

Technische Universität München

Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

Transformation von Zierpflanzen: Methoden und Anwendungen

Dirk Börstling

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Müller-Starck

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

2. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel

Die Dissertation wurde am 13.06.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und im Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.09.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Methoden zur Genübertragung	2
1.1.1.	Methoden des direkten Gentransfers	2
A.	Gentransfer durch particle bombardement	2
B.	Elektroporation	3
C.	Mikroinjection	3
D.	Protoplasten	3
1.1.2.	Methoden des indirekten Gentransfers	4
A.	Gentransfer mittels viraler Vektoren	5
B.	Gentransfer mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
B.1.	Ti-Plasmid und Vektoren	7
B.2.	Mechanismus der DNA-Übertragung	8
1.2.	Flavonoide	11
1.2.1.	Bedeutung und Funktion	12
1.3.	Anthocyane	13
1.4.	Biosyntheseweg der Flavonoide	16
1.5.	Pflanzenmaterial	18
A.	Osteospermum	18
B.	Pelargonium	18
C.	<i>Matthiola incana</i>	19
D.	<i>Petunia</i>	19
E.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20
F.	<i>Gerbera hybrida</i>	20
1.7.	Zielsetzung	22
2.	Material und Methoden	24
2.1.	Methoden zur Herstellung für die Transformation geeigneter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stämme	24
2.1.1.	Herstellung kompetenter Bakterien	24
A.	Freeze-thaw Methode	24
B.	Elektroporation	25
2.1.2.	Transformation der Plasmid-DNA	25
A.	Freeze-thaw Methode	25
B.	Elektroporation	26
C.	Triparental Mating	26
2.1.3.	Überprüfung der transformierten <i>Agrobacterien</i>	27
A.	Inkubation mit Lysozym und Proteinase K	27
B.	Überprüfung durch Gesamt-DNA Isolierung	27
C.	Überprüfung durch direkte Plasmid-DNA Isolierung	27
2.2.	Methoden zur Klonierung für die Transformation geeigneter Vektoren	28
2.2.1.	Kultur und Plasmidpreparation von <i>Escherichia coli</i>	28
2.2.2.	Restriktionsverdau und Gelelektrophorese	28
2.2.3.	Gelelution und Ligation	28
2.2.4.	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	28
2.3.	DNA-Extraktion aus pflanzlichem Gewebe	29
2.4.	Methoden zur Gewebekultur	31
2.4.1.	Kulturmedien	31
2.4.1.1.	Kulturmedien <i>Petunia hybrida</i>	32

2.4.1.2.	Kulturmedien <i>Gerbera hybrida</i>	32
2.4.1.3.	Kulturmedien <i>Osteospermum</i>	33
2.4.1.4.	Kulturmedien <i>Pelargonium</i>	33
2.4.1.5.	Kulturmedien <i>Matthiola incana</i>	34
2.4.1.6.	Kulturmedien <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.5.	Transformationsmethoden mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
2.5.1.	Transformation von <i>Petunia hybrida</i>	35
2.5.2.	Transformation von <i>Gerbera hybrida</i>	36
2.5.3.	Transformation von <i>Osteospermum</i>	37
2.5.4.	Transformation von <i>Pelargonium</i>	37
2.5.5.	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.6.	Transiente Genexpression mittels Genkanone	39
2.7.	Analyse von putativ transgenem Pflanzenmaterial	41
2.7.1.	Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität	41
2.7.2.	Standard PCR-Techniken	42
2.7.3.	PCR-Überprüfung der Integration der Fremd-DNA ins Genom	42
2.8.	Inhaltsstoffanalyse und Enzymtests	43
2.8.1.	Extraktion und Analyse der Inhaltstoffe	43
2.8.2.	Nachweis von Enzymaktivitäten	43
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Klonierungen	45
3.1.1.	Klonierungen in Binärvektoren	45
3.1.2.	Klonierungen für die particle gun	49
3.2.	Transformation von <i>Agrobacterium</i> und Überprüfung der Ergebnisse	50
3.2.1.	Transformation von <i>Agrobacterium</i>	50
3.2.2.	Überprüfung der transformierten <i>Agrobacterien</i>	51
3.3.	Ergebnisse zur Transformation der untersuchten Pflanzen	52
3.3.1.	<i>Pelargonium</i>	52
3.3.2.	<i>Gerbera hybrida</i>	56
3.3.3.	<i>Petunia hybrida</i>	57
3.3.3.1.	Gewebekultur	57
3.3.3.2.	Transformationen	58
3.3.3.3.	Biochemische Untersuchung transgener Pflanzen	61
3.3.4.	<i>Osteospermum</i>	63
3.3.5.	<i>Matthiola incana</i>	65
3.3.6.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.4.	Ergebnisse der transienten Genexpression mittels Genkanone	68
4.	Diskussion	71
4.1.	Vektoren und Selektionssysteme	71
4.2.	Einfluß verschiedener <i>A.t.</i> -Stämme auf die Transformation	74
4.3.	Transformationsmethodik	75
4.3.1.	Allgemeiner Transformationsablauf	75
4.3.2.	Spezielle Transformationmethoden	76
4.3.2.1.	<i>Petunia hybrida</i>	76
4.3.2.2.	<i>Gerbera hybrida</i>	77
4.3.2.3.	<i>Osteospermum</i>	78
4.3.2.4.	<i>Matthiola incana</i>	79
4.3.2.5.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81

4.3.2.6.	Pelargonium	82
4.4.	Verwendete Konstrukte	84
4.4.1.	Flavonsynthese II (FNS II)	85
4.4.2.	Das rol C Gen	86
4.4.3.	Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) in Antisense	87
4.4.4.	Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR)	88
4.4.5.	Chalkonreduktase (CHR oder PKR)	89
4.4.6.	Flavonoid 3'- und 3'-5'-Hydroylase	90
4.5.	Weitere Faktoren zur Manipulation der Blütenfarbe	91
4.5.1.	Flavonolsynthese (FLS)	91
4.5.2.	Glutathion S-Transferase (GST)	92
4.5.3.	pH-Wert	93
4.5.4.	Regulatorische Sequenzen	93
4.6.	Blütenarchitektur	95
5.	Zusammenfassung	96
5.1.	Summary	97
6.	Literaturverzeichnis	98
7.	Anhang	112
7.1.	Nährmedien	112
7.2.	Puffer	112
7.3.	Händlerverzeichnis	113

Abbildungsverzeichnis

- Abb.1:** Syntheschema der von *Agrobacterium* als N-Quelle genutzten Aminosäuren, deren Synthese die Expression der auf der T-DNA liegenden und in die pflanzliche Zelle übertragenen Gene erfordert.
- Abb.2:** Schematische Darstellung eines cointegrativen und eines binären Vektors
- Abb.3:** Schematische Darstellung der DNA-Übertragung mit Induktion, Transfer und Integration
- Abb.4:** Flavonoidgrundgerüst mit Bezeichnung der Ringe (A,B,C) und den Orten von Substitutionen
- Abb.5:** Schema der Flavonoidbiosynthese (Coum3H: 4-Cumarsäure 3-hydroxylase, CoumCoAsH: 4-Cumaryl-CoA 3-Hydroxylase)
- Abb.6:** NOS-pro bzw NOS-ter stehen für Promotor und Terminator der Nopalinsynthese. NPT II (Neomycinphosphotransferase II) verleiht eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Der 35S Promotor stammt aus dem Blumenkohlmosaikvirus (*cauliflower mosaic virus*, CaMV). RB und LB bezeichnen die die T-DNA rechts und links eingrenzenden Bordersequenzen, weiterhin sind die zur Klonierung nutzbaren Schnittstellen angegeben (Sst I entspricht Sac I).
- Abb.7:** Schematische Darstellung der T-DNA von pGPTV-KAN, die Beschriftung entspricht der von pBI 121 (s.o.)
- Abb.8:** Schematische Darstellung der T-DNA von pBIN 19, die Beschriftung entspricht der von pBI 121 (s.o.), die MCS besteht aus folgenden Schnittstellen: Hind III, Sal I, Xba I, Bam I, Sma I, Kpn I, Sac I, EcoRI
- Abb.9:** Vergleich verschiedener Plasmid-Isolierungsmethoden aus *A. tumefaciens*

- Abb.10:** Histochemische GUS-Färbung von Blattexplantaten transgener Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle
- Abb.11:** Schematische Darstellung der T-DNA von pGPTV-HPT, die Beschriftung entspricht der von pBI 121 (s.o.)
- Abb.12:** Schematische Darstellung der T-DNA von pGPTV-HPT mit der Promotor-Terminator-Kassette von pGun
- Abb.13:** Schematische Darstellung der T-DNA von pGPTV-HPT mit der Chalkonreduktase unter Kontrolle des 35S-Promotors
- Abb.14:** Regenerierende Petiolen-Explantate von *Gerbera hybrida*
- Abb.15:** Regenerierender Sproß aus auf Selektionsmedium kultiviertem Explantat
- Abb.16:** Vergleich von Blattexplantaten putativ transgener Pflanzen zur Kontrolle nach 8-wöchiger Inkubation auf Selektionsmedium
- Abb.17:** PCR-Überprüfung putativ transgener Pflanzen mit NPT II-Primern
- Abb.18:** PCR-Überprüfung putativ transgener Pflanzen mit FNS-spezifischen Primern
- Abb.19:** Vergleich der Blütenfärbung zwischen der transgenen Linie H12 (GDFR) und der Linie RL 01
- Abb.20:** Inhaltsstoffanalyse der transgenen Pflanze im Vergleich zur Kontrolle. RL01: Kontrollpflanze, H12: Mit GDFR transformierte Pflanze
- Abb.21:** FHT-Enzymtest von Antisense FHT-CC (*Callistephus chinensis*)
- Abb.22:** Regeneration von Sproßexplantaten

Abb.23: Putativ transgener Sproß aus *Osteospermum* Blattexplantaten nach 6-wöchiger Kanamycin Selektion

Abb.24: *A. thaliana* Keimlinge auf Selektionsmedium

Abb.25: Auf Selektionsmedium gekeimter Sproß von *A.thaliana* in Erde überführt

Abb.26: PCR-Überprüfung auf Selektionsmedium gekeimter Pflanzen mit NPT II-Primern

