen nicht mehr bewässert. Reife Ähren wurden geerntet, die Samen einzeln entnommen und in Papiertüten (Samentüten) aufbewahrt.

### **7.1.3 Transformierte Pflanzen**

Putativ transgene Pflanzen wurden nach Abschluss der Gewebekulturphase ebenfalls in Erde ausgepflanzt und wie die Spenderpflanzen in eine HPS2000 Pflanzenkammer überführt. Um die Umstellung zu erleichtern, wurde für einige Tage eine Plastiktüte über den Topf gestülpt und die Erde leicht feucht gehalten. Später erfolgte die Versorgung mit Wasser und Dünger und die Ernte der Samen wie bei den Spenderpflanzen.

## **7.2 Ernte und Isolierung unreifer Gersten-Embryonen**

Unreife Gerstenembryonen wurden geerntet, sobald sie einen Durchmesser von ca. 1,5 - 2 mm erreicht hatten.

Um die Embryonen für die Transformation vorzubereiten wurden zunächst mit einer spitzen Pinzette die Deck- und Vorspelzen vollständig entfernt. Dann konnten die Karyopsen zur Sterilisation in einer sterilen Petrischale unter einer Sterilbank mit 70%igem Ethanol (p.a.) überschichtet, 1 – 2 Minuten inkubiert und nach Entfernen

---

des Alkohols dreimal mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>ultrapur.</sub> gewaschen werden. Danach wurde der Embryo mit einem Skalpell längs halbiert und steril entnommen.

### **7.3 Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens***

#### **7.3.1 Vorbereitung der Bakterien**

Zur Transformation wurde *Agrobacterium tumefaciens* 1-2 Tage im Schüttler bei 28°C mit entsprechender Selektion angezogen. Um die Bakterien zur Transformation von Antibiotika-Resten zu befreien, wurde 1 ml der Suspension 2 Minuten bei 7000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig in 1 ml Medium resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt, im letzten Schritt wurden der Suspension schliesslich gegebenenfalls 50µM Acetosyringon zugesetzt.

#### **7.3.2 Transformation von Gersten-Embryonen mit *Agrobacterium tumefaciens***

Zur Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* wurden 2 verschiedene Methoden untersucht:

Bei der ersten Methode wurden die halbierten Embryonen auf Callus-Induktions-Medium ohne Selektion und ohne Antibiotikum so ausgelegt, dass die Schnittfläche möglichst nicht auf dem Medium zu liegen kam. Dann wurde 1 ml der entsprechenden Bakterien-Suspension gleichmässig über die Embryonen pipettiert, die Platte verschlossen und bei 24°C im Dunkeln in einem Brutschrank inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug dabei 2 – 4 Tage und richtete sich unter anderem nach der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien, die von Stamm zu Stamm leicht unterschiedlich war.

---

Bei der zweiten Methode wurden die halbierten Embryonen sofort nach der Präparation in ein Reaktionsgefäß zu 1 ml Bakteriensuspension gegeben und anschliessend 30 – 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension abgenommen und die Embryonen ohne vorherigen Wasch-Schritt auf Callus-Induktionsmedium ohne Selektion oder Antibiotikum überführt. Die Inkubationszeit konnte wegen der geringeren Bakteriendichte bei dieser Methode zwischen 2 und 7 Tagen betragen, ohne dass bei längerer Inkubationszeit Gewebeschäden auftraten.

Eine Abwandlung dieser Methode bestand darin, die Embryonen einer Vakuuminfiltration zu unterziehen, bevor sie auf das Medium überführt wurden,

Für beide Methoden wurde untersucht, ob vorheriger Beschuss der Embryonen mit Goldpartikeln ohne DNA zur Verwundung zu einer erhöhten Transformationsfrequenz führt.

## **7.4 Gewebekultur**

### **7.4.1 Medien für die Kultur der Embryonen**

Die Zusammensetzung der Medien für Callus-Induktion und Regeneration von Pflanzen aus unreifen Embryonen (Wan und Lemaux, 1994) wird untenstehend gezeigt:

	<b>Callus Induktions- Medium</b>	<b>Entwicklungs- medium</b>	<b>Bewurzelungs- medium</b>
	mg/L	mg/L	mg/L
MS Salze	4490	4490	4490
Maltose	30000	30000	30000
Myo-Inositol	250	250	250
Casein-Hydrolysat	1000	-	-
Prolin	690	-	-
Thiamin HCl	1	1	1
Pyridoxin HCl	0,5	-	-
Nicotinsäure	0,5	-	-
Glycin	2	-	-
2,4-D	2	-	-
BAP	-	1	-

**Tabelle 5:** Medien für Callus-Induktion und Pflanzen-Regeneration

Die Medien wurden doppelt konzentriert hergestellt, der pH mit KOH auf pH 5,7 eingestellt und über Bottle-Top-Filter sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm).

Zum Gießen wurde das Medium 1:1 mit autoklaviertem Gelrite (0,7% für Petrischalen, 0,4% für Magenta-Boxen) gemischt, benötigte Hemmstoffe erst nach Abkühlung zugegeben.

#### 7.4.2 Weitere Kultur der Embryonen

Embryonen wurden – unabhängig davon, nach welcher der beiden Methoden sie transformiert worden waren – nach Abschluss der Inkubationsphase mit *Agrobacterium tumefaciens* auf Callus-Induktionsmedium überführt, das zum einen das bakteriozid wirkende Antibiotikum Timentin (150mg/l) enthielt, um die *Agrobacterien* abzutöten, zum anderen Bialaphos in der Konzentration 3 mg/l zur

Selektion transgener Zellen. Überführung auf neue Platten geschah zum ersten Mal nach 10 Tagen, alle weiteren Schritte nach jeweils 14 – 20 Tagen.

Schnell wachsende Zelllinien wurden als putativ transgen angesehen und getrennt weiterkultiviert. Beim Auftreten somatischer Embryonen wurde das entsprechende Callus-Gewebe auf Regenerationsmedium überführt und bei 24°C in Licht weiterkultiviert. Sobald die somatischen Embryonen zu grünen Pflanzen auskeimten, wurden diese auf Bewurzelungsmedium in Magenta-Boxen überführt. Bewurzelte Pflanzen konnten in Erde gepflanzt und verbleiben bis zur Reife in der Heraeus Pflanzenkammer.

## **8. Analyse transgener Pflanzen**

Die Funktionen der Gene *gus* und *bar* wurde verwendet, um bereits zu einem frühen Zeitpunkt eine Aussage treffen zu können, ob eine Transformation erfolgreich gelungen war.

### **8.1 GUS Histochemische Färbung**

Schnell wachsender Callus, Embryonen oder Blattstücke putativ transgener Pflanzen wurden in einem Reaktionsgefäß mit Färbelösung überschichtet und einige Stunden bzw. über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur besseren Sichtbarmachung der blauen Farbe konnte bei Blättern das Chlorophyll extrahiert werden (70 % Ethanol, 65°C für 1 Stunde, Ethanol abnehmen, Vorgang falls nötig 2 – 3 mal wiederholen). Gefärbtes Gewebe kann in Ethanol aufbewahrt werden.

---

## 8.2 "BASTA"-Sprühtest

Transformierte Pflanzen und Sämlinge transformierter Pflanzen wurden mit einer 0,1 – 0,2%igen wässrigen Lösung des Herbizids BASTA besprüht bzw. einzelne Blätter gekennzeichnet und in die Herbizidlösung eingetaucht. Nach 1 – 2 Tagen können junge Pflanzen auf Resistenz untersucht werden, bei adulten Pflanzen kann eine sichere Aussage erst nach etwa 3 – 5 Tagen getroffen werden. Blätter nicht-resistenter junger Pflanzen trocknen ein und färben sich zunächst gelb-braun, später dann weiß, während Blätter älterer Pflanzen zwar ebenfalls eintrocknen, aber grün bleiben. Blätter resistenter Pflanzen zeigen – unabhängig vom Alter - keinerlei Schädigung.

---

## Ergebnisse

### 1. Gewebekultur und Transformation

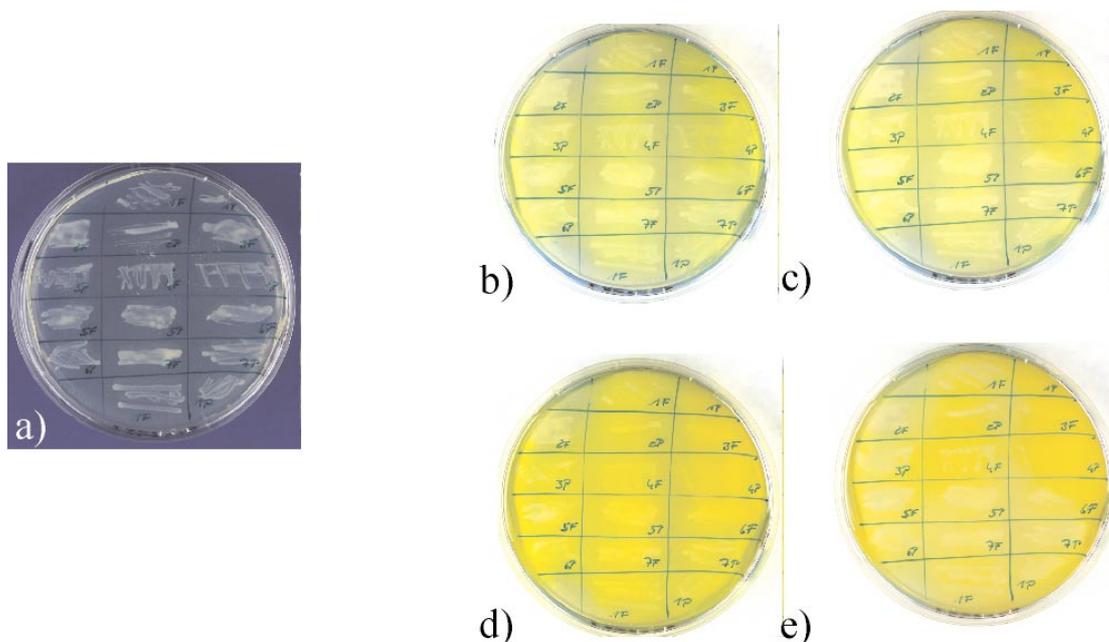
Bevor mit der Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* begonnen wurde, war in der Arbeitsgruppe bereits die sogenannte biolistische Transformation von Gerste etabliert, bei der auf Goldpartikel präzipitierte DNA direkt in das Gewebe eingebracht wird. Die dabei häufig auftretenden komplexen Integrationsmuster (durch Übertragung mehrerer Plasmide oder Fragmentierung des Konstrukts) gestalteten die Analyse der transgenen Pflanzen oft schwierig. Aus diesem Grund sollte als alternative Methode die Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* etabliert werden, von der erwartet wurde, daß eine vollständige Übertragung großer Fragmente möglich ist und Einzel-Insertionen bzw. einfachere Integrationsmuster als bei der biolistischen Methode möglich sind.

#### 1.1 Spezifischer Nachweis von *Agrobacterium tumefaciens*

In Kulturen von *Agrobacterien* können Hefen als Kontaminanten auftreten. Diese sind optisch schwer von *Agrobacterium* zu unterscheiden, haben zudem das selbe Temperaturoptimum und eine sehr ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit. Als Eukaryonten können sie zudem auch auf Selektionsmedium überleben.

Nach einer Transformation – ob durch Elektroporation oder tri parental mating – musste also sichergestellt werden, daß es sich bei den isolierten Kolonien um *Agrobacterium* handelte. Dabei konnten Hefen allein durch ihre Größe mikroskopisch von Bakterien unterschieden werden. Eine Unterscheidung von *E. coli* oder anderen stäbchenförmigen Bakterien war auf diese Weise allerdings nicht möglich.

*Agrobacterium* ist spezifisch in der Lage, die im Medium enthaltene Lactose zu 3-Ketolactose zu oxidieren. Überschichten mit Benedicts-Reagenz führt durch Reduktion zu einer Gelbfärbung des Mediums um die Kolonien (Bernaerts M., J. and De Ley, J. 1963). Weder Hefen noch *E.coli* konnten diese Reaktion durchführen, so daß dieser Test routinemäßig nach Plasmid-Transformation und auch nach längerer Kultur der *Agrobacterien* durchgeführt wurde. Dafür wurden die jeweiligen Einzelkolonien auf Lactose-haltigem Medium ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Die Kolonien wurden mit Benedicts-Reagenz überschichtet und bei Raumtemperatur inkubiert. Abbildung 3 zeigt die Farb-Reaktion über Nacht inkubierter Kolonien.

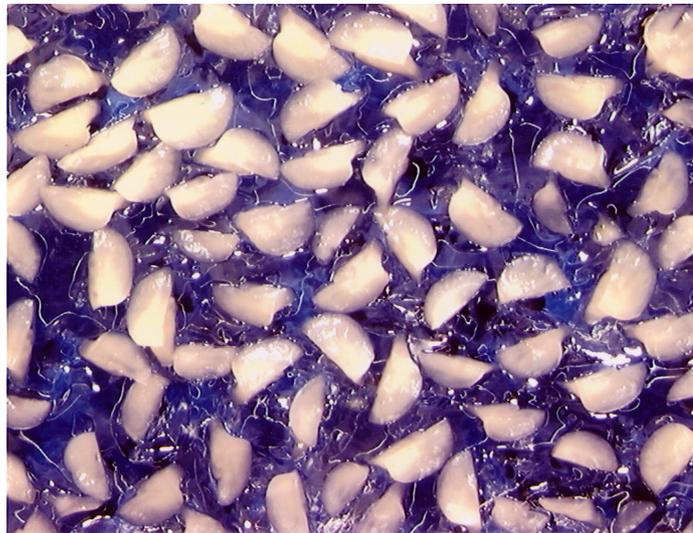


**Abbildung 3:** Färbetest für *Agrobacterium tumefaciens*. Abbildung a) zeigt über Nacht auf Lactose-Medium inkubierte Kolonien vor der Anfärbung. In Abbildung b) erkennt man Gelbfärbung des Mediums nach etwa 5 Minuten. Abbildungen c) und d) zeigen die selbe Reaktion nach 10 bzw. 15 Minuten, Abbildung e) nach 30 Minuten.

## 1.2 Zerstörung der Keimachse

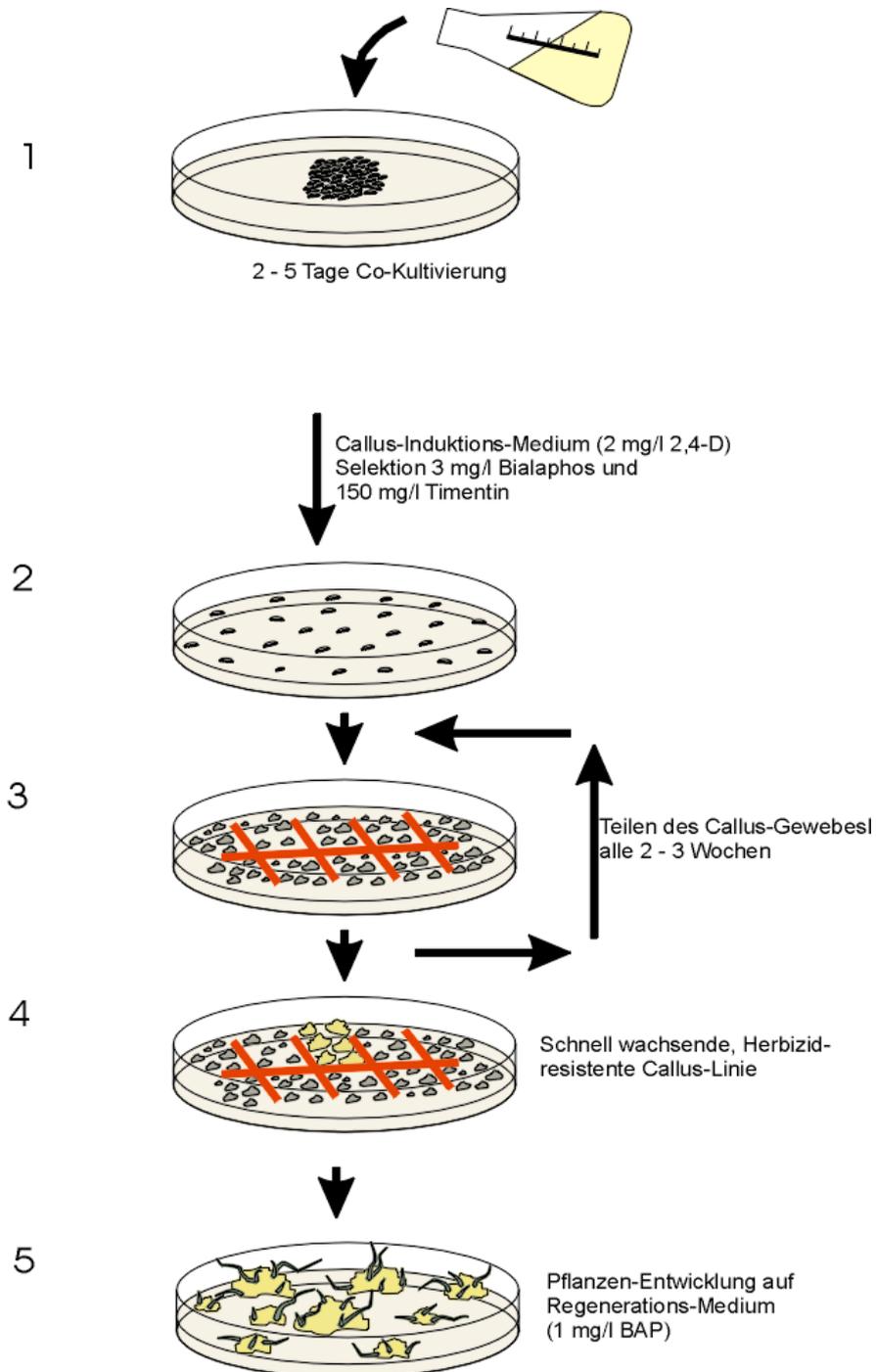
Als Zielgewebe für die Transformation wurden - wie auch bei Tingay *et al.* (1996) beschrieben – unreife Embryonen mit einem Durchmesser von 1,5 – 2 mm verwendet. Es war wichtig zu verhindern, daß die Embryonen auf dem Callus-Induktionsmedium auskeimten, da in diesem Fall das Skutellum, von dem die Callus-Bildung ausgeht, vom Medium abgehoben wurde und kein Callus-Gewebe entstehen konnte. Dazu kann mit einem scharfen Skalpell die Embryo-Achse entfernt werden (Tingay *et al.* 1996). Allerdings sollte so wenig wie möglich von dem in der Gruppe etablierte Gewebekultur-Protokoll abgewichen werden, das eine Entfernung der Embryo-Achse nicht vorsieht (Wan und Lemaux, 1994).

Aus diesem Grund wurde als erstes erprobt, ob eine einfache Längs-Halbierung der Embryonen und die damit verbundene Verletzung des Keimsprosses ausreichte, um ein Auskeimen der Embryonen zu verhindern. Dies war in der Regel der Fall, in allen anderen Fällen wurden auskeimende Sprosse und Wurzeln nach Beendigung der Inkubationszeit beim Übertragen auf Selektionsmedium entfernt.



**Abbildung 4:** Längs halbierte Embryonen auf Callus-Induktions-Medium ausgelegt

### 1.3 Etablierung der Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Transformations- und Gewebekultur-Schritte:

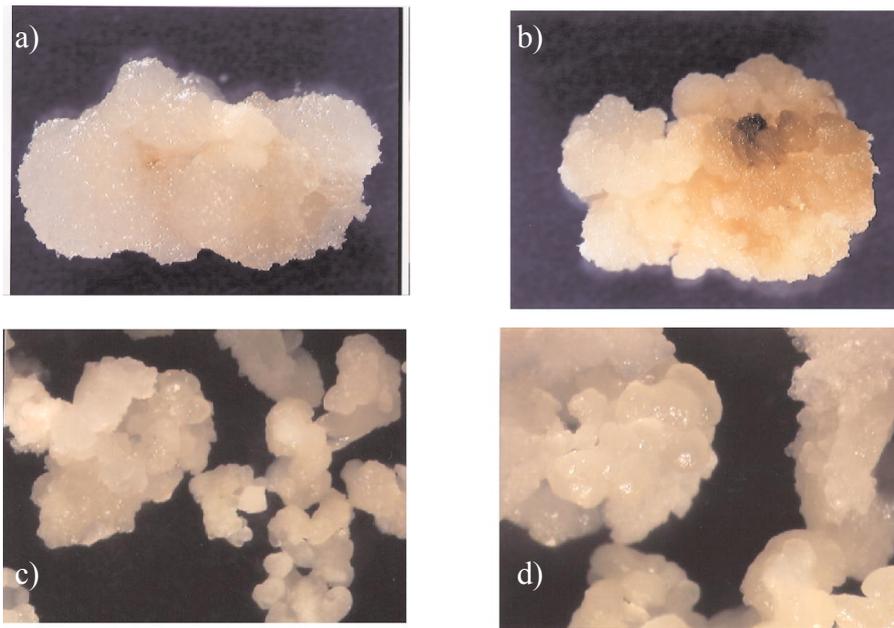
Im 1. Schritt wurden entweder 1 ml der *Agrobacterium*-Suspension über die auf Medium ausgelegten halbierten Embryonen pipettiert, oder die halbierten Embryonen wurden in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml Bakteriumsuspension inkubiert und dann auf Callus-Induktions-Medium ausgelegt.

Der 2. Schritt zeigt das Umsetzen der halbierten Embryonen nach 2 – 5 Tagen Co-Kultur mit *Agrobacterium* auf Selektionsmedium (Callus-Induktions-Medium mit 3 mg/L Bialaphos und 150 mg/L Timentin).

Schritt 3: Um den Selektionsdruck möglichst gleich zu halten, musste das entstehende Callus-Gewebe regelmässig alle 2 – 3 Wochen umgesetzt und dabei mit einer spitzen Pinzette gleichmäßig in möglichst kleine Teile zerteilt werden.

Schritt 4 zeigt die Entstehung schnell wachsender, putativ transgener Callus-Linien. Dieses Gewebe war von nicht-transgenem Gewebe an der Farbe und an der Konsistenz zu unterscheiden. Nicht-transgenes Gewebe ist in der Regel weich, oft kam es durch absterbende Gewebeteile zu Braunfärbung. Transgenes Callus-Gewebe hingegen ist fest mit einer leicht körnigen Oberfläche und hat eine weiß-gelbliche Farbe. Auf diesem Gewebe-Typ entwickelten sich im Laufe der Gewebekultur somatische Embryonen aus einzelnen Zellen. Dieses Gewebe wurde in Licht weiter inkubiert, um die Entwicklung von Pflanzen zu fördern. Aus den somatischen Embryonen keimten einzelne Pflanzen aus, die bei einer Größe von etwa 1 – 2 cm vom Callus-Gewebe abgenommen und bewurzelt wurden.

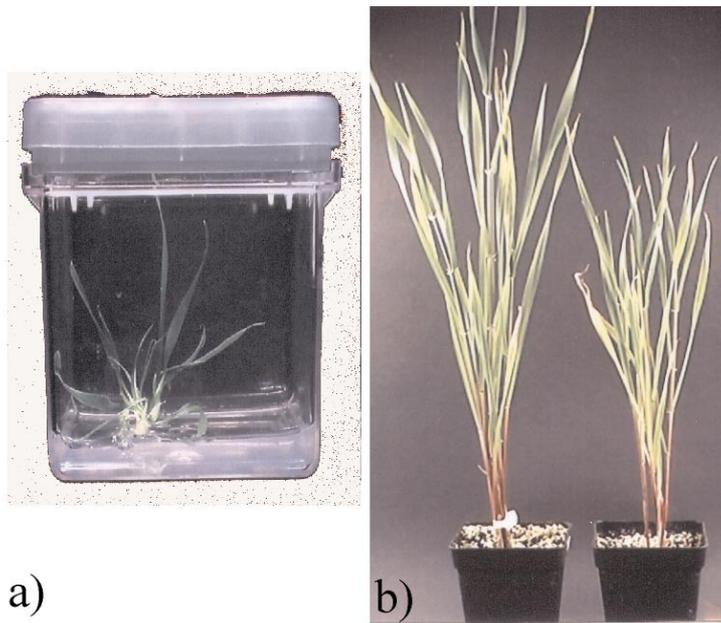
Verschiedene Callus-Gewebetypen sind in Abbildung 6 dargestellt:



**Abbildung 6:** Callus-Gewebe vor der ersten Teilung. a) und b) zeigen Gewebe, bei dem es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um transgenes Material handelt. Der Callus ist unstrukturiert und weich. Besonders in b) zeigt die Braunfärbung absterbendes Gewebe an. Callus dieser Art unterschied sich von transgenen Callus-Linien vor allem durch wesentlich langsames Wachstum. Auf diesem Callus entwickelten sich nie somatische Embryonen.

Die Abbildungen c) und d) zeigen embryogenen, putativ transgenen Callus. Das Gewebe ist strukturiert, fest und von weißlicher Farbe und wächst – auch nach wiederholter Teilung – schnell.

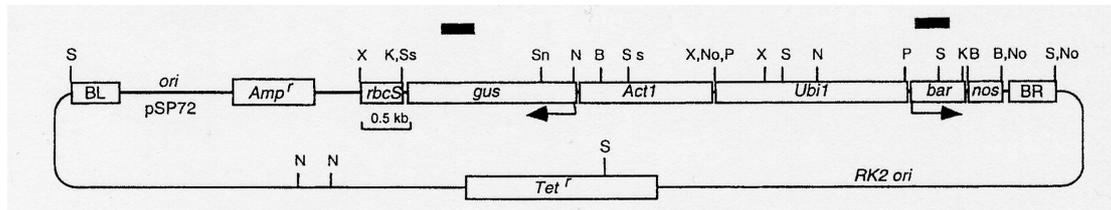
Schnell wachsende Callus-Linien wurden wie in Schritt 5 gezeigt separat auf Callus-Induktions-Medium überführt. Sobald somatische Embryonen sich zu entwickeln begannen, konnte das Gewebe auf Regenerationsmedium überführt und in Licht weiter inkubiert werden. Kleine Pflänzchen wurden abgenommen und auf hormonfreiem Medium bewurzelt. Bewurzelte Pflanzen konnten in Erde getopft und in einer Heraeus Pflanzenkammer bis zur Reife kultiviert werden.



**Abbildung 7:** Bewurzelung einer kleinen Pflanze auf hormonfreiem Medium in einer "Magenta-Box" und in Erde ausgetopfte Gerste.

## 2. Etablierung der Transformations-Methode

Zur Etablierung der Transformations-Methode wurden ein Stamm und ein Plasmid-Konstrukt benutzt, das bereits zur erfolgreichen Transformation von Gerste verwendet worden war (Tingay *et al.*, 1997). Es trägt an der linken Grenze der T-DNA ein *gus*-Gen unter der Kontrolle des Actin1-Promotors aus Reis, an der rechten Grenze das *bar*-Gen unter der Kontrolle des Ubiquitin1-Promotors aus Mais im Vektor pDM805. (siehe auch "Material und Methoden").



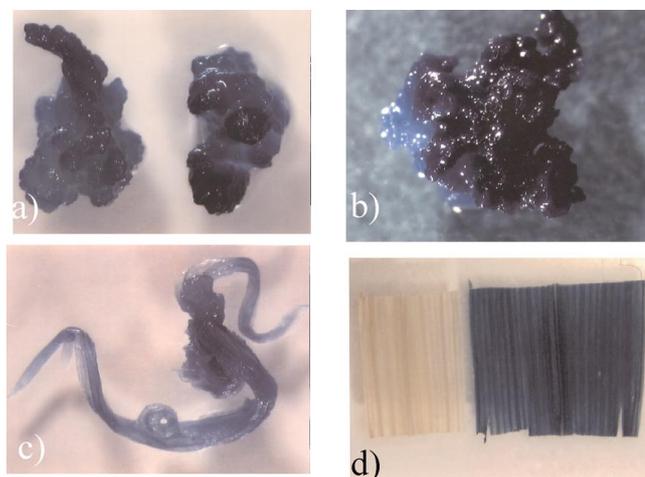
**Abbildung 8:** Vektor pDM805

### 2.1 Das *bar*-Gen als Selektions-Marker

Die im Vektor pDM805 an der Rechten Grenze der T-DNA gelegene Phosphinothricin-Acetyl-Transferase aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987) diente als Marker für die Selektion transgener Pflanzen. Während der Callus-Kultur sorgte das dem Medium zugesetzte Bialaphos dafür, daß nicht-transgenes Gewebe in seinem Wachstum gehindert wurde. Transgene Callus-Linien konnten daher leicht an ihrem schnelleren Wachstum unterschieden werden.

## 2.2 *gus* als Reporter-Gen

Als Reporter-Gen für erfolgreiche Transformation wurde *gus* ( $\beta$ -Glucuronidase) aus *E. coli* verwendet. Das Vorhandensein dieses Genes kann in transgenem Gewebe (Callus, Blattmaterial u. a.) schnell und einfach durch Anfärbung nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnte schon sehr früh in der Gewebekulturphase transgener von nicht-transgenem Callus anhand der Färbereaktion unterschieden werden, auch wenn es sich bei nicht-transgenem Gewebe um schnellwachsende "Ausreisser" handelte. Transgenes Gewebe zeigte nach 20 – 60 Minuten bei Raumtemperatur eine vollständige Blau-Färbung des gesamten Gewebes.



**Abbildung 9:** a) und b) zeigen vollständig gefärbten putativ transgenen Callus nach etwa 20 Minuten Inkubation in GUS-Färbelösung bei Raumtemperatur. c) zeigt eine aus Callus auskeimende Pflanze, d) Blattstücke adulter Pflanzen. Bei adulten Blättern wurde zur besseren Sichtbarmachung der Blaufärbung das Chlorophyll extrahiert. Zum Vergleich in d) links ein Blattstück einer nicht-transgenen Wildtyp-Pflanze nach Chlorophyll-Extraktion.

Eine wesentlich schwächere Farbreaktion konnte auch durch noch im Gewebe verbliebene *Agrobacterien* verursacht werden. Es wurde daher immer nur solches Material als "positiv" bezeichnet, das innerhalb der genannten 20 – 60 Minuten bei Raumtemperatur eine starke Blaufärbung aufwies.

### 2.3 Verwundung durch Partikel-Beschuß

In den ersten Transformationsversuchen wurden die isolierten, halbierten Embryonen zunächst wie im Protokoll von Tingay et al. angegeben mit Gold-Partikeln ohne DNA beschossen, um eine Verwundung herbeizuführen. Um den dadurch entstehenden Gewebeschaden zu minimieren, wurde eine Vor-Inkubation auf Medium mit der Hälfte der normalen Menge an Maltose (15 g/l anstatt 30 g/l) durchgeführt. Nach dem Beschuß wurden die Embryonen auf neuem Callus-Induktions-Medium so ausgerichtet, daß weder das Skutellum noch die Schnittfläche das Medium berührten, um ein Eindringen der *Agrobacterien* zu ermöglichen. Dann wurde 1 ml der *Agrobacterien*-Suspension über die Embryonen pipettiert.

Aus insgesamt 9 Experimenten, in denen 343 Embryonen verwendet wurden, konnte auf diese Weise 1 transgene Callus-Linie regeneriert werden, aus der 5 Pflanzen hervorgingen (siehe auch Tabelle 6). Dies entspricht einer Transformationsrate von 0,3 %. Die in diesem Versuch ermittelten Bedingungen (Vorinkubation, Beschuß, Zugabe von 50 µM Acetosyringon) wurden daher zunächst beibehalten.

Zudem wurde versucht, durch weitere Abwandlung der Transformationsbedingungen eine höhere Anzahl transgener Callus-Linien aus den einzelnen Transformationsansätzen zu erzielen, da aus dem Protokoll von Tingay et al. bekannt war, daß transgene Callus-Linien und Pflanzen mit Frequenzen zwischen 1,7 und 3,6% regeneriert werden konnten, nach leichter Abwandlung der Transformationsbedingungen - überschüssige Bakteriensuspension wurde von den Embryonen entfernt - sogar bis zu 7% (31 unabhängige Pflanzenlinien aus 441 Embryonen).

#### 2.4 Ist Partikel-Beschuß notwendig?

Es sollte untersucht werden, ob ein Beschuß der Embryonen zur zusätzlichen Verwundung tatsächlich notwendig ist, oder ob nicht die durch Halbieren entstandene Wundfläche ausreicht, um ein ausreichendes Eindringen der *Agrobacterien* zu ermöglichen. Dazu wurde ohne Vorinkubation 1 ml *Agrobacterien*-Suspension über die längs halbierten Embryonen pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, daß die Schnittfläche das Medium nicht berührt.