Abb.27: GUS-Assay von beschossenen *M. incana* Petalen

Abb.28: Mit einem ANS-Konstrukt beschossendes *Z spreng.* Blütenblatt

Abb.29: Kontrolle mit leerem Vektor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kulturmedien

Tabelle 2: Gamborg B5-Vitamine

Tabelle 3: Durchschnittliche Sproßbildung an Hypocotyl-Explantaten der untersuchten Sorten auf verschiedenen Medien

Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung	kb:	Kilobasen
ANS:	Anthocyanidinreduktase	KLS:	Kernlokalisierungssignal
BA:	Benzyladenin	kV:	Kilo-Volt
bp:	Basenpaare	LB:	Left border
CHI:	Chalkonisomerase	Lsg:	Lösung
CHR/PKR:	Chalkonreduktase	MCS:	Multy cloning site
CHS:	Chalkonsynthese	µg:	Mikrogramm
cm:	Zentimeter	µl:	Mikroliter
CTAB:	Cethyltrimethylammoniumbromid	ml:	Milliliter
2,4D:	2,4 Dichlorphenolessigsäure	min:	Minute
DC:	Dünnschichtchromatographie	MS:	Murashige & Skoog
DFR:	Dihydroflavonol 4-Reduktase	msec:	Milli-Sekunde
DHK:	Dihydrokämpferol	NAA:	1-Naphthalenessigsäure
DHQ:	Dihydroquercitin	Nar:	Naringenin
DMSO:	Dimethyl-Sulfoxid	ng:	Nano-Gramm
DNA:	Desoxyribonukleinsäure	NOS:	Nopalinsynthase
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>	NPT II:	Neomycinphosphotransferase II
F3'5'H:	Flavonoi 3',5'-Hydroxylase	OD:	Optische Dichte
F3'H:	Flavonoid 3'-Hydroxylase	PCR:	Polymerase Chain Reaktion
FHT:	Flavanon 3-Hydroxylase	PVP:	Polyvinyl-Pyrrolin
FLS:	Flavonolsynthase	RB:	Right border
FNR:	Flavanon 4-Reduktase	RNA:	Ribonukleinsäure
FNS I/II:	Flavonsynthase	<i>rolC/B:</i>	root loci A/B
GA ₃ :	Gibberellinsäure	rpm:	Umdrehungen pro Minute
GFP:	Green Fluresent Protein	SDS:	Sodium-dodecylsulfat
GST:	Glutathioin S-Transferase	Tab.:	Tabelle
GUS:	β-Glucoronidase	T-DNA:	Transfer DNA
h:	Stunde	TDZ:	Thidiazuron
IAA:	Indolylessigsäure	Ti:	Tumor induzierend
IBA:	Indolylbuttersäue	TIBA:	Triiodbenzoesäure
2iP:	2-Isopentenyladenin	z.B.:	zum Beispiel

1. Einleitung

Für die moderne Pflanzenzüchtung spielen seit ca. 20 Jahren neben den klassischen Methoden auch molekularbiologische Ansätze eine immer größere Rolle. Einer der Vorteile dieser neu entwickelten Methoden ist die Überschreitung von Artgrenzen, d.h. man ist nicht mehr wie bei der klassischen Züchtung auf die "Kreuzbarkeit" zweier Arten angewiesen, sondern kann mit gewissen Einschränkungen bestimmte Merkmale über Artgrenzen hinweg übertragen. Weiterhin lassen sich mit Hilfe der Molekularbiologie bestimmte Merkmale genauer charakterisieren und z.B. unter Nutzung von Mutanten die dazugehörigen Gene isolieren. Durch Expression der bekannten Gene in geeigneten Pflanzen ist die Ausprägung eines bestimmten Merkmals auch über Artgrenzen hinweg möglich. Es besteht nun die Möglichkeit, Gene jeden Ursprunges (Prokaryonten, Eukaryonten) in Pflanzen zu übertragen und damit neue, auch wirtschaftlich interessante Eigenschaften bei bedeutsamen Nutzpflanzen auszuprägen. Ein Beispiel dafür ist die Fähigkeit des grampositiven Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* ein Endotoxin zu produzieren, das zur Lyse der Epithelzellen im Darmbereich von Insekten führt. Einige der über 40 verschiedenen für *B.t.*-Endotoxine kodierenden Gene (Höfte und Whitley, 1989) wurden bereits erfolgreich in Nutzpflanzen (Kartoffel: Cheng *et al.* 1992; Baumwolle: Perlak *et al.* 1990) exprimiert, wodurch ein Fraßschutz gegen bestimmte Insekten erreicht werden konnte.

Grundsätzlich lassen sich zwei Bereiche der molekularen Züchtung unterscheiden, die zwar relativ weit voneinander entfernt sind, aber für die erfolgreiche Übertragung von Eigenschaften unerlässlich aufeinander angewiesen sind. Auf der einen Seite die typischen molekularbiologischen Arbeitsmethoden (PCR-Techniken, Klonierungen, DNA-, RNA-Isolierung) zur Isolierung und Charakterisierung von Genen und auf der anderen Seite die Zell- und Gewebekulturtechniken (Medienzubereitung, *in-vitro*-Kultur, Regeneration) zur Transformation und Regeneration von putativ transgenen Pflanzen. Dabei lassen sich die grundlegenden molekularbiologischen Methoden weitgehend bei allen Pflanzen anwenden, während es im Bereich der Gewebekultur bzw. Transformation oft zu großen Unterschieden innerhalb einer Art kommt. Es ist häufig notwendig, für jede Linie ein eigenes Protokoll für die *in vitro*-Kultur bzw. Transformation und Regeneration aufzustellen. Daher stellt die Zell- und Gewebekultur den arbeitsintensiveren Bereich der molekularen Züchtung dar. Dieser läßt sich wiederum in *in vitro*-Kultur und Transformation aufteilen, wobei besonders im Bereich Transformation viele Entwicklungen und Anwendungen erst seit der Etablierung des *Agrobacterium tumefaciens*- Systemes erarbeitet wurden.

1.1 Methoden zur Genübertragung

Zur genaueren Untersuchung von physiologischen Prozessen innerhalb der Pflanze, die durch die Expression bestimmter Gene beeinflusst werden, war die Entwicklung von Methoden zur Genübertragung notwendig. Mehrere Ansätze zur gentechnischen Modifikation von Pflanzen wurden dazu entwickelt. Dabei läßt sich der direkte Gentransfer, bei dem die DNA durch physikalische Methoden auf die Empfängerpflanze übertragen wird, vom indirekten Gentransfer unterscheiden, bei dem der natürlich ablaufende Prozeß der Genübertragung durch Viren oder Bakterien in modifizierter Form mit einem künstlichen System durchgeführt wird. Die Wahl der Methode hängt von den Eigenschaften der jeweiligen Empfängerpflanze ab und wird nicht von der zu übertragenden DNA beeinflusst.

1.1.1 Methoden des direkten Gentransfers

A: Gentransfer durch particle bombardement

Bei dieser Technik werden mit DNA ummantelte Mikroprojectile (Gold oder Wolfram, 0,6-2 μm \varnothing) durch eine Heliumdruckwelle stark beschleunigt, so das sie in das Zielgewebe eindringen können. Als Zielobjekte sind Zellen, Kalli, Gewebestücke und andere Organe von intakten Pflanzen, wie z.B. Meristemgewebe geeignet. Für die Erstellung stabiler Transformanten ist die Regenerierbarkeit des gewählten Gewebes von entscheidender Bedeutung. Von der erstmals von Klein *et al.* 1987 vorgestellten Genkanone sind viele Weiterentwicklungen und Abänderungen beschrieben wurden (z.B. Finer *et al.* 1993), so daß eine Reihe von wirtschaftlich interessanten Pflanzen (Mais: Walters *et al.* 1992; Weizen: Vasil *et al.* 1992; Gerste: Ritala *et al.* 1994; Baumwolle: Finer *et al.* 1990) transformiert werden konnten. Da bei monokotylen Pflanzen das *Agrobacterium* System bis Mitte der neunziger Jahre nur sehr eingeschränkt eingesetzt werden konnte, wurde die Biolistik hauptsächlich für diesen Bereich entwickelt und auch angewendet. Besonderer Bedeutung kamen dabei aufgrund ihrer Bedeutung für die Nahrungsmittelversorgung den Getreiden zu.

Neben der stabilen Transformation wird die Genkanone aber auch genutzt, um einzelne Organe zu beschießen, wobei entweder die transiente Genexpression im Vordergrund steht oder aber aus den beschossenen Gewebebereichen (Apikalmeristeme, unreife Embryonen) intakte Pflanzen regenerierbar sind, was aufwendige Gewebekulturarbeiten überflüssig macht.

In dieser Arbeit wurden Blütenblätter verschiedener Pflanzen genutzt, die einen genau charakterisierten Block an einer Stelle der Flavonoid-Biosynthese haben und daher keine oder eine nur sehr schwache Färbung der Petalen zeigen. Durch Beschießen der Petalen sollen

geeignete Gene im Gewebe exprimiert werden, wodurch Enzymaktivität entsteht, der Block aufgelöst wird und es zur Bildung von gefärbten Bereichen im Blütenblatt kommt.

B: Elektroporation

Die Übertragung von DNA mittels Elektroporation ist bei Bakterien eine Routinemethode (*E.coli*: Fiedler *et al.* 1988, *Agrobacterium*: Mozo *et al.* 1991) und wurde daher auch auf Pflanzen angewendet. Während die ersten erfolgreichen Ansätze mit Protoplasten durchgeführt wurden, hat man später Versuche mit intakten Gewebeverbänden und sogar an der lebenden Pflanze durchgeführt. Erfolgreiche Transformationen konnten an Mais, Reis und Weizen durchgeführt werden (Dekeyser *et al.* 1989, Chamberlain *et al.* 1994).