In 7 Experimenten konnten auf diese Weise aus 260 Embryonen 30 Callus-Linien regeneriert werden, von denen 14 *gus*-positiv waren. Dies entspricht einer Transformationsfrequenz von 5%. Es ist wahrscheinlich, daß unter den hier verwendeten Transformationsbedingungen, in denen die Embryonen halbiert wurden, ein zusätzlicher Goldbeschuß das Gewebe schädigt und die Transformationseffizienz dadurch sinkt. Auf Goldbeschuß wurde daher in allen folgenden Transformations-Ansätzen verzichtet.

## 2.5 Vakuum-Infiltration

In der nächsten Versuchsreihe mit 15 Experimenten und insgesamt 645 Embryonen, wurde eine Vakuum-Infiltration der Embryonen mit der Bakteriensuspension erprobt. Auf diese Weise sollten die *Agrobacterien* tiefer in das Gewebe eingebracht werden, um dadurch die Transformationsfrequenz noch weiter zu erhöhen.

Dazu wurden die halbierten Embryonen in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml Bakteriensuspension entweder in einem Excikator oder in der particle gun 1 – 2 Minuten infiltriert. Dabei zeigte sich deutlich, daß eine Vakuum-Infiltration sich nachteilig auf die Regeration transgener Callus-Linien auswirkte, denn aus 4 Ansätzen mit Vakuum-Infiltration konnte nur eine transgene Linie regeneriert werden, während in den Kontroll-Ansätzen 14 Callus-Linien entstanden, aus denen 8 Pflanzen regeneriert wurden. Außerdem mußten viele der Ansätze wegen Kontamination verworfen werden. Aus diesen Gründen wurde in allen folgenden Experimenten auf eine Vakuum-Infiltration verzichtet.

Eine Übersicht über sämtliche Experimente, in denen der Stamm AGL1 (pDM805) verwendet wurde, ist in Tabelle 6 dargestellt

Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Behandlung	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	Gus-Färbetest	Southern Gus	Southern Bar
1	41	Vorinkubation 24 h, 24 °C Beschluß, Kein Acetosyringon	0	-	-	-	-
2	40	Vorinkubation 24 h, 24°C Beschluß, Acetosyringon 50 mM	0	-	-	-	-
3	50	Vorinkubation 24 h, 24°C Beschluß, Acetosyringon 50 mM	0	-	-	-	-
4	78	Vorinkubation 24 h, 24 °C Beschluß, Kein Acetosyringon	0	-	-	-	-
7	30	Vorinkubation 24 h, 24 °C Beschluß, Kein Acetosyringon	0	-	-	-	-
8	50	Vorinkubation 24 h, 24 °C Beschluß, Kein Acetosyringon	0	-	-	-	-
9	54	Vorinkubation 24 h, 24°C Beschluß, Acetosyringon 50 mM	1	5	L1: + L2: + L3: + L4: + L5: +	L1: + L2: + L3: + L4: n.t. L5: +	+ + + n.t. +

Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Behandlung	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	Gus-Färbetest	Gus Bar	Southern Bar
10	49	24 h, 24°C dunkel 30 g/l Maltose Beschluß, 50 mM Acetosyringon	2	-	L1: - L2: -	n.t.	n.t.
11	39	24 h, 24°C dunkel 15 g/l Maltose Beschluß, 50 mM Acetosyringon	2	-	L1: - L2: -	n.t.	n.t.
12	40	24 h, 24°C dunkel 30 g/l Maltose, Beschluß, Kein Acetosyringon	2	0	L1: - L2: Sektor	L1: n.t. L2: +	L1: n.t. L2: +
13	37	24 h, 24°C dunkel 15 g/l Maltose Beschluß, Kein Acetosyringon	0	-	-	-	-
14	40	24 h, 24°C dunkel 30 g/l Maltose Kein Beschluß 50 mM Acetosyringon	0	-	-	-	-
15	40	24 h, 24°C dunkel 30 g/l Maltos Kein Beschluß Kein Acetosyringon	0	-	-	-	-

Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Behandlung	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	Gus-Färbetest	Gus Bar	Southern Bar
16	40	Keine Vorinkubation	8	L1P1, P2 L2P1 L9P1	L1: -	L1: -	L1: -
		Kein Beschuß			L2: -	L2: -	L2: -
		Kein Acetosyringon			L4: + L5: + L6: + L7: + L8: - L9: -	L4: n.t. L5: + L6: + L7: + L8: n.t. L9: n.t.	L4: n.t. L5: + L6: + L7: + L8: n.t. L9: n.t.
17	40	Keine Vorinkubation	6	0	L1: -	L1: -	L1: -
		Kein Beschuß			L2: -	L2: n.t.	L2: n.t.
		50 mM Acetosyringon			L3: - L4: + L5: - L6: -	L3: + L4: + L5: n.t. L6: n.t.	L3: + L4: + L5: n.t. L6: n.t.
18	40	Keine Vorinkubation	6	0	L1: -	L1: -	L1: +
		Kein Beschuß			L2: -	L2: n.t.	L2: n.t.
		50 mM Acetosyringon			L3: + Sektor L4: + L5: - L6: +	L3: - L4: + L5: n.t. L6: n.t.	L3: - L4: + L5: n.t. L6: n.t.

Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Behandlung	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	Gus-Färbetest	Gus Bar	Southern Bar
19	39	Keine Vorinkubation Kein Beschuß Kein Acetosyringon	5	L3P1, P2, P3	L1: - L2: Sektor + L3: - L4: - L5: -	L1: n.t. L2: - L3: - L4: n.t. L5: n.t.	L1: n.t. L2: - L3: +? L4: n.t. L5: n.t.
20	40	Keine Vorinkubation, Kein Beschuß, Kein Acetosyringon	2	0	L1: - L2: -	L1: - L2: n.t.	L1: - L2: n.t.
21	21	Keine Vorinkubation Kein Beschuß 50 mM Acetosyringon	7	L7P1, P2, P3, P4	L1: + L2: + L3: + L4: + L5: - L6: + L7: -	L1: n.t. L2: n.t. L3: + L4: + L5: n.t. L6: + L7: n.t.	L1: n.t. L2: n.t. L3: + L4: + L5: n.t. L6: + L7: n.t.
22	40	Keine Vorinkubation Beschuß 2 Minuten Vakuum-Infiltration 50 mM Acetosyringon	3	0	L1: + L2: + L3: -	L1: n.t. L2: + L3: n.t.	L1: n.t. L2: + L3: n.t.

Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Behandlung	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	Gus-Färbetest	Southern	
						Gus	Bar
23	40	Keine Vorinkubation Beschuß 2 Minuten Vakuum-Infiltration 50 mM Acetosyringon	8	L2P1, P3, P3	L1: - L2: + L3: + L4: + L5: + L6: - L7: - L8: Sektor +	L1: nt.	L1: nt.
						L2: +	L2: +
						L3: nt.	L3: nt.
						L4: +	L4: +
						L5: nt.	L5: nt.
						L6: nt.	L6: nt.
						L7: nt.	L7: nt.
						L8: +	L8: +
24	40	Keine Vorinkubation Beschuß 2 Minuten Vakuum-Infiltration 50 mM Acetosyringon	2	0	L1: - L2: -	L1: nt.	L1: nt.
						L2: nt.	L2: nt.
25	40	Keine Vorinkubation Beschuß 2 Minuten Vakuum-Infiltration 50 mM Acetosyringon	1	0	L1: +	L1: +	L1: +

**Tabelle 6:** Übersicht über alle mit dem AGL1 und dem Vektor pDM805 unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Experimenten.

### 3. Analyse der mit pDM805 transformierten Pflanzen

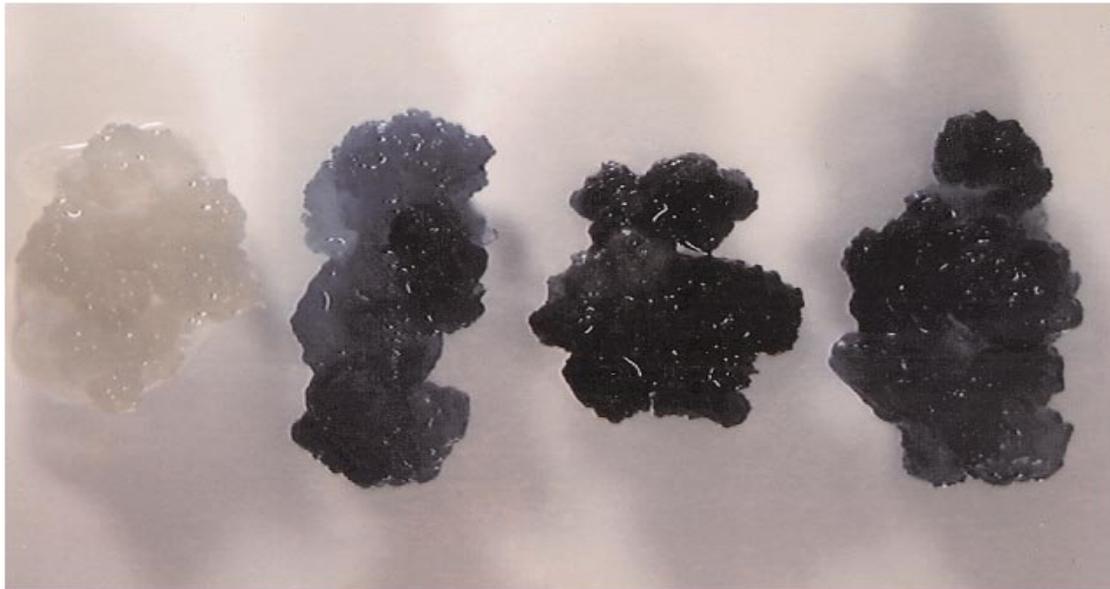
Insgesamt konnten in 26 Experimenten unter den unterschiedlichen genannten Bedingungen 56 Callus-Linien regeneriert werden. Alle Linien wurden durch Gus-Färbung getestet, aus allen positiven sowie einigen negative Linien wurden DNA isoliert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und im Southern Blot mit radioaktiv markierten Sonden für *gus* und *bar* hybridisiert.

#### 3.1 Gus-Färbung

Um bereits auf Callus-Ebene putativ transgene Linien identifizieren zu können, wurde Callus-Gewebe entnommen und in X-Gluc-Färbelösung inkubiert. Dabei wurde nur solcher Callus als "positiv" bezeichnet, der innerhalb von etwa 30 Minuten eine starke Blaufärbung aufwies. In einigen Fällen kam es zu einer starken Färbung über Nacht. Solche Linien wurden separat erfasst. Desweiteren wiesen einige Callus-Linien eine ungleichmäßige Färbung auf: während ein Sektor eine Farbe-Reaktion zeigte, blieb im restlichen Callus-Gewebe eine Färbereaktion aus. Auch solche Linien wurden separat erfasst.

Noch im Gewebe verbliebene *Agrobacterien* waren ebenfalls in der Lage, die Farbreaktion durchzuführen. Um dies zu testen, wurden Bakterien direkt in die Färbelösung gegeben und einige Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei zeigte die Bakterienmasse eine leichte Blaufärbung. Allerdings dauerte diese Reaktion wesentlich länger und führte auch nach Inkubation über Nacht nie zu einer tiefblauen Färbung. Aus diesem Grund wurde nicht nur vollkommen ungefärbter, sondern auch Callus mit nur leichter Blaufärbung als "negativ" bezeichnet.

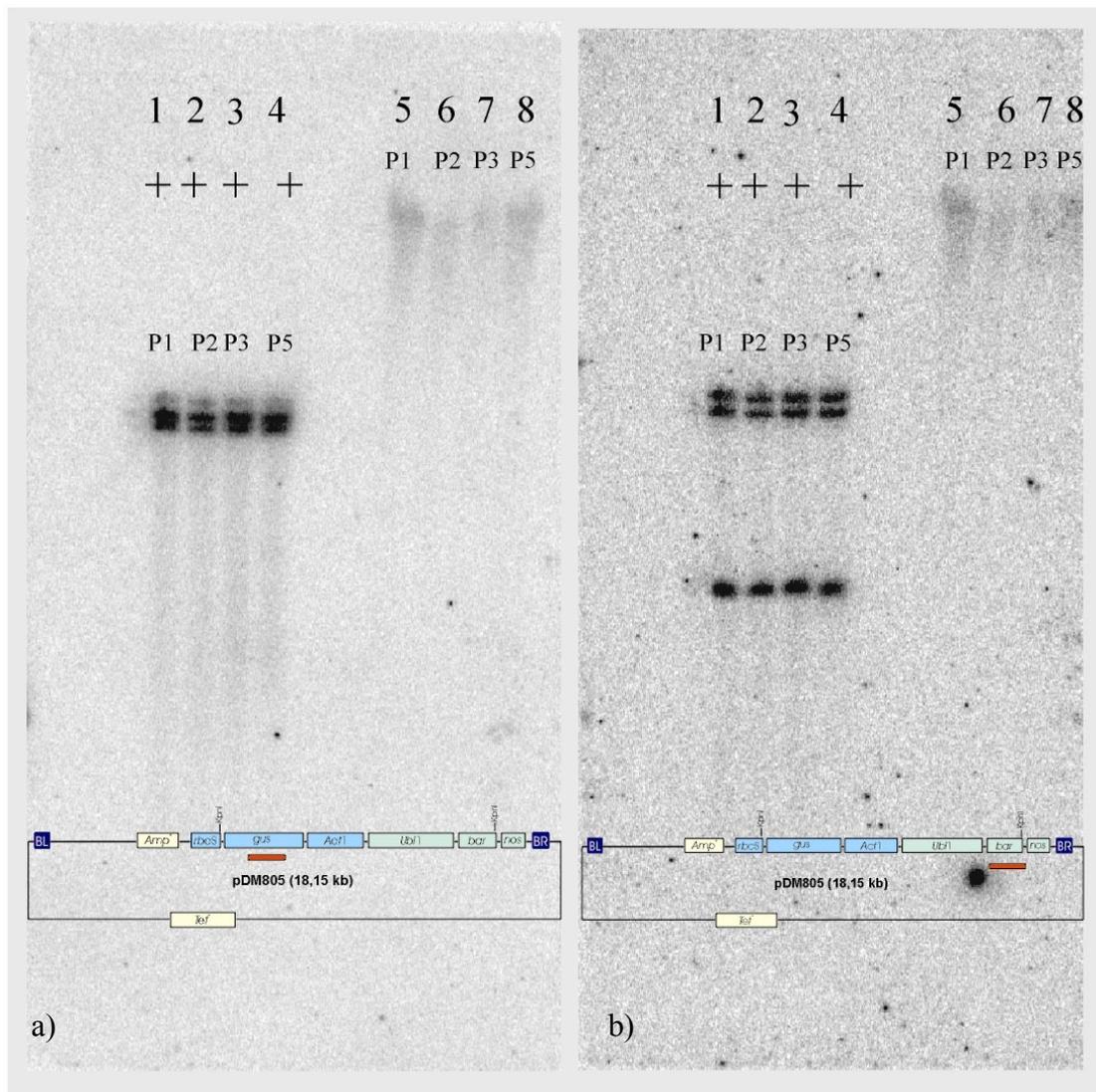
Abbildung 10 zeigt die Farbreaktion von Callus nach 10minütiger Inkubation in der Färbelösung bei Raumtemperatur.



**Abbildung 10:** Transgene Callus-Linien nach Inkubation in X-Gluc-Färbelösung. Im Vergleich dazu nicht-transgener Callus als Kontrolle.