Der genaue Mechanismus dieser Methode ist noch nicht geklärt. Man geht davon aus, daß entweder während der elektrischen Entladung Poren in Zellwand und Plasmalemma entstehen, und die DNA so in die Zelle gelangen kann, oder die DNA diffundiert durch die Zellwand und kann erst durch die Porenbildung aufgrund des Pulses das Plasmalemma durchqueren. In der Praxis findet diese Methode heute kaum noch Verwendung. Eine andere Möglichkeit der Genübertragung mittels Elektroporation ist die Verwendung von Meristemen lebender Pflanzen. Dabei wird das Meristem in eine Küvette (1 cm Elektrodenabstand) mit DNA-Lösung getaucht und eine Spannung angelegt. Man geht davon aus, daß die DNA durch sich bildene Poren in die Zellen eindringen kann und ins Genom eingebaut wird.

C: Mikroinjection

Bei der Mikroinjection wird die DNA mittels einer feinen Glaskapillare direkt in die Zelle injiziert. An Protoplasten, pflanzlichen Embryonen (Raps: Neuhaus *et al.* 1987) und Meristemen (Gerste: de la Pena *et al.* 1987) wurden erfolgreiche Ansätze durchgeführt. Diese bei tierischen Zellen zur Routine gewordenen Methode findet bei Pflanzen aufgrund von hohen Kosten und einem hohen Zeitaufwand nur sehr begrenzt Anwendung.

D: Protoplasten

Wird mittels enzymatischem Verdau die Zellwand einer Pflanzenzelle entfernt, ist bei geeigneten osmotischen Bedingungen die Isolierung des nur noch vom Plasmalemma umgebenen Zellinneren möglich. Diese als Protoplast bezeichnete "nackte" Zelle ist die Grundlage vieler Ansätze zur Genübertragung.

Erstmals gelang die Isolation von Protoplasten aus Tomatenwurzeln Cooking 1960 mit Hilfe einer Pilzcellulase. 1971 konnte dann aus Tabakprotoplasten eine Pflanze (Takebe *et al.* 1971)

regeneriert werden. Dies führte zu einer verstärkten Suche nach geeigneten Protokollen zur Isolierung und Regeneration von Protoplasten. Dabei wurde deutlich, daß sich besonders *Solanaceae*n für die Protoplastenkultur eignen. Wesentlich schwieriger gestaltet sich noch heute die Regeneration von *Fabaceae*n (*Vicia faba*, *Glycine max*) und bei den wirtschaftlich bedeutenden *Poaceae*n. Die eingeschränkte Übertragbarkeit, der relativ große Aufwand und das Problem der somaklonalen Variationen stehen als Nachteile den Vorteilen (Behandlung einer Einzelzelle, viele verschiedene DNA-Übertragungsmethoden, hohe Anzahl von Einzelzellen pro Ansatz) gegenüber.

Erfolgreiche Protoplastentransformationen wurden mittels Polyethylenglykol (Larkin *et al.* 1990), Elektroporation (Joersbo und Brunstedt, 1991) und Liposomenfusion (Caboche 1990) erreicht. Transgene Pflanzen konnten auch von einigen Monokotylen wie *Oryza sativa* (Reis), *Zea mays* (Mais), *Triticum aestivum* (Weizen) und *Hordeum vulgare* (Gerste) regeneriert werden (Brandt, 1995). Weitere Anwendungen sind die Somatische Hybridisierung, bei der genetisch unterschiedliche Protoplasten miteinander verschmolzen werden (Tomoffel aus Tomate und Kartoffel, Melchers *et al.* 1978) und die asymetrische Hybridisierung, bei der keine vollständigen Protoplasten fusioniert werden (Übertragung chloroplastencodierter Herbizidresistenz oder mitochondrienkodierter männlicher Sterilität, Steinbiß 1995).

Neben den oben beschriebenen und bis auf die Microinjektion weit verbreiteten und teilweise bis zur Routine weiterentwickelten Methoden zur Genübertragung kamen vereinzelt noch weitere Ansätze zur Anwendung. Diese zum Teil exotischen Methoden kamen nur in Einzelfällen zur Anwendung und werden daher nur am Rande erwähnt. Dazu zählen die Makroinjektion, bei der DNA direkt auf unreife Getreideähren gegeben wird, die Pollenschlauchtransformation, bei der DNA kurz nach der Bestäubung auf die Narbe pipettiert wird und das Quellen von reifen Embryonen in einer konzentrierten DNA-Lösung.

1.1.2 Methoden des indirekten Gentransfers

Neben den oben beschriebenen Methoden zum direkten Gentransfer, bei dem die DNA direkt in die pflanzliche Zelle gelangt, wurden auch Methoden zum indirekten Gentransfer entwickelt, bei dem die DNA mit Hilfe von Viren oder Bakterien, die als Genfähre fungieren, in die Zelle transportiert wird.

A: Gentransfer mittels viraler Vektoren

Bei dieser Methode wird das Genom geeigneter DNA-Viren modifiziert, mit der zu übertragenden DNA versehen und durch Infektion auf die Pflanze übertragen. Da die Fremd-DNA in der Regel nicht ins Genom der Pflanze integriert wird und da meristematische Gewebe im Blütenbereich vom Befall ausgeschlossen sind, ist die Weitergabe der Fremd-DNA über Samen nicht möglich (Potrykus, 1991). Erfolgversprechender ist die Kopplung der Methode mit dem *Agrobacterium*-System. Bei der sogenannten Agroinfection wird das virale Genom mit Hilfe der Agrobakterien übertragen und kann sich dann, wie z.B. der MSV (maize stark virus) bei Mais systemisch über die Pflanze verteilen (Grimsley *et al.* 1987).

B: Gentransfer mit *Agrobacterium tumefaciens*

Bereits 1907 beschrieben Smith und Townsend das Auftreten von unterschiedlich großen Wucherungen an Wurzelhälsen verschiedener Pflanzen (Smith und Townsend, 1907). Als Verursacher dieser Pflanzenkrankheit stellte sich das zu den Alpha-Purpurbakterien gehörende, gram-negative Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* heraus. Die Gattung *Agrobacterium* umfaßt neben *A. tumefaciens* noch die Arten *A. radiobacter*, *A. rhizogenes*, *A. rubri* und *A. vitis* (Ophle und Kerr, 1990), wobei *A. radiobacter* und *A. rubri* als avirulent gelten. Die Unterscheidung der Arten beruht auf dem unterschiedlichen Aufbau der Plasmide und damit auf dem unterschiedlichen phytopathogenen Charakter. Durch biochemische und physiologische Tests (3-Ketolactose-Test, Motility bei pH 7) konnten die Arten in 3 sogenannte biovars unterteilt werden. Diese Einteilung (ausgenommen *A. rubri*) wurde durch den Vergleich der 16S rRNA und der Fettsäureprofile bestätigt, so daß heute eine verlässliche Einteilung in die 3 biovars vorgenommen werden kann (Bouzar *et al.* 1992). Näher untersucht in Bezug auf Gentransfer wurde hauptsächlich der Verursacher des "crown gall tumor" (Wurzelhalsgallentumor), *Agrobacterium tumefaciens* und der Verursacher der "hairy root disease" (haarige Wurzelkrankheit), *Agrobacterium rhizogenes*. Da es eine Reihe von Ursachen für Tumore bei Pflanzen gibt, z. B. Eindringen von Erregern (Obstbaumkrebs, Eschenkrebs) oder extreme äußere Einflüsse (Hitze, Frost, Blitzschlag), war es schwierig, die durch *Agrobacterium* verursachten Tumore von anderen zu unterscheiden. Da bekannt war, daß Pflanzenexplantate zum Wachstum *in vitro* die Zufuhr von Phytohormonen benötigen, wurde durch Experimente bewiesen, daß *Agrobacterium* in der Lage ist, Pflanzenzellen genetisch zu verändern, so daß autonomes Wachstum möglich ist. Es gelang nämlich, bakterienfreies Tumorgewebe auf Medium ohne Hormonzufuhr zu kultivieren. Daneben war dies der Beweis, daß *Agrobacterium* lediglich für die Tumorinduktion, nicht aber für die

Aufrechterhaltung des unbegrenzten Tumorstwachstums notwendig ist. Damit besitzt die Gattung *Agrobacterium* die einzigartige Fähigkeit, einen Teil seiner DNA ins pflanzliche Genom zu integrieren und dadurch die Ausprägung eines Tumors zu bewirken. Die zu übertragende DNA befindet sich auf speziellen Plasmiden (Ti-Plasmid bei *A. tumefaciens* und Ri-Plasmid bei *A. rhizogenes*), die eine Größe von 140-235 kb besitzen und für die Infektiösität verantwortlich sind.

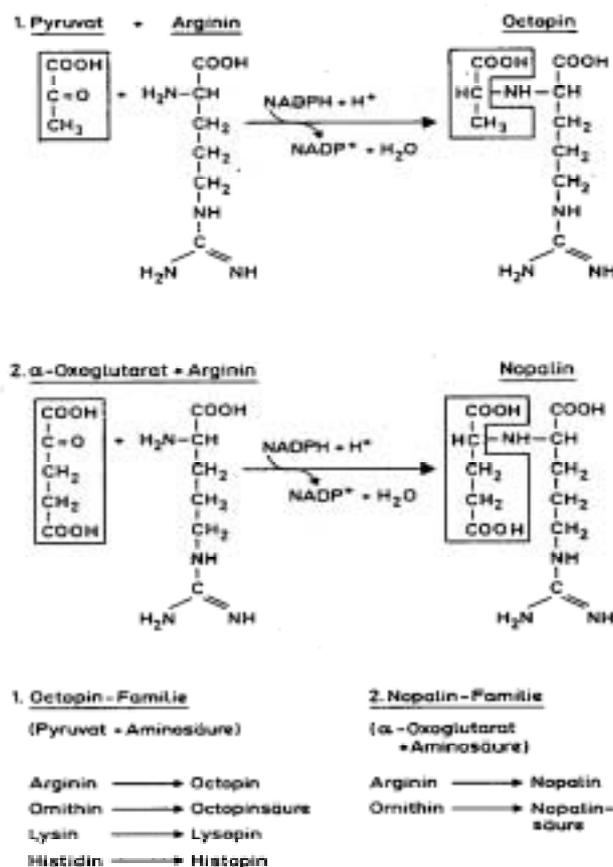


Abb.1: Syntheschema der von *Agrobacterium* als N-Quelle genutzten Aminosäuren, deren Synthese die Expression der auf der T-DNA liegenden und in die pflanzliche Zelle übertragenen Gene erfordert.

Die im Wildtyp für die Übertragung vorgesehenen Gene codieren einerseits für Wachstumshormone, die das Auxin-Cytokinin Verhältnis ändern, wodurch es zur Tumorbildung kommt und andererseits für Enzyme, die der Herstellung von Opinen dienen, die vom Bakterium als Stickstoffquelle genutzt werden. Einzelne Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* werden durch das als Stickstoffquelle genutzte Opine voneinander unterschieden (siehe Abb.1). Neben den von häufig verwendeten Stämmen wie LBA 4404 und C 58 genutzten Octopin bzw Nopalin, wird vereinzelt auch Agropin und Succinamopin als Nährstoffquelle genutzt.

B.1: Ti-Plasmid und Vektoren

Aufgrund ihrer Bedeutung für den Gentransfer wurden in den gut untersuchten Ti-Plasmiden 4 funktionell wichtige Abschnitte charakterisiert: Die T-DNA (Transfer DNA), der Replikationsstart, die Vir-Region und die Konjugationsregion. 1983 wurden erstmals die tumorauslösenden Gene (onc-Gene) aus der T-DNA eines Wildtyp-Stammes entfernt und somit ein entwaffnetes Ti-Plasmid hergestellt (Zambryski *et al.* 1983). Die als cointegrativ bezeichneten Vektoren (siehe Abb.2) wurden durch homologe Rekombination eines intermediären Vektors mit dem entwaffneten Ti-Plasmid hergestellt.

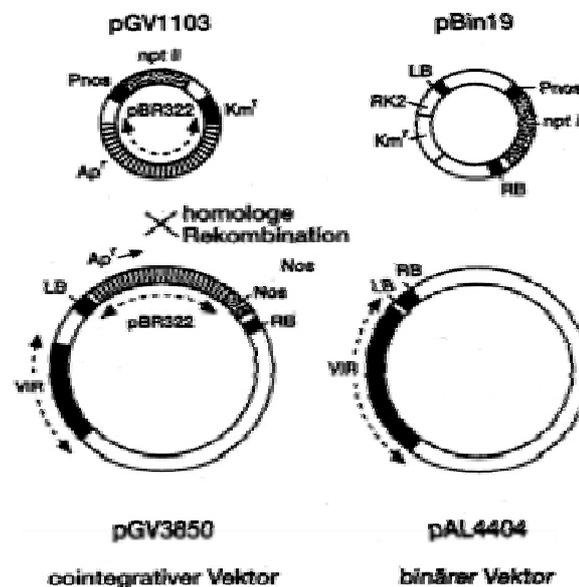


Abb.2.: Schematische Darstellung eines cointegrativen und eines binären Vektors

Da die Herstellung dieser Vektoren aufgrund ihrer Größe relativ kompliziert und zeitaufwendig ist, wurden binäre Vektoren (Abb.2) entwickelt (Hoekema *et al.* 1983). Dabei wird ein zweiter Vektor mit der zwischen right border (RB) und left border (LB) lokalisierten, zu übertragenden DNA in das Bakterium gebracht. Die aktive Vir-Region des entwaffneten Ti-Plasmides bewirkt dann in trans die Übertragung der T-DNA. Damit stehen neben den chromosomalen Genen (Douglas *et al.* 1982) auch die auf dem Ti-Plasmid lokalisierten Gene zur Verfügung. Der Vorteil der Binärvektoren liegt in der geringen Größe (5-17 kb) und einer daher mit herkömmlichen Klonierungsmethoden relativ einfachen Handhabbarkeit. Außerdem

wurde der prokaryontische Replikationsursprung RK2 inseriert, so daß der Vektor in *Agrobacterium* und *Escherichia coli* vermehrt werden kann. Zwischen den Bordersequenzen befindet sich das gegen ein bestimmtes Antibiotikum [oft Kanamycin, Hygromycin (Waldron *et al.* 1985) oder Bialaphos (Holt *et al.* 1993)] Resistenz verleihende Gen und ein Polylinker als Klonierungstelle. Während bei älteren Binärvektoren der Selektionsmarker neben der rechten Bordersequenz plaziert ist, befindet sich bei neueren Entwicklungen der Marker neben der linken Bordersequenz. Dadurch wird die Regeneration von Pflanzen vermieden, die nur den Selektionsmarker und nicht das jeweilige Gen integriert haben, da die DNA-Übertragung am rechten Border beginnt.

B.2: Mechanismus der DNA-Übertragung (Abb.3)

Die bei der Wundheilung von der Pflanze produzierten Zucker und phenolischen Verbindungen werden von dem chemotaktisch aktivem *Agrobacterium* erkannt (Loake *et al.* 1988) und führen zur Expression der *vir*-Gene. Ein chemotaktisch wirksamer Stoff ist die phenolische Substanz Acetosyringon, die bei der Verwundung von Pflanzen gebildet wird und als Startsignal für die Transformation dient (Stachel *et al.* 1985). In vielen Protokollen wird Acetosyringon während der Co-Kulturphase eingesetzt (Godwin *et al.* 1992), so daß auch nicht natürliche Wirte von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgreich transformiert werden konnten. Der als "attachement" bezeichnete Prozeß des Anheftens der Bakterienzelle an Polygalacturonate der pflanzlichen Zelle stellt den Beginn des Transformationsprozesses dar, wobei die eigentliche DNA-Übertragung nicht auf das "attachement" angewiesen ist (Escudero *et al.* 1995). Der erste Schritt des "attachement" ist mit einem acetylierten Polysaccharid verbunden (Reuhs *et al.* 1997), das den aktiven Genlocus *attR* erfordert. Mutationen in diesem Locus verhindern die Synthese des Polysaccharides und damit die Fähigkeit des Bakteriums "anzudocken". Anschließend werden vom Bakterium Cellulosefasern gebildet, die aufgrund einer netzartigen Struktur an der verwundeten Stelle der Pflanze zu einer Ansammlung von Bakterien führt (Matthysse *et al.* 1998). Die chromosomalen Gene *chvA*, *chvB* und *pscA* sind an der Synthese und dem Export von β -1,2-Glucan und anderen Zuckern beteiligt und haben damit direkten Einfluß auf das "attachement". Mutationen in diesen Bereichen verringern die Infektiösität, die nur unter speziellen Bedingungen wie z.B. bei *chvB* wieder hergestellt werden kann (Banta *et al.* 1998), während *att*-Mutanten die Fähigkeit zum "attachement" vollständig verloren haben (Matthysse *et al.* 1996).

Nachdem das Bakterium mit der verwundeten Zelle in Kontakt getreten ist, werden die *vir*-Gene durch chemische Reizstoffe aktiviert. Die Funktion der *vir*-Gene (*virA*, *virB1-11*, *virC1*,

virD1, *virD2*, *virE1*, *virE2*, *virF*, *virG*, *virJ*) und der Prozeß der DNA-Übertragung läßt sich wie folgt kurz beschreiben (Zambryski 1992):

- virA*: Membrangebundenes Protein, das auf chemische Reize reagiert und durch Phosphorylierung *virG* aktiviert, 2-Komponenten Regulation.
- virG*: Wird durch Phosphorylierung (*virA*) oder phenolische Stoffe aktiv, 10-fach erhöhte Expression bei Induktion, aktiviert die übrigen Virulenzgene, mehrere Kopien in supervirulenten Stämmen, 2-Komponenten-Regulation.
- virD1*: Topoisomerase-Aktivität
- virD2*: Borderspezifische Endonucleaseaktivität, durch Bindung an der T-DNA Schutzfunktion gegen 5'-Exonukleasen, KLS (Kernlokalisationsignal), Funktion bei der Integration ins pflanzliche Genom.
- virC1*: Wirkt als Unterstützer des T-DNA Transfers.
- virB1-11*: Bildung eines Kanals zur Überbrückung der Zellwände, teilweise membrangebunden und mit ATP-Bindungsstellen, Interaktionen mit *VirD2* und *VirE2*.
- virE1*: Bewirkt *VirE2* Export und fungiert als Chaperon für *VirE2*.
- virE2*: Bindet an den synthetisierten Strang und formiert mit *VirD2* den T-DNA Komplex in der pflanzlichen Zelle, schützt den T-Strang in der Pflanzenzelle und unterstützt den Kerntransport, 0,1 % vom Zellprotein, DNA bindendes Protein auch *in vitro*.
- virF*: Einfluß auf die Wirtsspezifität und eventuell den Zellzyklus.

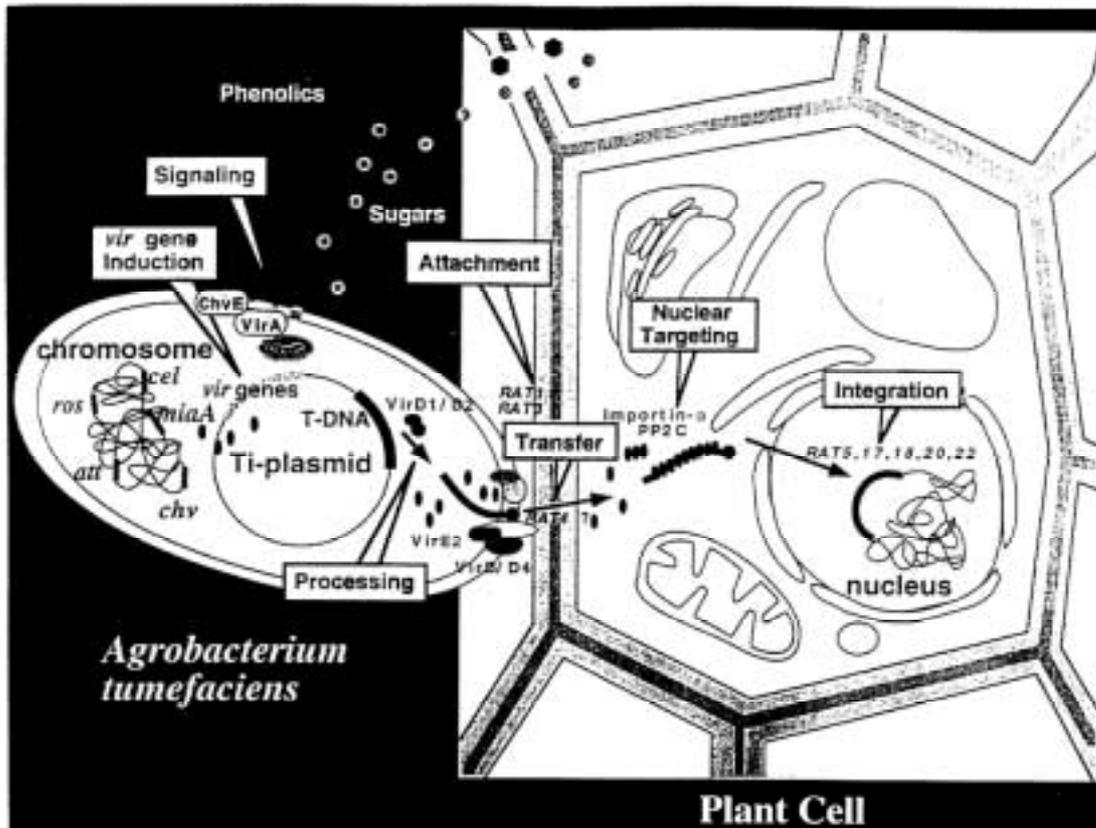


Abb. 3: Schematische Darstellung der DNA-Übertragung mit Induktion, Transfer und Integration

virJ: Bindet den T-Strang und hat Einfluß auf den DNA-Transfer.