### 3.2 Analyse durch Southern Blot

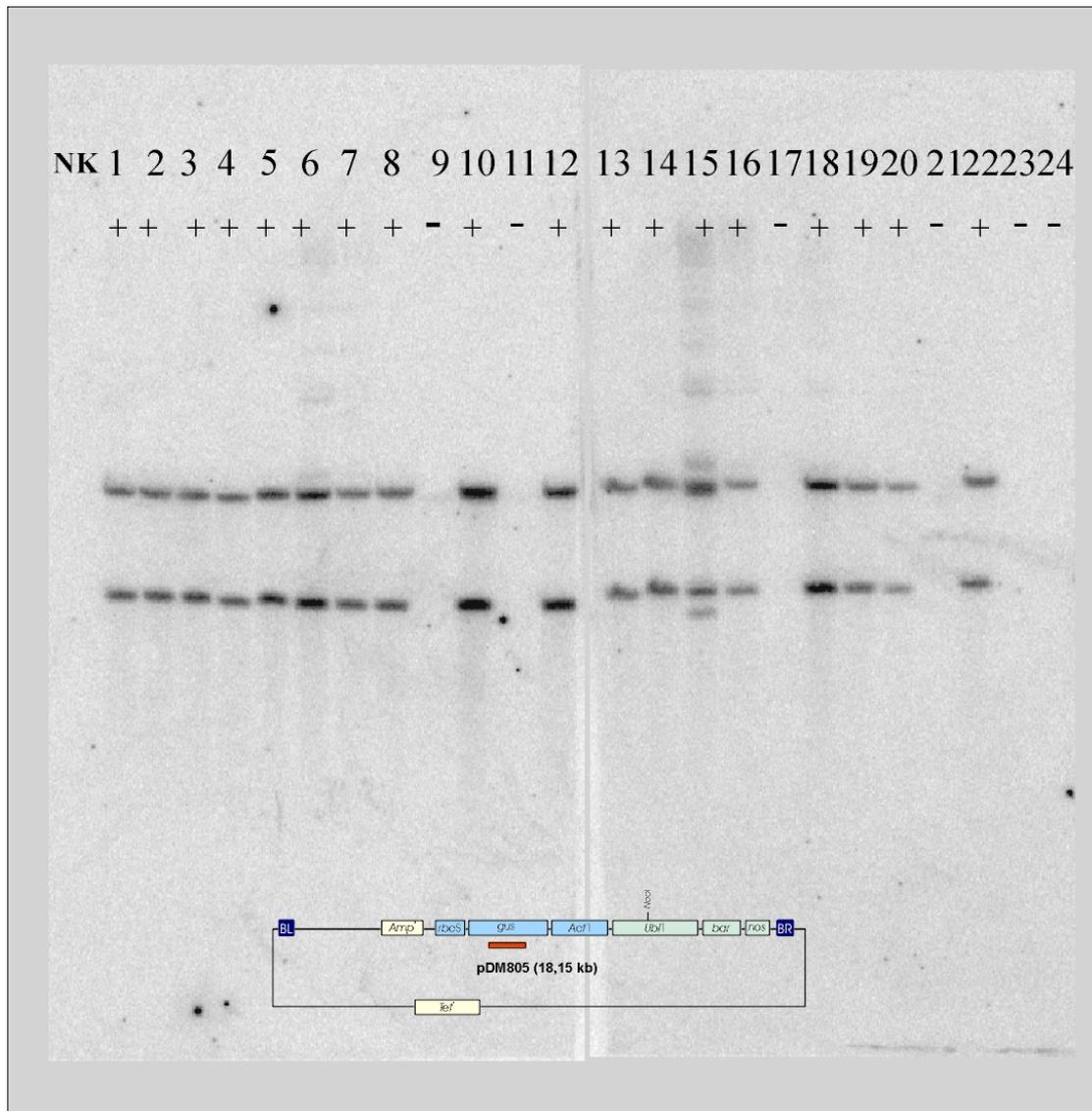
Aus Callus-Gewebe wurde DNA isoliert und mit Restriktionsenzymen geschnitten. Das Enzym *KpnI* schneidet das Konstrukt an zwei Stellen und erzeugt ein internes Fragment von etwa 5,5 kb. Es wurde verwendet, um zu transgene Callus-Linien identifizieren zu können. Abbildung 11 zeigt Southern Blots für ausgewählte Callus-Linien aus allen 26 Experimenten. Dabei wurden überwiegend solche Linien verwendet, die eine positive Gus-Färbereaktion gezeigt hatten, aber auch unsichere Linien mit schwacher Färbung, sowie einige Linien, die als negativ bezeichnet worden waren.



**Abbildung 11:** Southern-Blot für 4 Pflanzen der Linie 9L1 (P1 – P5).

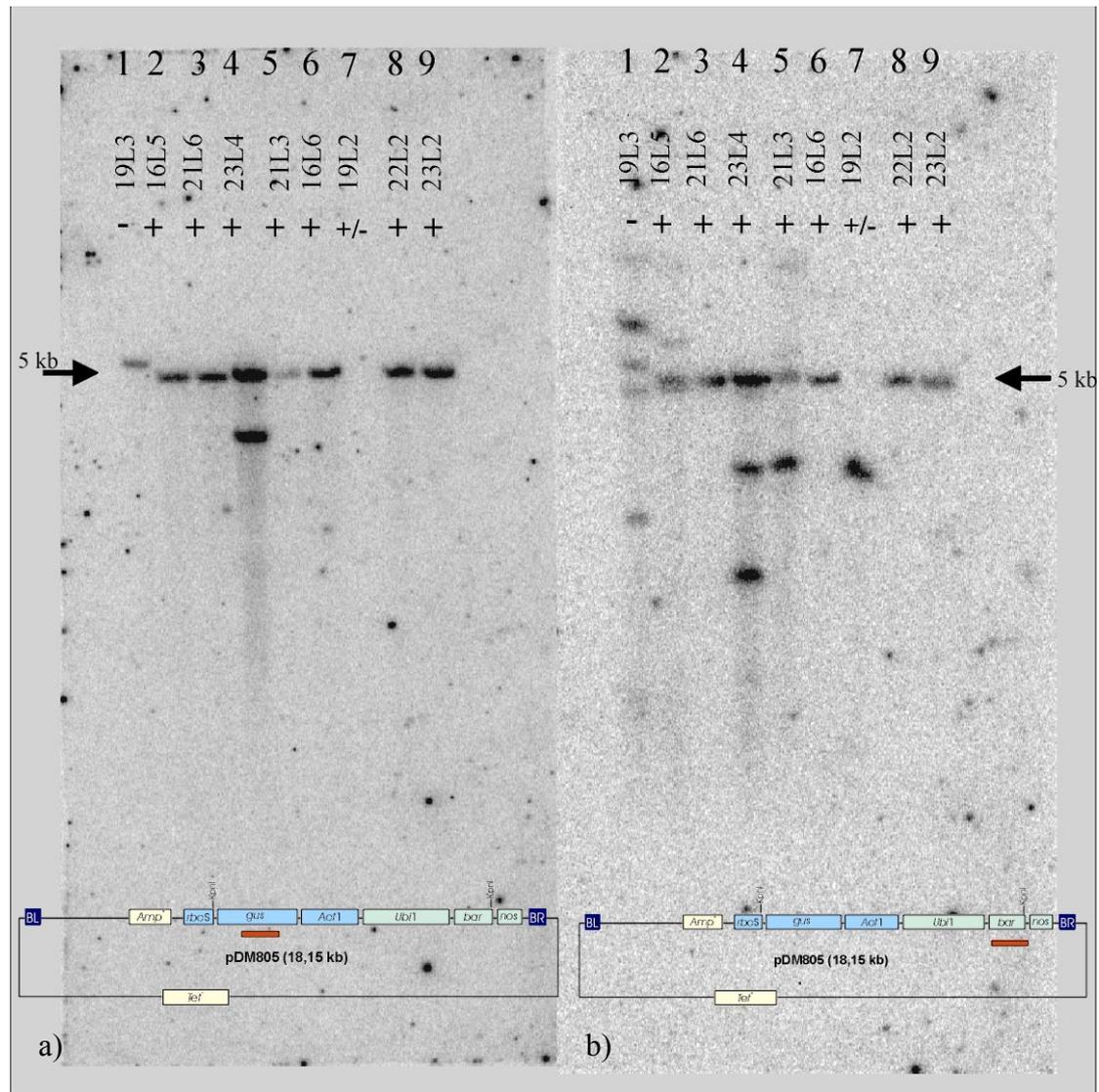
1 – 4: Pflanzen-DNA geschnitten mit *KpnI*, hybridisiert jeweils mit Sonden für *gus* (a) bzw. *bar* (b). 5 – 8: Pflanzen-DNA ungeschnitten. Alle Pflanzen (P1 – P5) wurden aus der selben Callus-Linie regeneriert.

Die Anzahl der Banden zeigt, daß mehrere Integrationen vorliegen. In b) ist bei Hybridisierung mit *bar* eine erheblich kleinere Bande vorhanden, die in a) bei Hybridisierung mit *gus* fehlt. Es handelt sich daher in mindestens 2 Fällen um vollständige Integrationen und zusätzlich um eine unvollständige Integration, bei der *gus* nicht übertragen wurde.



**Abbildung 12:** Southern-Blot von 24 segregierenden  $T_1$ -Nachkommen der Pflanze 9L1P1. Die DNA wurde mit *NcoI* gesehnt, das eine einzige Schnittstelle im Konstrukt aufweist und damit eine direkte Aussage über die Anzahl der integrierten Kopien zulässt. Es handelt sich hier um 2 unabhängige Kopien, die in allen Pflanzen auftreten. Die zusätzlich auftretenden schwächeren Banden in den Pflanzen 6 und 15,16 und 18 sind möglicherweise auf Umordnung des Konstrukts bei der Integration in das Pflanzengenom zurückzuführen.

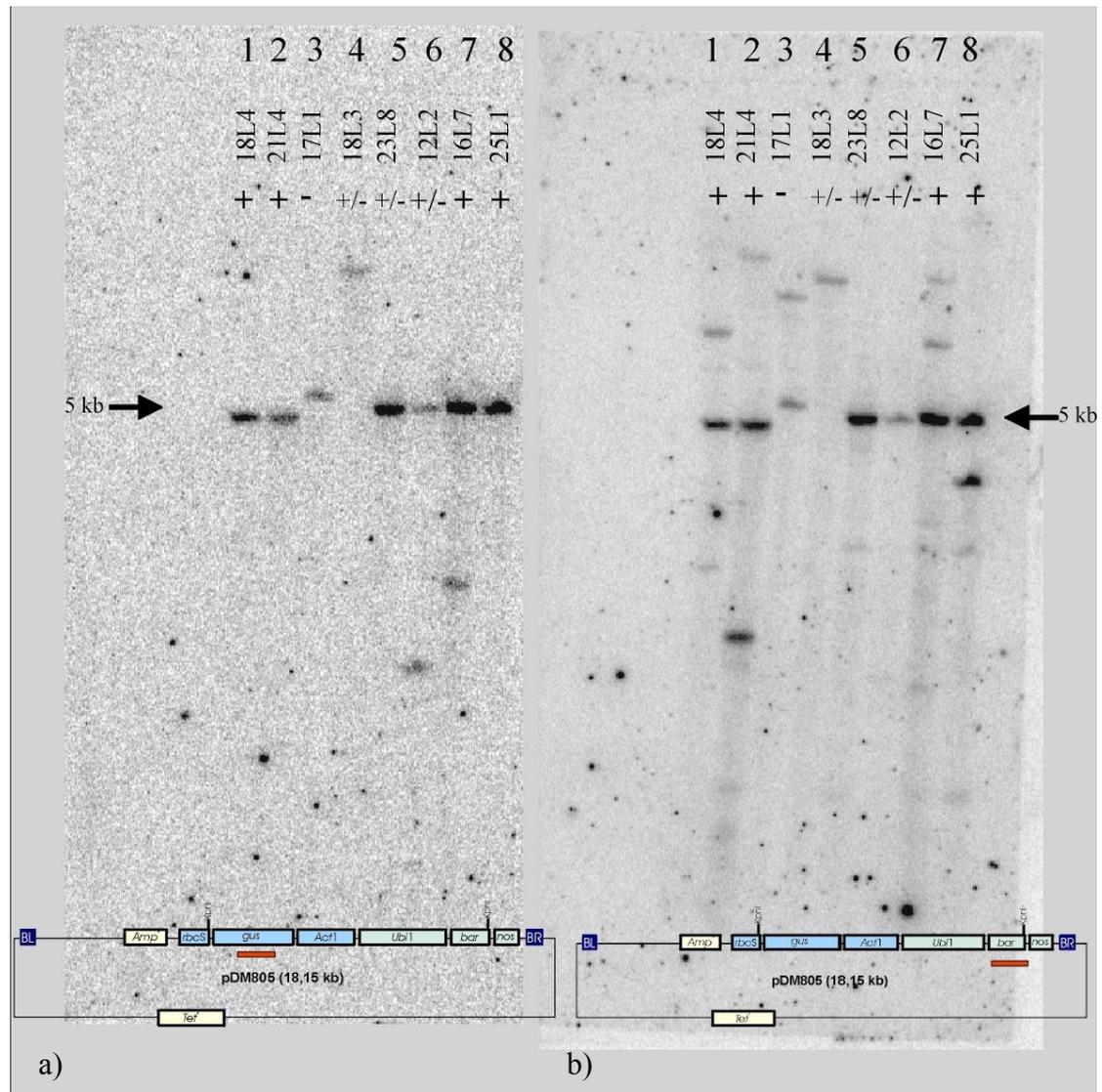
Zusätzlich wurden Blattstücke aller Pflanzen einem Gus-Färbetest unterzogen. + = Blattstück positiv im Gus-Färbetest; - = Blattstück negativ im Gus-Färbetest. Nur solche Pflanzen zeigen eine positive Gus-Reaktion, die auch das Konstrukt enthalten, die 4 Pflanzen, die im Gus-Färbetest negativ waren, zeigen keine Hybridisierung mit der Sonde. Somit kann ausgeschlossen werden, daß im Gewebe verbliebene *Agrobacterien* für die Farbe-Reaktion verantwortlich sind.



**Abbildung 13:** Southern-Blot zum Nachweis transgener Callus-Linien. DNA 7 verschiedener Gus-positiver, 1 Gus-negativen Linien und 1 Linie, die eine schwache Färbung nur in einem Sektor aufwies, wurde mit *KpnI* geschnitten, um transgene Linien identifizieren zu können. In a) wurde eine Sonde für *gus*, in b) eine Sonde für *bar* verwendet. Alle Gus-positiven Linien zeigen eine starke Hybridisierung der erwarteten Grösse mit beiden Sonden. Dies spricht dafür, daß das Konstrukt vollständig übertragen und intakt integriert wurde.

Die Linie 23L4 weist mehrere Integrationen auf, von denen eine vollständig ist; eine Bande die mit *bar* und *gus* hybridisiert ist deutlich kleiner, die dritte fehlt ganz. Hier handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine unvollständige Kopie, der das *gus*-Gen fehlt.

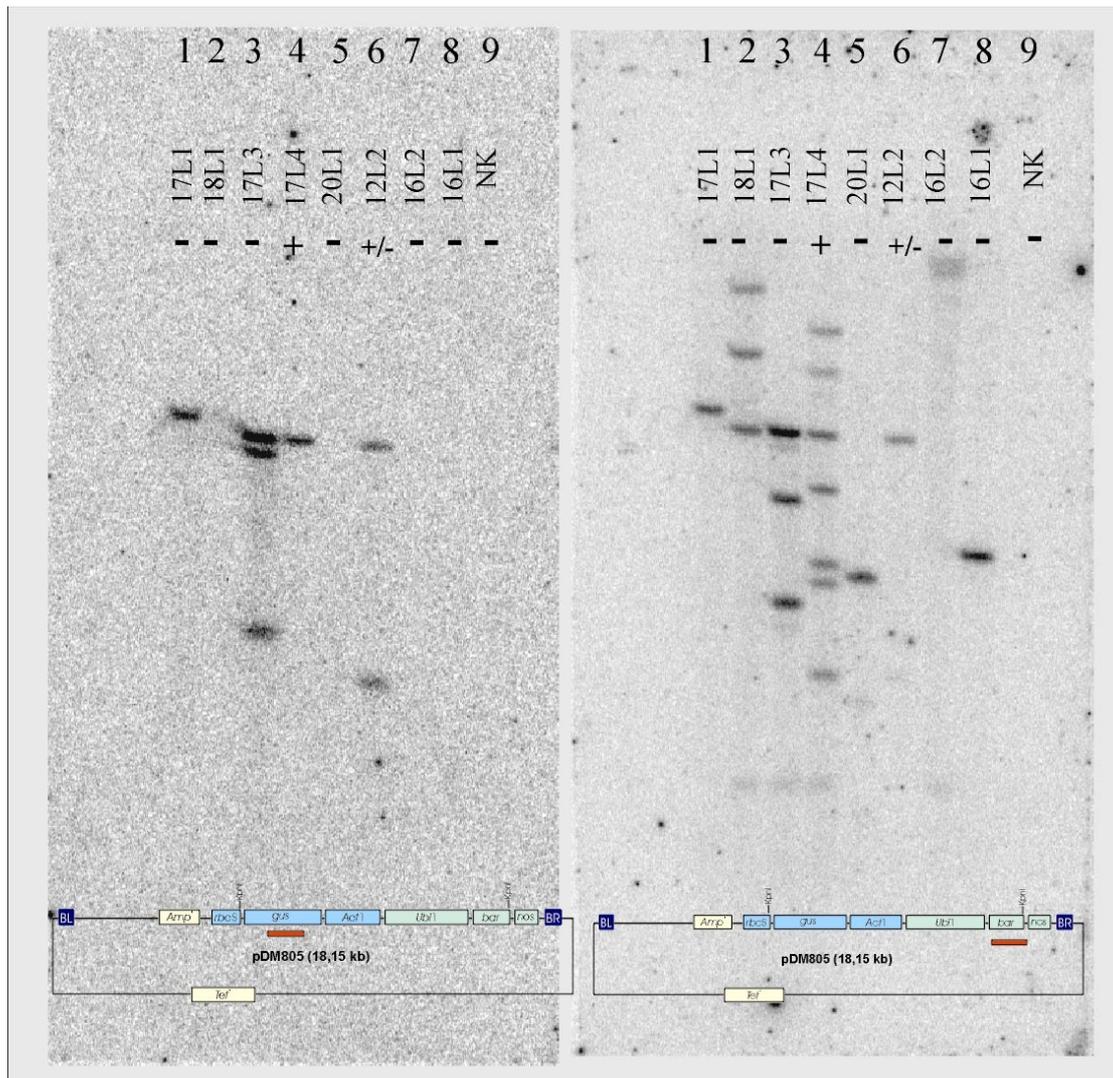
Auch in der Linie 21L3 treten bei Hybridisierung mit *bar* 2 Banden auf, bei Hybridisierung mit *gus* jedoch nur eine. Auch hier wurden sehr wahrscheinlich eine vollständige und eine unvollständige Kopie übertragen und integriert.