Der sich nach der Übertragung in der pflanzlichen Zelle befindende T-Strang wird von einigen hundert VirE2-Molekülen und einem VirD2-Molekül am 5'-Ende geschützt (Tinland *et al.* 1994). Nicht verpackte DNA unterliegt vielen Änderungen, die zur Deletion von Teilen der DNA oder zur Bildung von Ketten aus vielen Genkopien, die dann ins Genom integriert werden, führen können (Rossi *et al.* 1994). Neben der Schutzfunktion besitzen VirD2 und VirE2 jeweils 2 Kernlokalisationsignale (Citrovsky *et al.* 1994), die im Fall von VirD2 Homologien zu Proteinen gleicher Funktion von *Xenopus laevis* aufweisen (Guralnick *et al.* 1996). VirE2 könnte den Kerntransfer des T-Stranges durch eine Konformationsänderung unterstützen (Citrovsky *et al.* 1997). Daneben spielt auch die Phosphorylierung von bestimmten Bereichen des KLS von VirD2 eine Rolle bei dem Transport in den Zellkern.

Außer den *vir*-Genen haben pflanzliche Proteine und das für die Transformation vorgesehene Gewebe einen Einfluß auf die DNA-Übertragung. So werden z.B. *Arabidopsis* Ökotypen beschrieben, die recalcitrant gegenüber Wurzeltransformation sind, sich aber mit der Infiltrationsmethode durchaus transformieren lassen (Mysore *et al.* 2000). Das aus einer

Arabidopsis Mutante isolierte Gen *rat5* bewirkte bei der Überexpression sowohl in der Pflanze als auch im Bakterium eine Erhöhung der Transformationsrate (Mysore *et al.* 2000). Einen großen Einfluß auf den Erfolg eines Transformationsansatzes hat auch der Grad der Differenzierung und die Phase des Zellzyklus. So wurde z.B. bei undifferenzierten Zellen in den Keimblättern von *Pisum sativum* eine erhöhte Bereitschaft zur DNA-Aufnahme festgestellt (de Kathen *et al.* 1995). Bei *Arabidopsis* zeigten undifferenzierte Zellen aus Blättern, Keimblättern und dem Wurzelbereich, deren Morphologie Ähnlichkeiten aufwies, eine hohe Transformationskompetenz (Sangwan *et al.* 1992). Die Tatsache, daß die Vorkultur des Gewebes auf Medium mit Phytohormonen bei vielen Pflanzen höhere Transformationsraten erbrachte, führte zur näheren Betrachtung des Zellzyklus. Dabei wurde deutlich, daß sich Zellen weder in der G0, der G1 noch in der M-Phase stabil transformieren ließen, wobei in der M-Phase eine transiente Expression zu beobachten war, d.h. die DNA-Übertragung möglich ist (Villemont *et al.* 1997). Die höchsten Transformationsraten wurden in Gewebe mit sehr hohem S/G2:M Verhältnis beobachtet. Neuere Untersuchungen an Apfel zeigen, daß trotz Zugabe von *vir*-Gen Aktivatoren keine stabile Transformation erreicht werden kann, wobei es zwar zur Übertragung des Reportergens und dessen transienter Expression kommt, jedoch keine Integration ins Genom stattfindet (Maximova *et al.* 1998). Daneben wurde ein *Arabidopsis* Ökotyp identifiziert, der aufgrund nicht stattfindender Integration nicht transformiert werden konnte, obwohl T-DNA Transfer beobachtet werden konnte (Nam *et al.* 1997). Damit wird klar, daß sich eine erfolgreiche Transformation als Zusammenspiel von "attachment", DNA-Übertragung, Transport in den pflanzlichen Zellkern und der Integration ins Genom zusammensetzt. Der Ausfall eines dieser Schritte führt dann folglich zum Mißlingen der Transformation.

1.2 Flavonoide und Anthocyane

Die Flavonoide oder Flavanderivate, deren Name sich von der Gelbfärbung einiger ihrer Vertreter ableitet (lat. flavus = gelb) stellen die größte Gruppe der pflanzlichen phenolischen Verbindungen. Flavanderivate werden bei Mikroorganismen und Algen nur sporadisch gefunden. Pilze enthalten sie wahrscheinlich nicht. Im Pflanzenreich treten sie bei Moospflanzen (Bryophyta) und Farnpflanzen (Pteridophyta) häufig auf, bei den Samenpflanzen (Spermatophyta) sind sie vermutlich ubiquitär verbreitet. Der tierische und menschliche Organismus kann sie nicht bilden. Einige der vielfältigen Bedeutungen dieser

Klasse der sekundären Pflanzenstoffe in der Natur sollen im folgendem näher beleuchtet werden.

Die wichtigste und visuell deutlichste Funktion der Flavonoide besteht in der Färbung von Blüten, Früchten und anderen Pflanzenteilen, was sicherlich ein Grund für das starke Interesse und das große Wissen in Bezug auf Synthese, Verbreitung und Bedeutung darstellt. Die Blütenfärbung wird überwiegend durch Carotenoide im gelben bis roten und durch Flavonoide bzw. Anthocyane im weiß-gelben, roten und blauen Bereich bedingt. Blüten mit einer Mischung erscheinen zumeist gelb, orange und zum Teil auch braun. Die Farbstoffe sind im Fall der lipophilen Carotenoide (Bartley und Scolnik, 1995) in den Plastiden (Chloro- und Chromoplasten) und im Fall der wasserlöslichen Flavonoide in der glykosilierten Form in der Vakuole lokalisiert. Die Bedeutung der Blütenfärbung liegt hauptsächlich in der Anlockung von Bestäubern und Fruchtverbreitern. Das sind in den gemäßigten Breiten vor allem Insekten, während in den Tropen auch Vögel und Fledermäuse die Aufgabe des Bestäubens übernehmen. Zu berücksichtigen ist dabei die Vorliebe für bestimmte Blütenfarben bei den einzelnen Arten, die sicherlich bei der Evolution der vielfältigen Färbungsmuster eine Rolle gespielt hat. So bevorzugen z.B. Bienen blaue und gelbe Farben, Wespen violett und braun und Vögel rot bis scharlachrot. Neben der Synthese von farbgebenden Substanzen wird die Blütenfärbung durch eine Reihe weiterer Faktoren bestimmt. So macht z.B. bei *Viola tricolor* (Stiefmütterchen) der Blütenfarbstoff 30% des Blütentrockengewichtes aus und bedingt dadurch eine entsprechende Farbtiefe. Weitere Faktoren sind der besonders bei Anthocyanen relevante pH-Wert und die Copigmentierung durch Flavone, Flavonole und Catechine, die eine Farbvertiefung verursachen. Weiterhin spielt die Komplexbildung mit mehrwertigen Metallionen (Fe^{3+} , Fe^{2+} und Al^{3+}) eine Rolle bei der Blaufärbung. So bewirkt z.B. ein solches Chelat die blaue Farbe der Kornblume trotz der Cyanidin-Derivate und des eigentlich für eine Rotfärbung günstigeren pH-Wertes von 4,9.

Bedeutung und Funktion

Das als "french paradox" bezeichnete Phänomen des signifikant geringeren Auftretens von Herzerkrankungen trotz einer fett- und cholesterinreichen Ernährung in Frankreich führte zu einem öffentlichen Interesse an den Flavonoiden. Es wurde schon in den siebziger Jahren auch in anderen mediterranen Ländern mit traditionell hohem Weinkonsum ein Zusammenhang zwischen Weinkonsum und reduziertem Herzinfarktrisiko beobachtet. Nähere Untersuchungen ergaben bestimmte Korrelationen zwischen Herzinfarkthäufigkeit und Weinkonsum, die in Ländern mit geringer Häufigkeit von Herzerkrankungen verhältnismäßig

hoch war. Anhand zahlreicher epidemiologischer Untersuchungen konnte eine 30–50% niedrigere Krankheits- und Sterblichkeitsrate bezüglich Herz-Kreislauf-erkrankungen bei moderatem Weinkonsum nachgewiesen werden (Renaud *et al.* 1992, Ruf 1996). Eine weitere Studie, die das Verhältnis von Sterbefällen an koronaren Herzerkrankungen und Alkoholkonsum in den Jahren 1965, '70, '80 und '88 untersuchte, ergab, daß die Reduzierung dieser Erkrankungen eine Abhängigkeit vom Weinkonsum zeigte, jedoch unabhängig von der totalen Alkoholaufnahme war (Criqui und Rigel, 1994). Ein Hauptgrund ist sicherlich die Erhöhung des als "gutes Cholesterin" bezeichnete "HDL", die durch moderaten Alkoholkonsum bedingt wird (Castelli *et al.* 1977). Weitere Gründe sind eine erhöhte Vitamin A und E Konzentration (Simonetti *et al.* 1995), eine verminderte Thrombozytenaggregation (Schneider *et al.* 1996), die vorwiegend auf Weininhaltsstoffe wie Tannine, Polyphenole und Flavonoide beruht und die Senkung des Blutdruckes. Da die wirksamen Inhaltsstoffe (Catechine, Proanthocyane) hauptsächlich in den Kernen der Weintrauben vorkommen, erklärt sich somit auch die positive Wirkung von Weißwein (Bourzeix 1993).