**Abbildung 14:** Southern-Blot zum Nachweis transgener Callus-Linien. Die DNA stammt aus 4 *gus*-positiven und 1 eindeutig *gus*-negativen Linie. Zusätzlich wurden 3 Linien untersucht, die eine *Gus*-Färbung nur in einem Sektor zeigten (+/-). Alle *gus*-positiven Linien zeigen deutliche Hybridisierung mit beiden Sonden. Die bei der Linie 21L4 vorhandene zusätzliche Bande für *bar* deutet wiederum auf die Übertragung einer zusätzlichen, unvollständigen Kopie hin, da die Bande bei Hybridisierung mit *gus* nicht auftritt. Gleiches gilt für die zusätzliche Bande in der Linie 25L1.

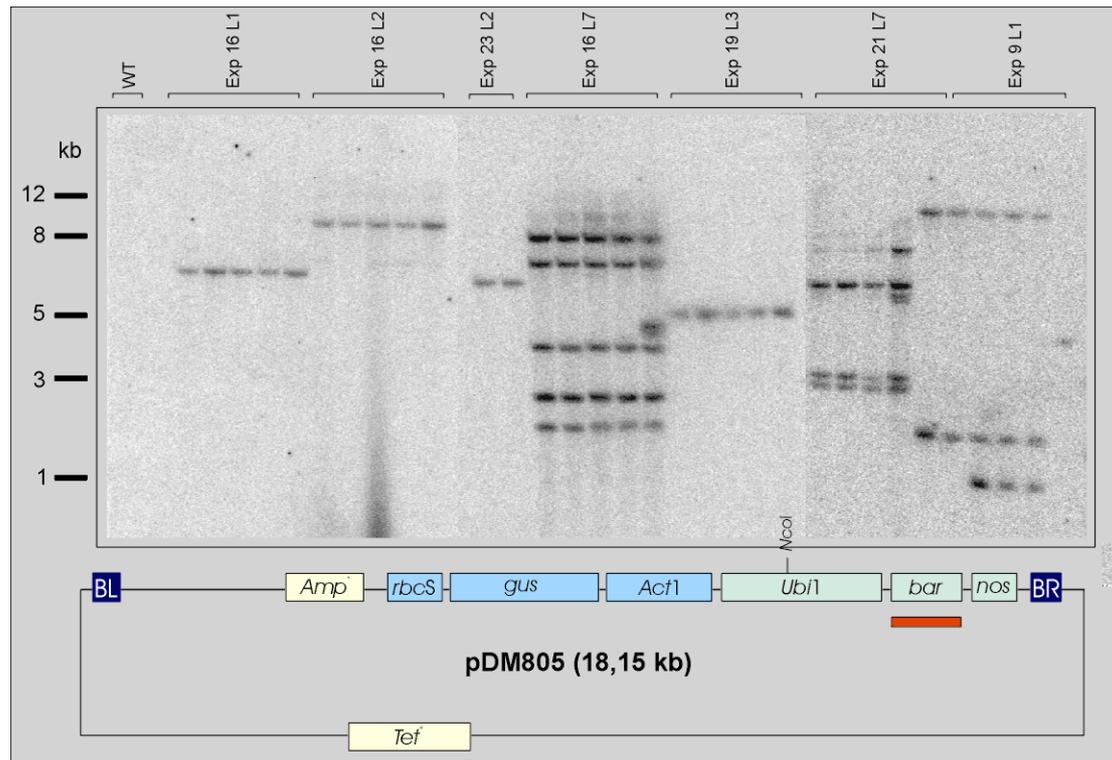
In der *gus*-negativen Linie 17L1 tritt zwar eine Bande auf, die mit beiden Sonden hybridisiert, was auf Vorhandensein des Konstruktes hindeutet, das jedoch nicht funktionsfähig ist.

Die Linie 18L3, bei der eine schwache Färbung nur in einem Sektor auftrat, hybridisiert mit keiner der beiden Sonden und erweist sich somit als nicht-transgener "Ausreisser". Die schwache Färbung des Callus-Gewebes wurde möglicherweise durch im Gewebe vorhandene Bakterien verursacht. Anders dagegen bei der Linie 23L8, die eine starke Hybridisierung zeigt: hier trat starke Färbung in einem Sektor auf. Dies spricht dafür, daß in dem *gus*-negativen Sektor nicht-transgenes Gewebe an der Callus-Bildung mitbeteiligt war.



**Abbildung 15:** Southern-Blot zum Nachweis transgener Linien. Hier wurden überwiegend relativ schlecht wachsende *gus*-negative Callus-Linien verwendet, zusätzlich eine Linie, die Färbung in einem Sektor aufwies und eine *gus*-positive Linie. 4 der *gus*-negativen Linien zeigen keine Hybridisierung mit der *gus*-Sonde. Die *gus*-positive Linie 17L4 weist eine vollständige und mehrere unvollständige Integrationen auf.

Die *gus*-negative Linie 17L1 hybridisiert zwar mit beiden Sonden, jedoch ist die Bande größer als erwartet und das Konstrukt nicht funktionsfähig. Dies wurde auch schon bei der Linie 19L3 in Abbildung 14 beobachtet. In der Linie 18L1 fehlt die Hybridisierung mit der *gus*-Sonde, für *bar* treten eine Bande der erwarteten Größe und zusätzlich weitere, größere Banden auf. In den Linien 20L1 und 16L2 wurde jeweils ein unvollständiges Konstrukt übertragen, Hybridisierung erfolgt nur mit *bar*. Bei der Linie 16L1 handelt es sich um einen nicht-transgenen "Ausreisser"



**Abbildung 16:** Southern-Analyse verschiedener als transgen identifizierter Pflanzen-Linien. Um die Anzahl der Integrationen darzustellen, wurde die DNA mit *NcoI* geschnitten, das nur eine Schnittstelle im Konstrukt aufweist. Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde für *bar*.

4 der 7 Linien tragen eine Einzel-Integration, während die Linie 9L1 3 Kopien der T-DNA enthält. Nur die Linien 16L7 und 21L7 weisen komplexe Integrationsmuster mit 6 bzw. mindestens 4 Kopien der T-DNA.

### 3.3 Analyse der T-DNA-Integrationsstellen

Es sollte versucht werden, nachzuweisen, daß die Integrationen von T-DNA in Gerstedenen aus anderen Pflanzen-Systemen wie *Arabidopsis thaliana* oder Reis ähneln.

Dazu wurde über die AIMS-Technik die DNA am Übergang von T-DNA zu Pflanzen-DNA analysiert. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der AIMS-Analyse für 5 Pflanzen-Linien für die Linke Grenze der T-DNA und 4 Linien für die Rechte Grenze der T-DNA.

Linie	T-DNA	Rechter 25 bp-Border-Repeat	Vektor/Pflanzen-DNA
pDM805	TAAACTATCAGTGTT	TGACAGGATAATA	TGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAAGAGCGGTTT
16L7P1	TAAACTATCAGTGTT	AAACGGTGTCATCTATGTTGGGTTGGGTTTGGATCTGTATGTG	
16L7P1	TAAACTATCAGTGTT	GGAATAATCGA	-----
19L3P1	TAAACTATCAGTGTT	TGAATGAATTCCCGA	-----
42L1P1	TAAACTATCAGTGTT	TGACGTTAAGGATTTGGACGCAAGCCATCACCTCAAGAGCAAAA	
Linie	T-DNA	Linker 25 bp-Border-Repeat	Vektor/Pflanzen-DNA
pDM805	TATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTT	GTTTACACCCACAATAATATCCTGCCA	CCAGCCAGCCAG
21L7	TATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTT	GTTTACACCCACAATAATATCCTGAC	CGCTCGAGAACCCAC
60L2	TATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTT	GTTTACACCCACAATGCTTTA	ACCCGTTGAAGTTGCTTT
58L1	TATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTT	GTTTACACCCACGATATATGGCA	GGAAGGAGAGAGCAG
42L1	TATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTT	GTTTA	ACTGATAGTTTAAACCTGAAGCGCGGGAACCG

**Abbildung 17:** Ergebnisse der AIMS-Analyse verschiedener transgener Pflanzen-Linien. Gelb unterlegt die Bereiche der Rechten bzw. Linken T-DNA-Grenze, in grün Pflanzen-DNA, in rot Vektor-DNA. Im Vergleich dazu jeweils die Border Repeats des Vektors pDM805.

Die T-DNA-Integration in Pflanze 16L7P1 weist eine Base des Rechten Border-Repeat auf, wie dies auch in Tabak-Transformanten festgestellt werden konnte (Yadav *et al.*, 1982; Zambryski *et al.*, 1982). Auch in Reis wurde diese Art der T-DNA-Integration beobachtet (Hiei *et al.*, 1994).

Zwei der Pflanzen – 19L3P1 und 42L1P1 – weisen mehr als eine Base aus dem Right-Border-Repeat (3 bzw. 4) auf. Bei Reis konnte ebenfalls beobachtet werden, daß mehr als eine Base des Right-Border-Repeat integriert wurde, jedoch handelte es sich in den beiden beobachteten Fällen jeweils um 2 Basen (Hiei *et al.*, 1994).

Die Integrationen der Linken T-DNA Grenze liegen an verschiedenen Stellen innerhalb des 25 bp-Border-Repeat, wie dies auch in Tabak und Reis beobachtet werden konnte.

## **4. Transformation des Zwei-Komponenten-Systems und Analyse des transgenen Gewebes**

### **4.1 *En/Spm* als molekulares Werkzeug**

Das autonome *En/Spm*-Transposon (Enhancer/Suppressor-Mutator) aus Mais (Peterson, 1953, McClintock, 1953) codiert alle für seine Transposition notwendigen Faktoren. Dabei handelt es sich um die *trans*-aktiven Faktoren, die Transposasen TnpA und TnpD (Frey *et al.*, 1990) und die *cis*-regulatorischen Sequenzen. Diese bestehen aus 13 bp langen, invertierten Sequenzwiederholungen, die sich an beiden Enden des Elementes befinden. Sie werden deshalb als "terminal inverted repeats" bezeichnet. Ein autonomes Element ist mithin in der Lage, seinen ursprünglichen Ort im Genom zu verlassen und an einer neuen Stelle – zumeist benachbart – erneut zu integrieren.

Daneben existieren auch solche Elemente, die nicht mehr zur selbständigen Transposition fähig sind, weil sie entweder in den *cis*-regulatorischen Elementen oder den *trans*-aktiven Faktoren mutiert sind. Solche Elemente werden als Inhibitor- oder defekte Elemente (*dSpm*) bezeichnet. Ein defektes Element kann allerdings durch in *trans* zur Verfügung gestellte Transposasen aktiviert werden. Dieser Effekt wird in einem Zwei-Komponenten-System genutzt, da nach Auskreuzen und Verlust der Transposasen die Insertion in einen neuen Gen-Ort stabil bleibt.

#### 4.2 Klonierung der Konstrukte für das Zwei-Komponenten-System

Für die Transformation mit *Agrobacterium* wurden 4 verschiedene Konstrukte hergestellt. Davon enthielten zwei jeweils *dSpm* bzw. *cwEn*, das dritte den Excisionsreporter, das das vierte das autonome *En*-Element. Im Gegensatz zu *En* fehlen dem *cwEn*-Element die terminal inverted repeat-Sequenzen an beiden Enden des Elementes.

Die Herstellung von Pflanzen, die das autonome *En* enthalten, war notwendig, um feststellen zu können, ob in dem heterologen System Gerste eine Transposition von *En* generell möglich ist. Genaue Beschreibung und Abbildung der Konstrukte siehe "Material und Methoden".

Für die Transformation des Zwei-Komponenten-Systems wurden der Stamm LBA4404 und ein "super-binäres" Hybrid-Vektor-System verwendet, die bereits für die erfolgreiche Transformation von Reis verwendet worden waren (Komari et al. 1996). Die verwendeten Konstrukte und eine Beschreibung des super-binären Hybrid-Vektor-Systems pSB1/pSB11 finden sich im Teil "Material und Methoden".

Alle Callus-Linien und Pflanzen, die mit dem Konstrukt für *dSpm* transformiert worden waren, wurden durch Southern Blot analysiert, alle anderen Callus-Linien und

Pflanzen, die aus diesen Experimenten hervorgingen, durch PCR mit Primern für *bar* und die jeweilige Komponente, um die Integration der T-DNA nachzuweisen.

#### 4.2.1 Aktivierbare Komponente: nicht-autonomes Element *dSpm/En I6078*

Als erstes konnten zwei Konstrukte für das defekte Element *dSpm-bar* fertiggestellt und über *tri parental mating* in den *Agrobacterium*-Stamm LBA4404 eingebracht werden. Die beiden Konstrukte unterscheiden sich hinsichtlich der Orientierung von *Ubi-bar-nos*: in dem hier als "Nr 116" bezeichneten Konstrukt ist der Promotor *Ubi* zu *dSpm* orientiert, das Konstrukt "Nr. 117 hat die umgekehrte Orientierung, der Terminator *nos* ist zu *dSpm* orientiert.

a) Konstrukt "Nr. 116 *Ubi* zu *dSpm*"



b) Konstrukt "Nr 117 *ter* zu *dSpm*"



**Abbildung 18:** Konstrukte für die Transformation von *dSpm*. Beide Konstrukte wurden zur Transformation verwendet.

Zur Transformation wurde 1 ml Bakteriensuspension vorsichtig über die auf Callus-Induktionsmedium ausgelegten Embryonen pipettiert. Auf diese Weise wurden aus für das Konstrukt Nr. 116 (*Ubi* zu *dSpm*) in 6 Experimenten mit 253 Embryonen 6 Pflanzen aus 7 unabhängigen Callus-Linien regeneriert. In weiteren Versuchen mit dem Konstrukt Nr. 117 (*nos* zu *dSpm*) wurden 280 Embryonen verwendet, aus denen 14 unabhängige Callus-Linien und insgesamt 28 Pflanzen entstanden. Tabelle 7 zeigt

eine Übersicht über die Experimente und die regenerierten Callus-Linien bzw. Pflanzen. Die Integration der übertragenen DNA wurde durch Southern-Blot bestätigt.

Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Konstrukt	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	dSpm	Southern	bar
1	41	Nr. 116 <i>Ubi zu dSpm</i>	0	-	-	-	-
2	43	Nr. 116 <i>Ubi zu dSpm</i>	0	-	-	-	-
4	44	Nr. 116 <i>Ubi zu dSpm</i>	0	-	-	-	-
6	40	Nr. 116 <i>Ubi zu dSpm</i>	0	-	-	-	-
8	45	Nr. 116 <i>Ubi zu dSpm</i>	3	5: L1P1 L2P1 - 3	+	+	+
10	40	Nr. 116 <i>Ubi zu dSpm</i>	4	2:L4P1 - 2	n.t.	n.t.	n.t.
Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Konstrukt	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	dSpm	Southern	bar
3	40	Nr. 117 <i>nos zu dSpm</i>	3	8: L1P1 - 2 L2P1 - 3 L3P1 - 3	Pflanzen: L1P2: + L2P1: - L3P1: +	L1P2: + L2P1: + L3P1: +	L1P2: + L2P1: + L3P1: +
5	38	Nr. 117 <i>nos zu dSpm</i>	0	-	-	-	-
7	39	Nr. 117 <i>nos zu dSpm</i>	0	-	-	-	-
9	43	Nr. 117 <i>nos zu dSpm</i>	3	3: L1P1 L2P1 - 2	Callus: L1: + L2: + L3: +	Callus: L1: + L2: + L3: +	Callus: L1: + L2: + L3: +
11	40	Nr. 117 <i>nos zu dSpm</i>	0	-	-	-	-
13	40	Nr. 117 <i>nos zu dSpm</i>	4	8: L1P1 - 2 L2P1 - 2 L3P1 - 2 L4P1 - 2	n.t.	n.t.	n.t.
15	40	Nr. 117 <i>nos zu dSpm</i>	4	9: L1P1 - 2 L2P1 - 2 L3P1 - 4 L4P1	n.t.	n.t.	n.t.

**Tabelle 7:** Übersicht über die Ergebnisse der mit *dSpm* durchgeführten Experimente.

In 6 Experimenten, in denen 253 Embryonen verwendet wurden, konnten mit dem Konstrukt Nr. 116 (Ubi zu dSpm) 7 Callus-Linien regeneriert werden. Dies entspricht einer Transformationsrate von 2,7%.

#### 4.2.2 Excisions-Reporter: 35SI6078gus-bar

Als zweites Konstrukt konnte der Excisionsreporter 35SI6078gus – bar fertiggestellt werden. Auch dieses Konstrukt wurde über *tri parental mating* in LBA4404 eingebracht. Mit diesem Konstrukt wurde zum ersten Mal die Transformation routinemäßig durchgeführt. Um sicherzustellen, daß es nicht zu einer Gewebeerstörung durch Überwachsen mit Bakterien kam, wurden von diesem Zeitpunkt an alle Transformations-Ansätze in Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Aus 255 verwendeten Embryonen wurden 2 unabhängige Callus-Linien regeneriert, die beide aus dem selben Transformations-Ansatz stammten. Aus diesen beiden Linien entstanden insgesamt 11 Pflanzen.

Die Integration der T-DNA wurde durch PCR nachgewiesen. Dazu wurden Primer für *gus*, *I6078* und *bar* verwendet. Alle getesteten Pflanzen zeigten starke Banden korrekter Größe. Zudem wurden sowohl Primärtransformanten als auch ihre Nachkommen auf Resistenz gegen "BASTA" untersucht. Blätter der Primärtransformanten wurden gekennzeichnet und in eine 0,1%ige BASTA-Lösung eingetaucht, da dieser Test durchgeführt wurde, bevor DNA aus den Pflanzen gewonnen werden konnte. 10 Nachkommen der Linie 67L1P1 wurden ebenfalls auf Resistenz, vor allem aber auf Segregation des übertragenen Konstruktes untersucht. 9 dieser in der PCR als positiv ermittelten Linie zeigten eindeutige Resistenz gegen das Herbizid, wohingegen 1 Pflanze wie auch die als Kontrolle verwendeten Wildtyppflanzen abstarben.

### 4.2.3 Aktivator-Komponente: *cwEn/Spm*

Aus 1071 Embryonen konnten nach Transformation mit *cwEn* 34 unabhängige Callus-Linien regeneriert werden, aus denen 35 Pflanzen entstanden. Dies entspricht einer Transformationsrate von 3,3%. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über diese Experimente.

Die Übertragung der T-DNA wurde mittels PCR ermittelt, wobei Primer für *bar* und für das *cw*-Element verwendet wurden. Alle getesteten Pflanzen wiesen eine starke Bande korrekter Größe für *bar* auf, die Bande für *cwEn* konnte deutlich nur in einer Pflanze nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden sowohl die Primärtransformanten als auch einige T1-Nachkommen durch Eintauchen von Blättern bzw. Einsprühen ganzer Pflanzen mit einer 0,1%igen Herbizidlösung auf Resistenz gegen Basta untersucht. Alle aufgrund der PCR als positiv identifizierten Pflanzen erwiesen sich als resistent.

### 4.2.4 autonomes Element: *En/Spm*

Für das autonome *En*-Element ergaben sich aus 1641 Embryonen 37 unabhängige Callus-Linien, aus denen 62 Pflanzen regeneriert wurden. Dies entspricht einer Transformationsrate von 2,3%. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht über die mit *En* durchgeführten Experimente.

Auch für dieses Element wurden die putativ transgenen Pflanzen molekular über PCR analysiert. Es wurden Primer für *bar* und *En* verwendet. Die Primer für das *En*-Element waren die selben, die auch für das *cwEn*-Element verwendet worden waren, da sich beide Elemente nur in den terminal inverted repeats unterscheiden, intern jedoch identisch sind. Mit wenigen Ausnahmen erwiesen sich alle getesteten Pflanzen als positiv für beide Gene. Zusätzlich wurden sowohl Primärtransformanten als auch deren Nachkommen auf BASTA-Resistenz untersucht.

Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Konstrukt	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	PCR Pflanzen	
					<i>cwEn</i>	<i>bar</i>
75	60	<i>cwEn-bar</i>	5	-	-	-
82	36	"	1	-	-	-
85	40	"	3	-	-	-
88	48	"	2	-	-	-
89	48	"	1	-	-	-
90	51	"	4	-	-	-
91	50	"	2	-	-	-
94	50	"	11	12: L3P1 - 3 L4P1 - 8 L6P1	-	+
95	50	"	1	-	-	-
96	50	"	3	-	-	-
97	50	"	5	5: L1P1 - 2 L2P1 - 3	-	+
98	50	"	4	-	-	-
99	50	"	2	4: L1P1 - 2 L2P1 - 2	-	+

**Tabelle 8:** Übersicht über die mit *cwEn* durchgeführten Experimente.

Experiment Nummer	Anzahl Embryonen	Konstrukt	Anzahl Callus-Linien	Anzahl Pflanzen	PCR Pflanzen	
					<i>En</i>	<i>bar</i>
5	39	<i>En-bar</i> (Ubi zu <i>En</i> )	2	-	-	-
12	49	"	1	-	-	-
14	44	"	1	8: L1P1 - 8	P1: n.t. P2: + P3: + P4: + P5: - P6: + P8: +	P1: n.t. P2: + P3: + P4: + P5: - P6: + P8: +
18	50	"	3	-	-	-
20	40	"	1	-	-	-
21	40	"	1	-	-	-
32	40	"	2	-	-	-
36	40	"	3	12: L2P1 - 11 L3P1	L2P1 - 11: + L2P4: n.t. L3P1: n.t.	L2P1 - 11: + L2P4: n.t. L3P1: n.t.
37	40	"	9	30: L1P1 - 30	+ außer: P5, 9, 10, 12, 17, 24	+ außer: P5, 9, 10, 12, 17, 24
38	40	"	3	1: L1P1	+	+
39	40	"	1	-	-	-
40	40	"	4	-	-	-
41	37	"	1	9: L1P1 - 9	L1P1 - 9: +	L1P1 - 9: +
45	46	"	3	1: L1P1	L1P1: -	L1P1: -
49	52	"	1	-	-	-
54	50	"	1	1: L1P1	L1P1: +	L1P1: +

**Tabelle 9:** Übersicht über die Ergebnisse der Transformationen mit *En*-Konstrukten

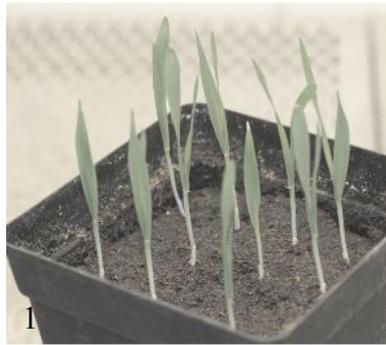
### 4.3 Basta-Test für Pflanzen mit Insertion von *cwEn* und autonomen *En*

Sowohl Primärtransformanten als auch direkte T<sub>1</sub>-Nachkommen dieser Pflanzen wurden auf ihre Resistenz gegen das Herbizid "BASTA" untersucht. Dies diente einerseits dazu, einen zusätzlichen Nachweis zu erhalten, daß die Pflanzen tatsächlich transgen waren, zum anderen sollte die Segregation der Fremdgene in den Nachkommen untersucht werden.

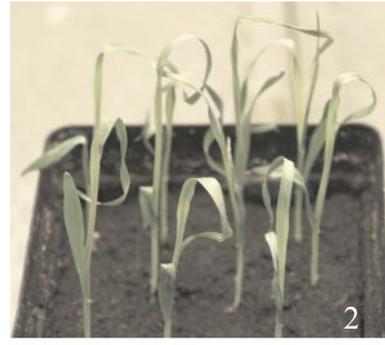
Da aus den Primärtransformanten noch DNA für die molekulare Analyse gewonnen werden sollte, wurden diese Pflanzen nicht mit dem Herbizid besprüht. Es wurden einzelne Blätter gekennzeichnet und in die 0,1%ige Herbizidlösung eingetaucht, wobei auf eine vollständige Benetzung der Blattoberfläche geachtet wurde. Bei jungen Pflanzen mit weicher Blattoberfläche war ein Effekt nach 1 – 2 Tagen sichtbar, bei älteren Pflanzen konnte erst nach 3 – 4 Tagen eine eindeutige Aussage getroffen werden. Blätter nicht-resistenter adulter Pflanzen trocknen ein, Blätter junger Pflanzen verfärben sich ausserdem gelb.

Um die Nachkommenschaft der Primärtransformanten auf Segregation der T-DNA-Konstrukte zu untersuchen, wurden jeweils 10 Samen aus 15 verschiedenen Linien in Erde ausgekeimt und mit einer 0,1%igen Herbizidlösung besprüht. Da dies in einem jungen Stadium geschah, war die Unterscheidung zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen eindeutig zu treffen: bei nicht-transgene Pflanzen trockneten nach 1 – 2 Tagen zunächst die Blattenden ein, nach weiteren 2 Tagen waren diese Pflanzen vollständig abgestorben.

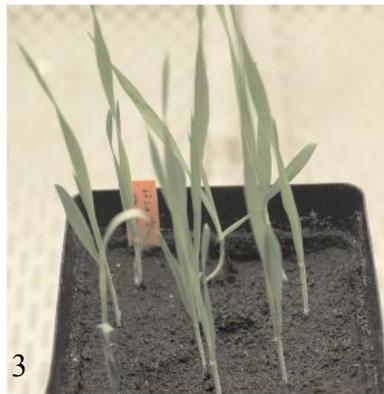
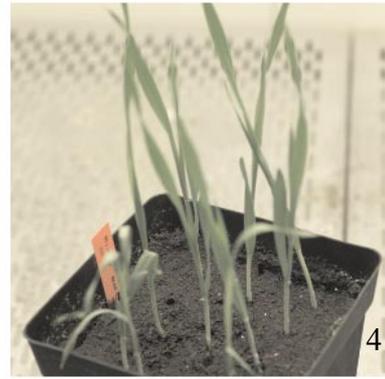
Das Ergebnis dieses "Sprühtests" ist in Abbildung 19 und in Tabelle 10 dargestellt. Als Kontrolle wurden Samen einer Wildtyppflanze verwendet.



Wildtyp vorher



Wildtyp nachher

67L1P2  
(Excisionsreporter)99L1P1  
(*cwEn*)36L2P5  
(*En*)37L1P1  
(*En*)

**Abbildung 21:** Segregationsanalyse ausgewählter T1-Nachkommen durch Besprühen mit dem Herbizid Basta. In Abb. 1 und 2 sind Wildtyppflanzen vor und 2 Tage nach dem Besprühen gezeigt. Geschädigte Blatt-Teile sind bereits abgestorben, nach etwa 5 Tagen waren die Pflanzen vollständig abgestorben.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über alle durchgeführten Sprühtests:

Linie	Konstrukt	Anzahl Pflanzen	resistent	Nicht-resistent	hypothetisches Verhältnis
<b>Wildtyp</b>	-	10	0	10	-
<b>14L1P6</b>	<i>En</i>	10	7	3	3 : 1
<b>36L2P5</b>	<i>En</i>	11	10	1	15 : 1
<b>37L1P1</b>	<i>En</i>	10	8	2	3 : 1
<b>38L1P2</b>	<i>En</i>	7	7	0	15 : 1
<b>41L1P8</b>	<i>En</i>	9	8	1	15 : 1
<b>45L1P1</b>	<i>En</i>	8	7	1	3 : 1
<b>54L1P1</b>	<i>En</i>	10	8	2	3 : 1
<b>67L1P2</b>	<i>35S6078gus</i>	10	9	1	15 : 1
<b>94L3P5</b>	<i>cw</i>	10	9	1	15 : 1
<b>94L4P2</b>	<i>cw</i>	10	7	3	3 : 1
<b>94L5P1</b>	<i>cw</i>	10	9	1	15 : 1
<b>94L6P1</b>	<i>cw</i>	8	8	0	15 : 1
<b>97L2P1</b>	<i>cw</i>	10	6	4	3 : 1
<b>99L1P1</b>	<i>cw</i>	8	8	0	15 : 1

**Tabelle 10:** "BASTA"-Sprühtest zur Segregationsanalyse. Da sich die Blüten der Kultur-Gerste zur Bestäubung nicht öffnen, gehen die resultierenden T<sub>1</sub>-Nachkommen aus einer Selbstung hervor.

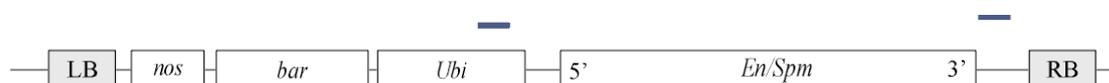
Ein Verhältnis von 3 resistenten zu 1 nicht-resistenten Pflanze zeigt Integration entweder einer einzelnen Kopie oder mehrerer Kopien am gleichen Locus bzw. in enger Kopplung, die daher nicht unabhängig segregieren.

Ein Verhältnis von annähernd 15:1, wie dies in den Linien 36L2P5, 41L1P8, 67L1P2, 94L3P5 und 94L5P1 auftrat, spricht für die Integration von mindestens zwei T-DNA Kopien, die auf zwei verschiedenen Chromosomen integriert wurden. Dies gilt auch für jene Linien, die vollständige Resistenz gegen das Herbizid zeigen, da eine Anzahl von 10 Individuen nicht ausreicht, um diese von solchen Integrationsereignissen zu unterscheiden, bei denen mehr als 2 Kopien auf verschiedenen Chromosomen integriert wurden.

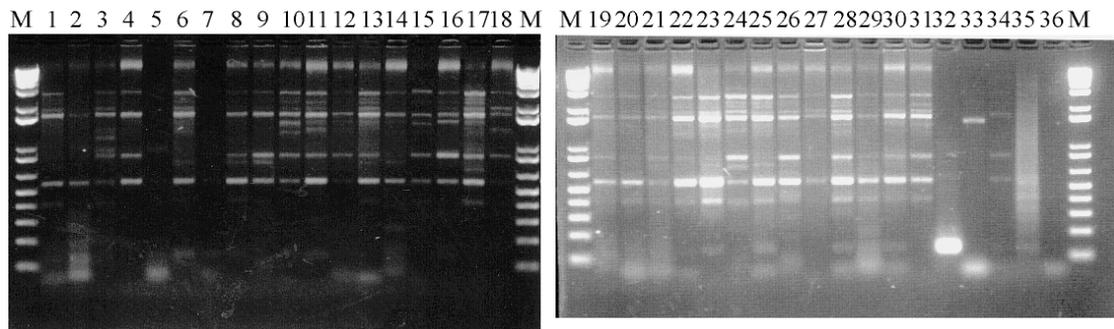
#### 4.4 PCR-Footprint-Analyse

Um Excision des autonomen *En*-Elementes feststellen zu können, wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Die Excision eines Transponierbaren Elementes verursacht kleine Insertionen bzw. Deletionen an der Excisionsstelle. Anhand dieser typischen Sequenzveränderungen läßt sich die Excision von *En/Spm* nachweisen, indem die entsprechende durch PCR-Produkt aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert wird.

Die Primer für diese Analyse wurden so gewählt, daß ein Fragment von 150 bp nur dann entstehen konnte, wenn *En* transponiert war.