Bestimmten Bioflavonoiden wurde jahrelang eine Vitaminfunktion zugeschrieben, da sogenanntes Vitamin P in Verbindung mit Vit. C eine bessere präventive Wirkung auf Skorbut hatte, als reines Vit. C. Nähere Untersuchungen ergaben dann, daß Vit. P aus einem Gemisch aus Hesperidin und Eriodictyol (Lahann und Purucker, 1974) besteht, deren alleinige Wirkung relativ gering ist. Da der eindeutige Vitamincharakter nicht klar nachzuweisen war, wurde den Flavonoiden der Vitamin-Status aberkannt. Die typische Wirkung von Vitamin P gegen Kapillarblutungen, Ödemen, Zahnfleischblutungen oder blauen Flecken, die auch bei anderen Flavonoiden wie Rutin festgestellt wurde, ist jedoch weltweit anerkannt, so daß es eine Vielzahl von Produkten auf Basis von Flavonoiden mit beschriebener Wirkung gibt.

Neben vielen weiteren in bezug auf die Gesundheit des Menschen positiven Eigenschaften der Flavonoide (Böhm *et al.* 1998) wird sogar ein Einfluß bei der Hemmung der Vermehrung des HIV-Virus durch Inhibierung der reversen Transkription diskutiert. Andere Ansätze beschäftigen sich mit dem Einfluß von Flavonoiden auf das Wachstum von Krebszellen, wobei an *in vitro* Versuchen mit bestimmten Zelllinien schon Erfolge beobachtet wurden.

Die größte Bedeutung kommt Flavonoiden aber durch ihre antioxidative Aktivität bei der Neutralisation von Sauerstoffradikalen und der Inaktivierung von Hydroxylradikalen zu, wodurch photooxidative Schäden vermindert oder auch ganz verhindert werden (Elstner, 1996).

Eine weitere wichtige Funktion von Flavonoiden bei Pflanzen stellt der Schutz vor schädlichen UV-Strahlen dar. Während nur ein Teil der von der Sonne abgegebenen UV-

Strahlung von der Ozonschicht absorbiert wird, gelangt relativ langwelliges Licht (UV-A 320-400 nm, UV-B 280-320 nm) auf die Erdoberfläche (Green 1983) und bewirkt besonders im Fall von UV-B starke Schäden. Als Schutzmechanismus dienen in der oberen Epidermis akkumulierte Epicuticularwachse und Flavonoide, die in der Lage sind, UV Strahlung zu absorbieren. Anthocyane bilden dabei eine Ausnahme, da sie nur in sehr hohen Konzentrationen für die Pflanze schädliche UV-B-Strahlung absorbieren können. Untersuchungen an Arabidopsis-Mutanten (Li et al. 1993), Petunien (Ryan *et al.* 1998) und Reis (Markham *et al.* 1998) belegen den Einfluß von Flavonoiden beim Schutz gegen schädliche UV-Strahlung. Es wird sogar angenommen, daß der UV-Schutz die ursprüngliche Bedeutung der Flavonoide darstellt.

Weiterhin spielen Polyphenole (zum Teil Flavonoide) als Phytoalexine und als Vorstufen der Gerbstoffe eine wichtige Rolle. So isolierten beispielsweise Hain *et al.* (1993) zwei Stilben-Synthase-Gene aus Reben und übertrugen sie unter der Kontrolle eines pathogeninduzierbaren Promotors in *N. tabacum*. Die Synthese von Stilben im transgenen Tabak führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea*. Die Wirkung der Gerbstoffe wird besonders beim Fraßschutz und der Pathogenabwehr deutlich. So ist z.B. der Geschmack von löslichen Formen fraßhemmend während unlösliche Formen das Gewebe stabilisieren und das Eindringen von Schädlingen erschweren. Komplexe aus Proteinen und Gerbstoffen stellen z.B. ein Verwertungsproblem für Parasiten dar und sind in der Lage, bestimmte Stoffwechselfunktionen von Schädlingen zu behindern.

Weitere Eigenschaften der Polyphenole sind ihre allelopathische Wirkung (Roschina und Roschina, 1993). Das vom Walnußbaum abgegebene Juglon unterbindet zum Beispiel die Keimung von artfremden Samen in näherer Umgebung. Der hohen Phenolgehalt von Heidekrautstreu behindert den Nährstoffkreislauf und benachteiligt somit nährstoffliebende Pflanzen zugunsten von *Calluna* und *Erica*. Auch bei der Nodulation von Knöllchenbakterien spielen Flavonoide eine Rolle, indem sie die Transkription von Nodulationsgenen induzieren (Bohm, 1994 und 1998).

Anthocyane

Die Anthocyane (gr. anthos = Blüte, Blume, kyanos = blauer Farbstoff) stellen ohne Zweifel die wichtigste Gruppe der farbgebenden Blüteninhaltsstoffe dar und sind daher auch für die meisten roten bis blauen Farbtöne in höheren Pflanzen verantwortlich (Dooner *et al.* 1991) Die Synthese der gewöhnlich in der Vakuole akkumulierten Anthocyane verläuft über die Flavonoidbiosynthese, wobei der letzte Schritt von den Leucoanthocyanidinen zu den

Anthocyanidinen noch nicht restlos aufgeklärt ist. Die vielfältigsten und hinsichtlich der Farbgebung wichtigsten Anthocyane unterscheiden sich nur im Substitutionsmuster am B-Ring des Flavonoidgrundgerüsts (siehe Abb. 4). So haben besonders Hydroxylierungen an 3'- und an 5'-Position einen Einfluß auf die Farbe. Die von der Flavonoid 3'-Hydroxylase katalysierten Reaktion führt z.B. zum kaminroten Cyanidin während die von der Flavonoid 3', 5'-Hydroxylase katalysierten Reaktion zum blau gefärbten Delphinidin führt. Weitere häufig vorkommenden Anthocyane wie Peonidin, Petunidin und Malvidin entstehen durch 3'- bzw. 5'-Methylierung auf Ebene der Anthocyanidin 3-O-Glycoside (Forkmann und Heller, 1999).

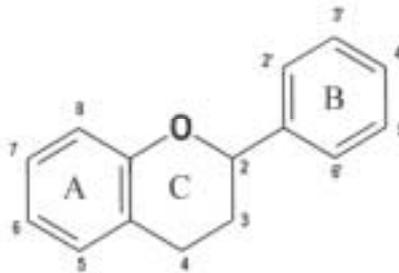
Neben der B-Ring Substitution haben pH-Wert und diverse Formen der Komplexbildung einen großen Einfluß auf die Farbe der Anthocyane. So erscheint das als Grundgerüst der Anthocyane anzusehende Flavylium-Ion bei pH < 3 rot, bei pH 3-6 purpur und bei pH 6-9 blau.

Eine Form der Komplexbildung besteht in der Selbstassoziation von Anthocyan-Anhydrobasen, die bei hohen Konzentrationen auftritt und im Fall von Cyanin und Pelargonin zur Bildung von Pigmentkristallen im Zellsaft führen kann (Goto und Kondo, 1991). Copigmentierungen von Anthocyanen durch Flavonolglycoside und Flavone sind relativ häufig und von pH-Wert und Temperatur abhängig. Die Wirkung in wässriger Lösung beruht oft auf einer hydrophoben Stapelung der aromatischen Ringe wie z.B. bei der blauen Blüte von *Commelina communis* (Commeline). Die wahrscheinlich wichtigste Form der Komplexbildung besteht in der Interaktion mit dreiwertig geladenen Fe und Al-Ionen. Dabei wirkt das Metallion als Verstärker einer Pigment-Copigment (oft Flavone)-Anziehung und bedingt dadurch eine tiefere Farbe. Neben der bereits erwähnten Kornblume, bei der ein Eisen- und ein Magnesiumkation mit jeweils 6 Cyanidin 3-(6''-succinylglucosid)-5-glucosid- und 6 Apigenin 4'-(6''-malonylglucosid)-7-Glucosid-molekülen einen blauen Farbkomplex bildet, ist die durch die Bildung eines Metall-Pigment-Copigment-Komplexes blau gefärbte Blüte von *Hydrangea macrophylla* (Hortensie) ein gutes Beispiel für den Einfluß der Komplexbildung. Ein weiteres Beispiel für den Einfluß von Komplexen ist die intramolekulare Copigmentierung. So hat z. B. die Veresterung von Acylgruppen mit Glycosylgruppen der glycosilierten Anthocyane einen stabilisierenden Einfluß auf die färbenden Strukturen.

Biosyntheseweg der Flavonoide

Aufgrund der großen Bedeutung der Flavonoide ist die Biosynthese mit fast allen Zwischenstufen weitgehend aufgeklärt. Das Flavonoidgrundgerüst (siehe Abb.4) besteht wie schon 1936 von Robinson vorgeschlagen (Robinson, 1936) aus einer C-15-Struktur, die sich in 2 aromatische Ringe (A und B) und dem zentralen heterozyklischen Ring C unterteilt.