**Abbildung 19:** Lage der Primer für die Footprint-Analyse



**Abbildung 20:** PCR-Footprint-Analyse transgener Pflanzen, die das *En*-Element enthalten. Die Primer Foot Ubi und RB4 erzeugen nur nach Transposition von *En* ein Fragment von 150 bp. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Plasmid-Konstrukt verwendet, dem das *En*-Element fehlt. M = Marker

Folgende Pflanzen wurden für diese Analyse verwendet:

1. 14L1P2	8. 36L2P1	19. 41L1P1	29. 38L1P1
2. <b>P3</b>	9. P2	20. P2	30. <b>45L1P1</b>
3. P4	10. <b>P3</b>	21. P3	31. 54L1P1
4. P5	11. <b>P5</b>	22. P4	32. Positivkontrolle
5. P6	12. P6	23. <b>P5</b>	33. Negativkontrolle
6. <b>P7</b>	13. P7	24. P5	34. Wildtyp-Kontrolle
7. P8	14. P8	25. <b>P6</b>	35. Negativkontrolle2
	15. P9	26. P7	36. Wasserkontrolle
	16. P10	27. P8	
	17. P11	28. <b>P9</b>	
	18. P11		

In mindestens 8 Pflanzen (14L1P3 und P7; 36L2P3 und P5; 41L1P5, P6 und P9; 45L1P1) trat eine Bande der erwarteten Grösse auf. Es war jedoch in weiteren PCR-Versuchen nicht möglich, dieses Ergebnis zu reproduzieren. Es kann aufgrund dieses Ergebnisses keine Aussage darüber getroffen werden, ob *En* in Gerste transponiert.

---

## Diskussion

### 1. Etablierung der Transformationsmethode

#### 1.1. Voraussetzungen und Gegebenheiten für Gewebekultur und Transformation

Grundvoraussetzung für jede erfolgreiche stabile Transformation ist ein effizientes Gewebekultur-System. Ein solches System war in der Arbeitsgruppe bereits etabliert, da bereits vor Beginn dieser Arbeit transgene Gerstepflanzen durch Partikeltransformation erzeugt worden waren. Von diesem gut etablierten System sollte in dieser Arbeit so wenig wie möglich abgewichen werden.

Aus diesem Grund wurden vor der Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* die Embryonen halbiert, statt wie im Protokoll von Tingay et al. die embryonale Achse vom intakten, nicht halbierten Embryo mit einem Skalpell zu entfernen.

Beide Maßnahmen dienen dazu, ein Auskeimen des Embryos auf dem Medium zu verhindern, weil dadurch das Gewebe des Skutellums, das ja normalerweise der Ernährung des Embryos dient, von dem aber in der Gewebekultur die Callus-Bildung ausgeht, verbraucht würde. Durch Längshalbieren der Embryonen (siehe Abbildung 4) wurden Sproß- und Wurzelmeristem zerstört und ein Auskeimen konnte effektiv verhindert werden. Dennoch auskeimende Sproß- und Wurzelansätze konnten problemlos nach der Ko-Kulturphase mit *Agrobacterium* beim Überführen der halbierten Embryonen auf Selektionsmedium mit einer spitzen Pinzette entfernt werden.

Das "Zeitfenster", in dem sich die Embryonen in einem für die Transformation optimalen Zustand befinden, ist relativ kurz (etwa 5 – 7 Tage). Vorher und nachher entwickelt sich nur wenig transgener Callus, der in den meisten Fällen auch keine Pflanzen regeneriert. Dies konnte in vielen Transformations-Ansätzen bestätigt werden, bei denen sich eine Häufung in Bezug auf Callus- und Pflanzenregeneration zeigt. Die zuerst von den Spenderpflanzen geernteten Embryonen waren dabei wahrscheinlich noch zu jung. Anschließend folgen einige Tage, in denen sich die

Embryonen in einem besonders geeignetem Stadium zu befinden scheinen, denn während dieser Zeit konnte in fast jedem Ansatz transgener Callus und auch Pflanzen regeneriert werden. Danach folgten Experimente, in denen zwar noch Callus – wenn auch wesentlich weniger als zuvor – aber keine Pflanzen mehr entstanden. Wurden über diesen Zeitpunkt hinaus noch weitere Embryonen geerntet, so entwickelte sich aus diesen in der Regel kein Callus mehr. Nur sehr selten konnten aus solchen Callus-Linien noch grüne Pflanzen regeneriert werden, die aber schlecht oder überhaupt nicht bewurzelten. Ausserdem traten während dieser Zeit verstärkt Albino-Pflanzen auf. Dies spricht sehr stark dafür, daß die Embryonen nur für einen kurzen Zeitraum "transformations-kompetent" sind. Es macht daher keinen Sinn, zu viele Spenderpflanzen gleichzeitig anzuziehen, vielmehr sollte die Anzucht "gestaffelt" erfolgen, um immer genügend Material zur Verfügung zu haben, das sich im erwünschten Zustand befindet.

Dieses "Zeitfenster" gilt ebenso für die Gewebekultur. Transgener Callus entwickelte sich in der Regel 3 – 6 Wochen nach Abschluß der Ko-Kultivation. Aus diesem Callus konnten in der Regel grüne Pflanzen regeneriert werden, die schnell bewurzelten.

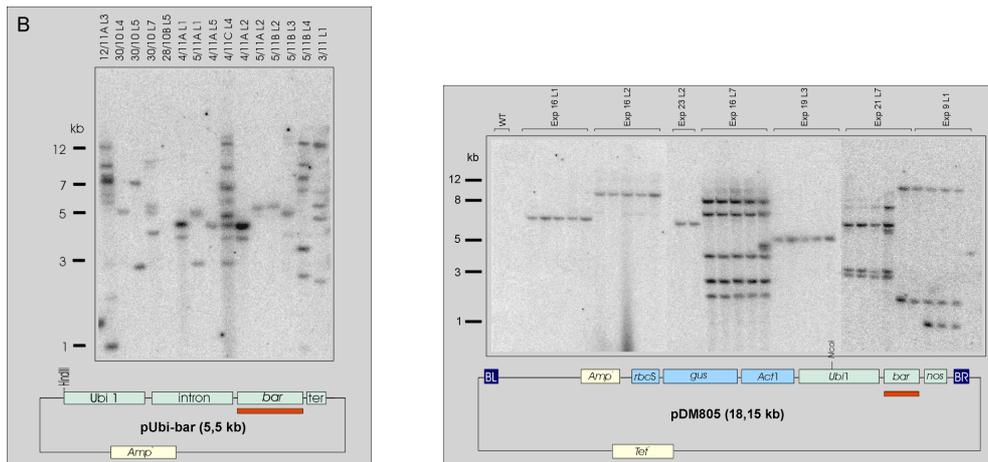
Hin und wieder bildete sich auch nach längerer Gewebekultur noch Callus. Auf diesem entstanden zwar noch somatische Embryonen, die unter Licht auch zu Pflanzen auskeimten, die aber meist nicht oder nur sehr schlecht bewurzelt werden konnten. Diese Pflanzen starben nach Auspflanzen in Erde zumeist ab. Zudem entstanden aus solchem Callus vermehrt Albino-Pflanzen, die nicht weiter verwendet wurden.

Dauert die Gewebekulturphase zu lange, sammeln sich somatische Mutationen an, welche die Regeneration grüner, fertiler Pflanzen verhindern. Dies bedeutet einerseits, daß generell weniger Pflanzen regeneriert werden können, andererseits aber auch, daß vermehrt abnorme Pflanzen auftreten. So kommt es häufiger zur Regeneration von Albinos oder nicht-fertilen, teils haploiden Pflanzen (Lemaux et al., 1999; Wan und Lemaux, 1994)

## 1.2 Agrotransfer versus *particle bombardment*

Vor Beginn dieser Arbeit war in der Arbeitsgruppe bereits die sogenannte "biolistische" Methode zur Transformation von Gerste etabliert, bei der auf Goldkugeln präzipitierte Plasmid-DNA mit Überdruck in das Zielgewebe eingebracht wurde. Dabei wurde eine Ko-Transformation mit zwei Plasmiden durchgeführt, von denen eines eine der Komponenten für das Zwei-Komponenten-System trug, das andere das Selektions-Gen (hier: *bar*). Dies konnte zur Regeneration von Pflanzen führen, die zwar das Selektions-Gen *bar*, nicht aber das erwünschte Element des Zwei-Komponenten-Systems enthielt. Zudem konnte es durch die Größe der Konstrukte zu Fragmentierung kommen oder es wurden mehrere Plasmide integriert. Der in Abbildung 21 dargestellte Southern-Blot von T<sub>0</sub>-Pflanzen (Primärtransformanten), die mittels *particle bombardment* erzeugt wurden, zeigt, daß viele der Linien sehr komplexe Integrationsmuster aufweisen, die durch Fragmentierung bzw. multiple Integrationen von Plasmiden entstanden. Viele der regenerierten Pflanzen enthielten aus diesen Gründen das gewünschte Element des Zwei-Komponenten-Systems entweder überhaupt nicht, oder unvollständig und daher in funktionsloser Form.

Im Vergleich dazu zeigen die T<sub>1</sub>-Pflanzen, die mittels *Agrobacterien*-Transformation entstanden, wesentlich einfachere Integrationsmuster (siehe Abbildung 21). Über die Hälfte der untersuchten Linien weisen Einzel-Integrationen auf, die anderen zwischen 2 und 5 T-DNA-Integrationen. Es kann also davon ausgegangen werden, daß es durch die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* möglich ist, eine große Anzahl transgener Pflanzen zu erzeugen, die in der überwiegenden Mehrheit entweder Einzel-Integrationen oder Integrationen mit wenigen T-DNAs aufweisen.



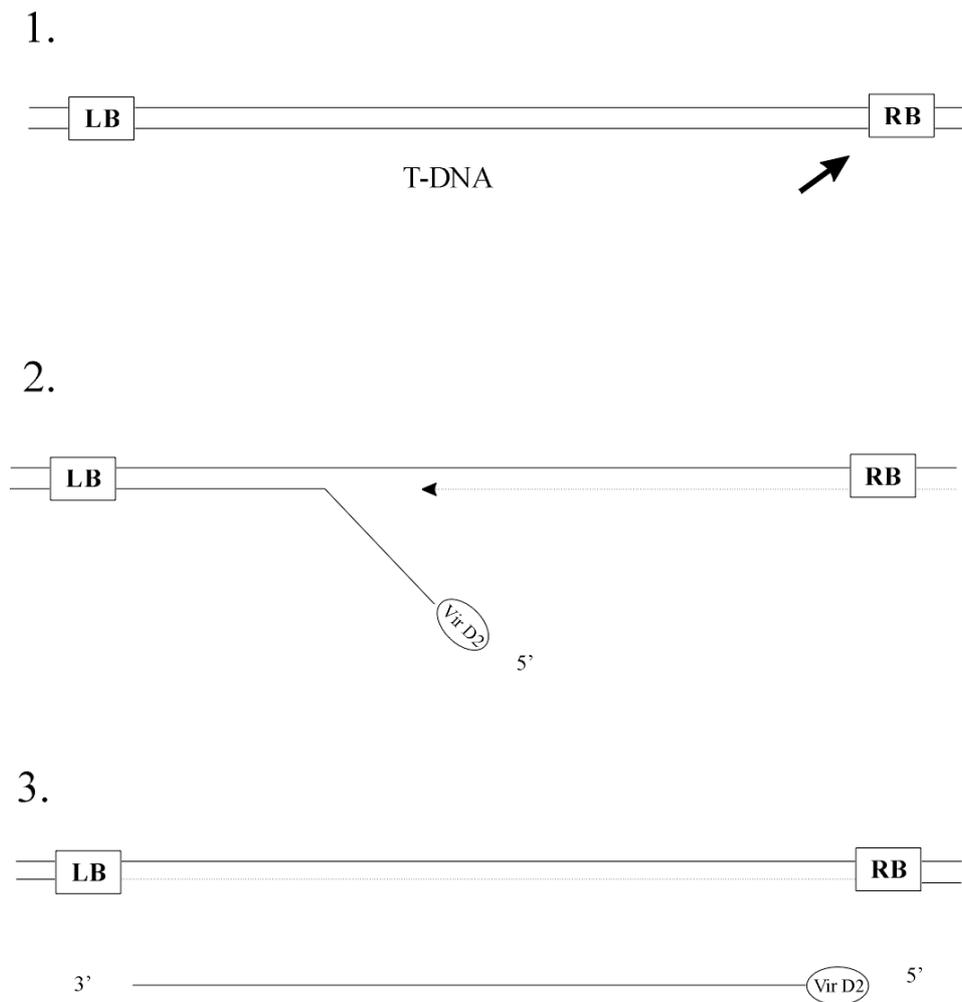
**Abbildung 21:** Southern Analyse von T<sub>0</sub>-Pflanzen aus "particle bombardment". Als radioaktiv markierte Sonde wurde ein SalI-Fragment aus dem *bar*-Gen verwendet. Daneben ein Southern-Blot von T<sub>1</sub>-Pflanzen (direkte Nachkommen der Primärtransformatanten) aus *Agrobacterien*-Transformation.

### 1.3 T-DNA-Transfer und Konsequenzen für die Klonierung der Konstrukte

Der große Vorteil der Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* besteht darin, daß die Größe der zwischen der Rechten und Linken Grenze der T-DNA befindlichen DNA für die Effizienz des Transfers keine Rolle spielt. Dadurch war es möglich, daß sich die gewünschte Komponente und das Selektions-Gen auf der selben T-DNA befanden, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß transgene Pflanzen beide übertragenen Gene enthalten.

Allerdings mußte auf die Anordnung der beiden Gene geachtet werden, da der Transfer der T-DNA – wie in Abbildung 22 gezeigt - gerichtet von der Rechten zur Linken Grenze verläuft. An der Rechten Grenze wird durch einen Einzelstrangsschnitt der untere T-DNA-Strang freigesetzt (in Schritt 1 durch den Pfeil angedeutet), und durch die gleichzeitig beginnende DNA-Neusynthese freigesetzt (Schritt 2). Am 5'-Ende der T-DNA bleibt dabei das VirD2-Protein kovalent gebunden. Ist die Rechte Grenze mutiert oder deletiert, kann der Vorgang nicht gestartet werden und ein

Übertragung von T-DNA findet nicht statt. Eine Deletion bzw. Mutation der Linken Grenze hat nur einen geringen Einfluß auf die Übertragung der T-DNA. So kann es zur Übertragung einer unvollständigen T-DNA kommen, wenn die Freisetzung des T-DNA-Stranges vorzeitig terminiert wird (Hooykaas und Schilperoort, 1992).



**Abbildung 22:** Freisetzung der einzelsträngigen T-DNA (Hooykaas und Schilperoort, 1992). Am 5'-Ende der T-DNA kovalent gebunden das VirD2-Protein.

Um nun eine vollständige Übertragung von T-DNA-Konstrukten zu gewährleisten, muß das jeweilige Selektions-Gen an die Linke Grenze der T-DNA platziert werden, weitere zu übertragene Gene hingegen an die Rechte Grenze. Auf diese Weise werden

falsch-positive Pflanzen vermieden, die zwar die den Selektionsmarker, nicht aber das gewünschte Gen enthalten.

Mit dem Vektor pDM805, bei dem sich *bar* an der Rechten Grenze und *gus* an der Linken Grenze befinden, kam es in einigen Fällen zu solch falsch-positiven Pflanzen, die zwar *bar*-positiv, aber *gus*-negativ waren. So zeigen die in Abbildung 15 gezeigten Linien 18L1 und 16L1 im Southern-Blot zwar Hybridisierung mit der *bar*-Sonde, nicht aber mit der Sonde für *gus*. Gleichzeitig war auch die histochemische Färbung negativ. Bei der Linie 16L1 fällt zudem auf, daß die Bande für *bar* wesentlich kleiner ist, als die erwartete Bande für ein vollständiges Konstrukt.

Auch bei Übertragung mehrerer Konstrukte kam es vor, daß eines davon sich als unvollständige Kopie erwies. Das Hybridisierungsmuster für die Linie 9L1-5 läßt darauf schließen, daß es zur Übertragung mindestens einer vollständigen und zusätzlich einer unvollständigen Kopie gekommen war, bei der *gus* fehlt. So zeigt der Southern mit der Sonde für *gus* nur die Banden im oberen Bereich, nicht aber die deutliche zusätzliche Bande im unteren Bereich, während die Sonde für *bar* eine deutliche zusätzliche Bande aufweist, die zudem in ihrer Größe dem *bar*-Gen entspricht. Das Segregationsmuster (Southern-Blot Abbildung 12) spricht dafür, daß sich beide Kopien auf dem gleichen Chromosom befinden.

#### **1.4 Klonierung der Konstrukte für das super-binäre Hybrid-Vektorsystem**

Aufgrund des gerichteten T-DNA-Transfer-Mechanismus wurden die Konstrukte für das super-binäre Hybridsystem so hergestellt, daß das Transposon sich an der Rechten und das *bar*-Gen an der Linken Grenze der T-DNA befand. Auf diese Weise sollten die "falsch-positiven" Pflanzen, die mit dem Konstrukt pDM805 durchaus aufgetreten waren, ausgeschlossen werden.