Abb.4: Flavonoidgrundgerüst mit Bezeichnung der Ringe (A,B,C) und den Orten von Substitutionen



Mit der Entdeckung der PAL (Phenylalanin-Ammonium Lyase, Koukol und Conn, 1961) begann die Erforschung des Syntheseweges, der durch Arbeiten an Zellsuspensionen von *Petroselinum crispum* (Garten Petersilie) anfang der siebziger Jahre wesentlich weiter aufgeklärt wurde. Folgender Reaktionsmechanismus kann hinsichtlich der Funktion als abgesichert angesehen werden: Durch die enzymatische Reaktion der PAL, der Cinnamat 4-Hydroxylase (C4H) und der 4-Cumarat : CoA Ligase (4CL) wird 4-Cumaroyl-CoA gebildet, das durch die Kondensationsreaktion der Chalkonsynthase (CHS) mit 3 Molekülen Malonyl-CoA zu Tetrahydroxychalkon umgesetzt wird. In einigen Arten wird auch Kaffeoyl-CoA als Substrat verwendet, das zur Synthese des 3-hydroxylierten Chalkons Pentahydroxychalkon führt. Auf gleicher Ebene wie die CHS führt die Chalkonreduktase (CHKR oder PKR) zu 5'-Deoxyflavonoiden und die Stilbensynthase (Resveratolsynthase) zu den Stilbenen. Die durch die CHS katalysierte Bildung der Chalkone stellt sicherlich die Schlüsselreaktion des Syntheseweges dar und war dadurch phylogenetisch ein häufig genutzter Ansatzpunkt für Modifikationen auf molekularer Ebene. Den auch spontan zum 2S-Flavanon ablaufenden Ringschluß des Heterozyklus katalysiert die CHI (Chalkonisomerase), wobei je nach Hydroxylierungsmuster des B-Ringes verschiedene Flavanone entstehen können. Die FHT (Flavanon 3-Hydroxylase) hydroxyliert dann die Flavanone an Position 3 zu den Dihydroflavonolen, während die FNS (Flavonsynthase) durch Einfügung einer Doppelbindung das gleiche Substrat zu den Flavonen umsetzt. Die Dihydroflavonole werden

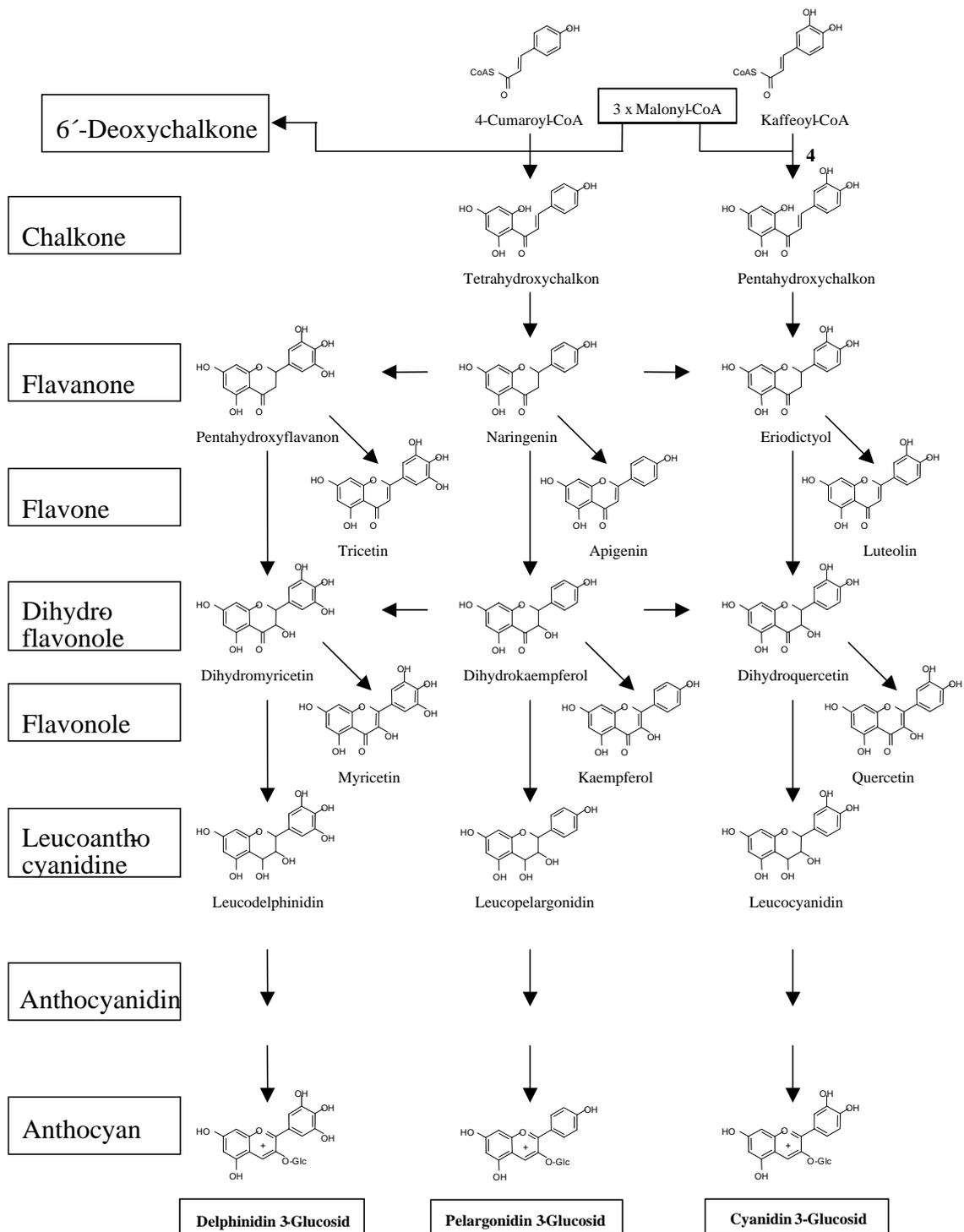


Abb.5: Schema der Flavonoidbiosynthese (Coum3H: 4-Cumarat 3-hydroxylase, CoumCoAsH: 4-Cumaroyl-CoA 3-Hydroxylase)

durch die DFR (Dihydroflavonol 4-Reduktase) zu den Leucoanthocyanidinen reduziert, die dann von der ANS (Anthocyanidinsynthese) und der FGT (UDP-Glucose : Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase) zu den je nach Hydroxylierung des B-Rings verschiedenen Anthocyanen

umgeformt werden. Die Flavonolsynthese (FLS) nutzt die Dihydroflavonole auch als Substrat und führt durch Einfügen einer Doppelbindung am Heterozyklus zu den Flavonolen. Hydroxylierungen am B-Ring werden durch die F3'H (Flavonoid 3'-Hydroxylase) an Position 3' und durch die F3',5'H (Flavonoid 3',5'-Hydroxylase) an Position 3' und 5' katalysiert. Diese Reaktion kann auf Ebene der Flavanone, der Dihydroflavonole, der Flavone, der Flavonole und möglicherweise der Flavan-3,4-diole (Leucoanthocyanidine) stattfinden (Abb.5).

Pflanzenmaterial

A *Osteospermum*

Aufgrund der in den letzten Jahren gestiegenen Bekanntheit und somit der erhöhten wirtschaftlichen Bedeutung wurde die Beet- und Balkonpflanze *Osteospermum* als Objekt für gentechnische Versuche ausgewählt. Die ursprünglich in Südafrika beheimatete Pflanze ist eine halbharte, mehrjährige Staude mit einer scheibenförmigen Blütenstandsachse, dort aufsitzenden Röhrenblüten und randständigen Strahlenblüten. Damit gehört *Osteospermum*, zu deutsch Capmagarite oder Capkörbchen, zu den *Asteraceae*, Unterfamilie *Asteroideae* (Hess, 1983). Die gärtnerisch bedeutsamste Art ist *Osteospermum ecklonis*, deren Hybriden des dänischen Züchters C.A. Kragh Sørensen als Ausgangsmaterial genutzt wurden. Davon wurden die von C. Seitz (Diplomarbeit am LZW) hinsichtlich der Blüteninhaltsstoffe und der Enzymaktivität untersuchten Sorten für gentechnische Ansätze verwendet.

B *Pelargonium*

In der Familie der *Geraniaceae* (Storchenschnabelgewächse) haben nur die Gattungen *Geranium* (Storchnabel) und *Pelargonium* (Geranie) eine Bedeutung für den Zierpflanzenbau. Die überwiegend aus Südafrika stammenden ca. 250 Wildarten werden in 15 Sektionen klassifiziert, von denen 5 als Ausgangsarten für die heute wirtschaftlich genutzten Kulturformen angesehen werden können. Die heute als Zierpflanzen genutzten Pelargonien entstammen Artkreuzungen, weswegen sie als Hybride anzusehen sind. Die wichtigsten sind *P.-Grandiflorum*-Hybriden (PGH), *P.-Peltatum*-Hybriden (PPH) und *P.Zonale*-Hybriden (PZH). Wirtschaftlich interessant sind PZH mit den Eltern *P. zonale* L'Herit und *P. inquinans* L'Herit sowie PPH mit dem wichtigsten Elternteil *P. peltatum* L'Herit. In den Hybriden liegt zumeist ein di- oder tetraploider Chromosomensatz vor. Das Blütenspektrum

umfaßt die Farben weiß bis rot mit vielen Mischformen und einigen gelblichen Tönen. Eindeutig gelb oder blau blühende Formen sind nicht beschrieben. Die Pelargonie ist heute in Deutschland mit einer verkauften Stückzahl von 170 Mio (1993) die Beet- und Balkonpflanze Nummer 1 und daher für gentechnische Ansätze besonders interessant. Für die Untersuchungen wurden Sorten der Firmen Nebelung, Walz und S+G verwendet.

C *Matthiola incana*

Die zur Familie der *Brassicaceae* (Kreuzblütler) gehörende Zierpflanze *Matthiola incana* (Levkoje) ist als Gartenpflanze in Mitteleuropa seit dem 16. Jahrhundert bekannt. Es sind ca. 50 Arten der ein- bis zweijährigen Blütenpflanze bekannt, deren weiße, gelbe, rote oder dunkelviolette Blüten als Schnittblumen genutzt werden. Daneben wird die Levkoje auch als Beetpflanze eingesetzt. Der diploide Chromosomensatz umfaßt 14 Chromosomen. Die zur Synthese der die Blütenfarbe bestimmenden Farbstoffe (Pelargonidin, Cyanidin, Kämpferol, Quercetin) notwendigen Gene sind gut charakterisiert (Teusch *et al.* 1986) und zum Teil auch isoliert. Für die Versuche wurden hinsichtlich der Flavonoidbiosynthese eindeutig charakterisierte Linien genutzt. Von besonderem Interesse waren die weißblühenden Linien 17 und 18, die als DFR- bzw. CHS-Mutanten anzusehen sind.