Allerdings konnte auch auf diese Weise eine fehlerhafte Übertragung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es kam in einem Fall zu einer unvollständigen Übertragung eines Konstruktes, bei dem dem das *dSpm*-Element fehlte. Der Southern-

Blot zeigte keine Hybridisierung mit der Sonde für *dSpm*, eine Bande für *bar* war zwar vorhanden, aber in einer Größe, die ein Fehlen des *dSpm*-Elementes nahelegt. Dieser Vorgang kann am einfachsten durch ein Rekombinationsereignis erklärt werden.

## 1.5 Ermittlung einer effizienten Transformations-Methode

Verwundete dicotyle Pflanzen produzieren niedermolekulare phenolische Substanzen wie z.B. Acetosyringon, das von *Agrobacterium tumefaciens* wahrgenommen wird und zum aktiven Auffinden einer geeigneten Pflanze dient. Gerste gehört, wie alle monocotylen Pflanzen, nicht zum natürlichen Wirtsspektrum von *Agrobacterium tumefaciens* und produziert auch keine als Lockstoff geeignete Substanz.

In verschiedenen Versuchsansätzen sollte zunächst ermittelt werden, ob eine Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Acetosyringon sich positiv auf die Transformationsrate auswirkt. In den ersten 9 Experimenten entstand transgener Callus nur in einem einzigen Ansatz, dem Acetosyringon zugesetzt worden war. In weiteren Experimenten entstanden putativ transgene Calluslinien sowohl in Ansätzen mit als auch ohne die Zugabe von Acetosyringon, dort allerdings mit einer etwas niedrigeren Frequenz. Weil nicht genügend Experimente durchgeführt werden konnten, um einen genauen Zusammenhang zu belegen, wurde die Zugabe von Acetosyringon in der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  beibehalten.

### 1.5.1 Verwundung der Embryonen durch Partikelbeschuss

In weiteren Versuchsansätzen sollte ermittelt werden, ob eine Verwundung der Embryonen durch Partikelbeschuss eine positive Auswirkung auf die Transformationsrate hat. Daher wurden die Embryonen – wie im Protokoll von Tingay *et al.* angegeben – mit Goldpartikeln ohne DNA beschossen. Dabei zeigte sich, daß in Versuchsansätzen, in denen die Embryonen nicht beschossen worden waren, mehr putativ transgene Callus-Linien entstanden, als in Ansätzen mit Beschuss. In der Folge wurden daher alle weiteren Experimente ohne Partikelbeschuss durchgeführt.

Der Partikelbeschuß dient dazu, eine Verwundung zu erzeugen, die den *Agrobacterien* das Eindringen in das Zielgewebe ermöglichen. Allerdings wurden in dieser Arbeit die Embryonen – abweichend vom Protokoll von Tingay et al.- längs halbiert und nicht lediglich die embryonale Achse aus dem intakten Embryo entfernt.. Damit wurde nicht nur das Auskeimen der Embryonen auf dem Medium verhindert. Sondern auch eine grosse Wundfläche erzeugt. Offensichtlich stand den Bakterien so eine genügend große Eintrittsfläche in das Zielgewebe zur Verfügung. Eine zusätzliche Verwundung durch Partikelbeschuß führte möglicherweise zu einer Gewebeerstörung, so daß viele Embryonen vor der Infiltration mit *Agrobacterium* wahrscheinlich bereits so stark geschädigt waren, daß sie abstarben. Dies war in der Regel bereits nach der Ko-Kultivationsphase sichtbar: abgestorbenes Gewebe ist weich und glasig-transparent, lebendes Gewebe fest und weißlich-gelb.

### 1.5.2 Vakuum-Infiltration und Verwundung der Embryonen

Es konnte gezeigt werden, daß sich eine 1 – 2 minütige Vakuum-Infiltration des Zielgewebes negativ auf die Regeneration transgener Callus-Linien auswirkte. Zum einen war es in vielen Fällen nicht möglich, die Ansätze steril zu halten, obwohl Infiltrations-Versuche immer im mit Ethanol sterilisierten Excikator bzw. der particle gun unter einer Sterilbank durchgeführt wurden. Da die Ko-Inkubation mit *Agrobacterium* mindestens 2 Tage betrug, mußten viele Ansätze wegen Kontamination verworfen werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß die Transformationsrate höher war, wenn keine Vakuum-Infiltration durchgeführt wurde. Es wurden mehr transgene Callus-Linien regeneriert, aus denen in der Regel auch Pflanzen entstanden.

Die ursprüngliche Idee bestand darin, die *Agrobacterien* durch die Vakuum-Infiltration tiefer in das Gewebe einzubringen und auf diese Weise die Verwundung durch *particle bombardment* zu ersetzen. Wahrscheinlich wurde allerdings das Gewebe durch die Vakuum-Infiltration zu stark geschädigt, so daß eine Callus-Induktion nicht oder nur in geringem Ausmaß möglich war. In späteren Experimenten konnte ausserdem gezeigt werden, daß die durch Längs-Halbierung der Embryonen

erzeugte Wundfläche für ein ausreichendes Eindringen der *Agrobacterien* ausreichend war.

### 1.6 Nachweis von *Agrobacterium* über Färbereaktion

Hin und wieder treten in Kulturen von *Agrobacterium tumefaciens* Kontaminationen durch Hefen auf. Dies wird zum Problem, weil die Hefen in der Regel die selben Wachstumsbedingungen bevorzugen, ebenso schnell wie *Agrobacterium*-Kolonien wachsen und im Aussehen schwer von ihnen zu unterscheiden sind. Eine zuverlässige Unterscheidung von *Agrobacterien* und Hefen ist nur mikroskopisch möglich.

Zusätzlich sollte sichergestellt werden, daß es sich bei Kolonien, die aus DNA-Transfer über *tri parental mating* entstanden waren, um *Agrobacterien* handelte und nicht um den Donor- bzw. Überträger-Stamm. Hier erwies sich eine mikroskopische Unterscheidung als schwierig.

Ein zuverlässiger Nachweis von *Agrobacterium* ist das Ausplattieren auf Lactosehaltigem Medium, Inkubation bei 28 °C über Nacht und anschließender Färbung mit Benedicts-Reagenz. Nur *Agrobacterium* ist in der Lage, die im Medium enthaltene Lactose zu 3-Ketolactase zu oxidieren. Daher wurde dieser Test routinemäßig bei neuen Stämmen und nach Transformations von *Agrobacterium* über *tri parental mating* oder Elektroporation durchgeführt. In keinem Fall wurden Kontrollen mit Hefen oder *E.coli* angefärbt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme zeigten die in Abbildung 3 gezeigte starke Farbreaktion bereits nach wenigen Minuten.

### 1.7. Analyse der Pflanzen mit Konstrukten für *cwEn* und *En*

Pflanzen, die mit Konstrukten für *cwEn* und *En* transformiert worden waren, wurden mittels PCR mit internen Primern für das jeweilige Konstrukt und für *bar* untersucht. Es wurden nur solche Pflanzen als positiv gewertet, die in mindestens 2 PCR-Reaktionen eine deutliche Bande aufwiesen. Zudem wurden alle regenerierten Pflanzen auf ihre Resistenz gegen Basta untersucht, indem Blätter markiert und in eine 0,1%ige Herbizidlösung eingetaucht wurden. Alle aufgrund der PCR als positiv bezeichneten T<sub>0</sub>-Pflanzen erwiesen sich als resistent gegen das Herbizid.

Mit diesen Pflanzen wurde dann eine weitere PCR-Analyse durchgeführt, um Excision von *En* zu zeigen. Die Ergebnisse dieser Footprint-PCR legen nahe, daß *En* nicht aktiv ist. Mögliche Gründe könnten sein:

1. Die übertragenen Konstrukte sind in dem Bereich, der *En* enthält, defekt
2. Die Konstrukte sind aufgrund von C-Methylierung inaktiv

Da die PCR-Analyse mit internen Primern durchgeführt wurde, kann daraus keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, ob die übertragenen Transposon-Elemente tatsächlich intakt sind. Dies könnte nur durch eine Southern-Analyse genomischer DNA geklärt werden. Ob C-Methylierung zur Inaktivierung der übertragenen Konstrukte geführt hat, könnte durch Analyse mit methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen untersucht werden. Auch Kreuzen von Pflanzen, in denen das *En*-Element nachgewiesen wurde, mit solchen Pflanzen, die ein Reporterkonstrukt enthalten, würde Aufschluß über die Aktivität von *En* und damit auch auf vollständige Übertragung intakter T-DNA-Konstrukte geben.

## Literatur

Ballas N. and Citovsky, V. (1997) Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 10723 – 10728

Bernaerts M., J. and De Ley, J. (1963) A Biochemical Test for Crown Gall Bacteria. Nature **197**: 406 – 407

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Acids Res. **7**: 1513 – 1523

Boulton, M. I., Buchholz, W. G., Marks, M. S., Markham, P. G. and Davies J. W. (1989) Specificity of *Agrobacterium*-mediated delivery of maize streak virus DNA to members of the Gramineae. Plant Mol Biol **12**: 31 – 40

Boyer, S., Cashmore, A.M., and Wilkins, B.M. (1969) A Complementation Analysis of the Restriction and Modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **41**: 459 – 472

Bullock W. O., Fernandez, J. M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming rec A *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. Biotechniques **5**: 376 - 379.

Casadaban, M. J. and Cohen, S. N. (1980) Analysis of gene-control signals by DNA-fusion and cloning in *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology **138** (2): 179 – 207

Castle, L. A. and Morris, R. O. (1994) Transient expression assays using GUS constructs and fluorometric detection for analysis of T-DNA transfer. Plant Molecular Biology Manual **B5**: 1 – 16

Chilton, M.-D. (1993) *Agrobacterium* gene transfer: Progress on a "poor man's vector" for maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 3199 – 3120

De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu M. and Depicker A. (1997) T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. Plant Journal **11** (1): 15 – 29

DeBlock, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Thoen, C., Gossele, V., Movva, N. R., Thompson, C., VanMontagu, M. and Leemans, J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO **6** (9): 2513 – 2518

Ebert, P. and An, G.: *Agrobacterium* Plasmid DNA Miniprep.  
[www.arabidopsis.org/comguide/chap\\_3\\_dna\\_techniques/11\\_agro\\_plasmid\\_miniprep.html](http://www.arabidopsis.org/comguide/chap_3_dna_techniques/11_agro_plasmid_miniprep.html)

Feinberg A. P. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA

restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6 – 13

Figurski D. H. and Helinski D. R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (4) 1648 – 1652

Frey, M., Stettner, C. and Gierl, A. (1998) A general method for gene isolation in tagging approaches: amplification of insertion mutagenised sites (AIMS). *Plant Journal* **13** (5): 717 – 721

Gelvin, S. B. and Liu, C.-N. (1994) Genetic manipulation of *Agrobacterium tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant plant species. *Plant Molecular Manual* **B4**: 1 – 13

Gierl A. and Frey M. (1991) Eukaryotic transposable elements with short terminal inverted repeats. *Current Opinion in Genetics and Development* **1**: 494 – 497

Gierl A. and Saedler H. (1992) Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol Biol* **19**: 39 – 49

Gierl, A. (1990) How maize transposable elements escape negative selection. *Trends in Genetics* **6** (5): 155 – 158

Golds, T. J., Davey, M.R., Rech, E. L. and Power, J. B. (1990) Methods of Gene Transfer and Analysis in Higher Plants. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6; Pollard, J.W., Walker, J.M. (Hrsg.) pp 341 - 371. Humana Press.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Microbiology* **166** (4): 557 – 580

Hiei, Y., Komari, T. and Kubo, T. (1997): Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* **35**: 205 - 128

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* **6** (2) 271 - 282

Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooymaas, P. J. J. and Schilperoort R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179 – 181

Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene-transfer to plants. *Transgenic Research* **2** (4): 208 – 218

Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton M.-D. (1986) The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology* **168** (3): 1291 – 1301

Hooymaas P. J. J. and Mozo T. (1994) *Agrobacterium* molecular genetics. *Plant Molecular Biology Manual* **B3**: 1 – 9

- Hooykaas P. J. J. and Schilperoort, R. A. (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* **19**: 15 – 38
- Janssen B.-J. and Gardner R. C. (1989) Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol* **14**: 61 – 72
- Knauf, V. C. and Nester E. W. (1982) Wide Host Range Cloning Vectors: A Cosmid Clone Bank of an *Agrobacterium* Ti Plasmid. *Plasmid* **8**: 45 – 54
- Komari, T. (1990) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports* **9**, 303 – 306
- Komari, T., Halperin, W. and Nester, E. W. (1986) Physical and Functional Map of Supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* Tumor-Inducing Plasmid pTiBo542. *Journal of Bacteriology* **166** (1) 88 – 94
- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* **10** (1): 165 – 174
- Laufs J., Wirtz, U., Kammann, M., Matzeit, V., Schaefer, S., Schell, J., Czernilofsky, A. P., Baker B. and Gronenborn B. (1990) Wheat dwarf virus Ac/Ds vectors: Expression and excision of transposable elements introduced into various cereals by a viral replicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7752 – 7756
- Lazo, G. R., Stein, P. A. and Ludwig, R. A. (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology* **9**: 963 - 967.
- Lemaux, P., Cho, M.J., Zhang, S. and Bregitzer, P. (1999) Transgenic Cereals: *Hordeum vulgare* L. (barley) in: *Molecular Improvement of Cereal Crops*: 255 – 316
- Martienssen, R. A. (1998) Functional genomics: Probing plant gene function and expression with transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2021 – 2026
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J., Hohn, B. and Koncz C. (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO* **10** (3) 697 – 704
- Pereira, A., Cuypers, H., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z. and Saedler H. (1986) Molecular analysis of the *En/Spm* transposable element system of *Zea mays*. *EMBO* **5** (5): 835 – 841
- Sambrook, J. and Russel D. W. (2001) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S. and Brettell, R.

- (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal* **11**(6), 1369 – 1376
- Tinland, B. (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science* **1** (6) 178 – 183
- Walkerpeach, C. R. and Velten J. (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. *Plant Molecular Biology Manual* **B1**: 1 – 19
- Wan, Y. and Lemaux, P.(1994) Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants. (1994) *Plant Physiol.* **104**: 37 – 48
- Yadav, N. S., Vanderleyden, J., Bennett, D.R., Barnes, W.M. and Chilton, M. D. (1982) Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6322 – 6326
- Yanisch-Perron C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors. *Gene* **33**: 103 – 119
- Zambryski, P. (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 1 – 30
- Zambryski, P. C. (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **43**: 465 – 490
- Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K. and Goodman, H.M. (1982) Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**: 361 – 370
- Ziemienowicz, A., Merkle, T., Schoumacher, F., Hohn, B. and Rossi, L. (2001) Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *Plant Cell* **13**: 369 – 383
- Zupan, J. , Muth, T. R., Draper, O. and Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* **23** (1), 11 – 28
- Zupan, J. R. and Zambryski, P. (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiol* **107**: 1041 – 1047

## **Danksagung**

Ich möchte mich besonders bei Prof. Dr. Alfons Gierl für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, für sein Interesse an diesem Thema und seine Unterstützung durch stete Diskussionsbereitschaft.

Dr. Monika Frey danke ich für wertvolle Tipps und Tricks, wann immer ich diese benötigte.

Besonderer Dank geht an Dr. Timothy Golds für die Idee zu diesem Projekt und die Betreuung meiner Arbeit, für Anregungen, Tipps und Diskussionen ohne Ende. And thank's a lot for the free language course!

Herzlich bedanken möchte ich mich bei "meinen" TAs Petra Göbel und Peter Dobos, nicht nur für tatkräftige Unterstützung und fachlichen Rat, sondern auch für offene Ohren und un-fachliche Gespräche.

Dank auch an alle jetzigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen außerhalb des Gewebekultur-Labors: Hedi Kellner, Woong June Park, Sebastian Grün, Uta von Rad, Richard Münch, Jürgen Klattig, Thilo Fischer, Georg Haberer, Anita Maier, Wolfgang Haupt, Conny Stettner, Albert Winklmaier, Tanja Singer, Uli Genschel, Erich Glawischnig, Simin Erschadi und Sabine Winderl, Regina Hüttl, Gerti Spielbauer, Sabine Merl, Oksana Kortez, Andrea Lohner, Ramon Torres, Roman Radikewicz, Annette Martin und Karolin Schmäzlin. Ohne euch wäre die Zeit nicht halb so schön gewesen!

Vielen Dank auch an meine Praktikanten Christiane, Toby, Matthias, Birgit und Svetlana für ihre tatkräftige Mitarbeit und Hilfe.

Ich widme diese Arbeit in herzlicher Erinnerung meinen Eltern. Danke, daß ihr an mich geglaubt habt!