D *Petunia*

Von *Petunia hybrida* sind über 25 Arten bekannt, die vorwiegend in Südamerika beheimatet sind. Sie gehört zur Familie der *Solanaceae* (Nachtschattengewächse), die ursprünglich in den Tropen und Subtropen Amerikas verbreitet waren, aufgrund einiger wichtiger Arten aber mittlerweile durch den Menschen weltweit verbreitet wurde. Neben Zierpflanzen wie *Petunia* und *Solanum* (Nachtschatten) gehören wichtige Nutzpflanzen wie *Lycopersicon esculentum* (Tomate), *Solanum tuberosum* (Kartoffel) und *Capsicum annuum* (Paprika) zu den Nachtschattengewächsen. *Petunia hybrida* besitzt ein Farbspektrum von weiß, rosa, lachs purpur, karmin, rot, blau und gelb. Aufgrund der vielen natürlich vorkommenden Blütenfarben und der bei den *Solanaceae* allgemein guten Handhabbarkeit in Zell- und Gewebekultur wird *Petunia hybrida* oft als Modellorganismus zur Untersuchung und Manipulation der Flavonoidbiosynthese verwendet.

Die in dieser Arbeit hauptsächlich für Transformationsansätze verwendete Mutante RL01 ist ein Nachkomme der bezüglich der B-Ring Hydroxylierung näher charakterisierten

Linie R4 (Stotz, 1983). Da RL01 keine Flavonoid 3'-Hydroxylase Aktivität und nur eine geringe Flavonoid 3'-5'-Hydroxylase besitzt, sind nur geringe Mengen an Cyanidin- und Delphindin-Derivaten vorhanden, ein Grund für die blaß-rosa Färbung der Petalen. Daneben bewirkt die Substratspezifität der Dihydroflavonol 4-Reduktase eine Anreicherung von Dihydrokämpferol, welches die Vorstufe von dem in den Petalen nicht vorkommenden Pelargonidin darstellt (Meyer *et al.* 1987).

E *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana wurde von Johannes Thal 1577 erstmals beschrieben. Es ist ein einjähriges, Ruderalflächen besiedelndes Wildkraut ohne wirtschaftliche Bedeutung, daß wie *Matthiola incana* (Sommerleckoje) zur Familie der *Brassicaceae* gehört. Beide Arten werden als Modellobjekte für pflanzen genetische Untersuchungen verwendet. Mit verschiedenen Ökotypen ist es von Zentral- und Ostasien bis nach Westsibirien, über das Mittelmeergebiet bis in die ostafrikanischen Gebirge, sowie auf den Kanaren, Madeira und in ganz Europa verbreitet. In Nordamerika, Südafrika und Australien ist es eingebürgert (Hegi 1986).

Friedrich Laibach begann Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts experimentelle Arbeiten mit *A. thaliana*, aber erst in den sechziger Jahren nahm das Interesse an *Arabidopsis* als Laborpflanze zu. Schon 1943 legte Laibach die Vorteile der Pflanze für die genetische Forschung dar. Eine hohe Samenproduktion, ein kurzer Entwicklungszyklus, eine geringe Chromosomenzahl ($n=5$), die leichte Kreuzbarkeit bei voller Fertilität der Hybriden, Keimung und Wachstums bis zur Samenreife auf Agarmedien und die Möglichkeit, sowohl spontane als auch induzierte Mutanten isolieren zu können, führte er als vorteilhafte Eigenschaften für die genetische Analyse an. Zudem hat *A. thaliana* das kleinste bisher bekannte Genom höherer Pflanzen (Arumuganthan & Earle 1991). Diese Eigenschaften machten *Arabidopsis* auch für molekularbiologische Untersuchungen interessant. Erst kürzlich erfolgte die Sequenzierung des kompletten Genoms.

F *Gerbera hybrida*

Die zu der Familie der *Asteraceae* (Korbblütler) gehörende Gattung *Gerbera* umfaßt etwa 70 Arten, 40 davon in Südafrika und Madagaskar, die restlichen in Süd- und Ostasien sowie in Südamerika. 1889 wurde die Art *Gerbera jamesonii* erstmals von J.D. Hooker beschrieben. Die *Gerbera*-Züchtung begann Ende des 19. Jahrhunderts mit der Kreuzung von *G. jamesonii*

und *G. viridifolia* von R.I. Lynch in Cambridge. Die daraus hervorgegangene Hybride *Gerbera cantebriensis* ist heute als *Gerbera hybrida* bekannt und gilt als Ursprung der heute kommerziell angebauten Sorten. Wahrscheinlich sind noch weitere Wildformen für züchterische Zwecke genutzt worden, eindeutige Beweise sind jedoch nicht vorhanden (Penningsfeld und Forchhammer 1980). Bedeutender Anbau von Gerbera findet heute vor allem in Holland und zum Teil auch in Deutschland, Frankreich und Italien statt. *Gerbera hybrida* zählt heute zu den meist verkauften Schnittblumen in Europa (Horn 1996). Durch biochemische und molekularbiologische Untersuchungen hinsichtlich der Flavonoidbiosynthese am Lehrstuhl konnten Sorten charakterisiert werden, die sich diesbezüglich besonders für gentechnische Ansätze eignen (Tyrach 1994). So wurden z.B. Sorten beschrieben, die keine Flavonsynthase (FNS) besitzen und somit für die Komplementation mit einer aus anderen Gerbera-Sorten isolierten FNS geeignet scheinen (Martens 2000).

Zielsetzung

Da molekularbiologische und gentechnische Methoden für die Pflanzenzüchtung in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen haben, wird die Anwendung dieser Methoden auch im Zierpflanzenbau immer wichtiger. Dabei stehen neben den auch für den Züchter interessanten Anwendungen wie Sortenschutz und Abstammung vor allem Maßnahmen zur Verbesserung der Qualität im Vordergrund. Besonders zu erwähnen sind dabei die Erzeugung von Resistenzen gegen Schädlingsbefall und die Kreation neuer Phänotypen in bezug auf Habitus und Blütenfarben. Resistenzen werden dabei häufig durch die Übertragung von Resistenzgenen aus Mikroorganismen erzeugt. Das Gleiche gilt für Veränderungen der Wuchsform, die wie bei *Osteospermum ecklonis* und *Petunia hybrida* gezeigt, durch die Expression der aus *Agrobacterium rhizogenes* isolierten *rol*-Gene erreicht werden kann.

Die meisten Ansätze beziehen sich aber auf die Manipulation der Synthese der sekundären Pflanzenstoffe, wodurch neben phänotypischen Veränderungen wie die der Blütenfarbe auch qualitative Verbesserungen wie Abänderung der Tanninzusammensetzung und sogar Erzeugung von Resistenzen durch Ausnutzung von Nebenwegen der "normalen" Biosynthese möglich sind. In diesem Zusammenhang kommt der Flavonoidbiosynthese eine besondere Bedeutung zu, da sie zum größten Teil aufgeklärt ist und da durch Manipulation eines einzelnen Genes schon deutlich sichtbare und meßbare Veränderungen zu beobachten sind. Veränderungen der Blütenfarbe durch Überexpression oder Reprimierung sind z. B. bei *Petunia hybrida*, *Eustoma grandiflorum* und *Dianthus caryophyllus* beschrieben. Daneben wird vermutet, daß die Reprimierung der Flavanon 3-Hydroxylase durch Antisense-Hemmung oder Cosuppression zur Synthese von Phytoalexinen führt. Da neben den am Lehrstuhl etablierten biochemischen Methoden zur Charakterisierung der Flavonoidbiosynthese auch die jeweiligen Gene dazu zum Teil vorliegen, wurde ein besonderes Augenmerk auf deren Verwendung bei Transformationsansätzen gelegt. Außerdem sollen die von anderen Mitarbeitern des Lehrstuhles klonierten Gene durch heterologe Expression in Pflanzen hinsichtlich Ihrer Funktion untersucht werden. Dazu muß ein verläßliches System zur Erstellung von für die Transformation geeigneter Vektoren etabliert werden. Wichtig sind dabei Selektions-Alternativen zum NPT-System und die Lokalisierung des jeweiligen Selektionsmarkers neben der linken Bordersequenz.

Unerlässlich für Transformationsansätze sind reproduzierbare Methoden zur Kultur, Transformation und Erhaltung von *Agrobacterium*-Stämmen, deren Etablierung einen Teil dieser Arbeit darstellt. Daneben soll ein Bestand von verschiedenen *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen aufgebaut werden. Dies ist notwendig um die unterschiedlichen

Wirtsspezifikationen der jeweiligen Stämme bei der Transformation von verschiedenen Arten von Zierpflanzen ausnutzen zu können. So konnte z.B. *Osteospermum ecklonis* nicht mit dem häufig verwendeten Stamm LBA 4404 transformiert werden, während die Verwendung anderer Stämme wie z. B. EHA 105 zu positiven Ergebnissen führte.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden zur Herstellung für die Transformation geeigneter *Agrobacterium tumefaciens* Stämme

Um DNA mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in pflanzliche Zellen übertragen zu können, ist eine vorherige Transformation der Agrobacterien notwendig. Dabei wird der durch verschiedene Klonierungsschritte in *Escherichia Coli* (siehe 2.2) vorbereitete Binär-Vektor (z.B. pBI121, pBIN19) in die vorher kompetent gemachten Agrobacterien übertragen. Die hier verwendeten Methoden und Protokolle beziehen sich ausschließlich auf das Binär-Vektorsystem und nicht auf das aufwendigere co-integrative-System. Die verschiedenen Methoden wurden zwecks Vergleichbarkeit mit dem Stamm LBA 4404 und dem Vektor pBI121 durchgeführt.

2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

A: Freeze-thaw Methode (Holsters *et al.* 1978)

Bei dieser Methode wird der Binär-Vektor während der Auftauphase schockgefrorener Bakterien übertragen. Der relativ einfachen und schnellen Ausführung steht eine geringe Transformationsrate von ca. 10^{-3} Transformanten pro μg DNA gegenüber.

Ausführung

1. Per Einzelkolonie werden 2-3 ml YEB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) angeimpft und für 24-36 h bei 28°C und 200 rpm kultiviert.
2. Mit der Starterkultur werden 50 ml YEB (Antibiotika) angeimpft und bei 28°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 wachsen gelassen
3. Die Kultur wird 10 min auf Eis vorgekühlt, bei 4°C und 4000 g für 10 min pelletiert und in 200 ml kaltem dH₂O resuspendiert
4. Dieser Waschschrift wird 3x wiederholt, anschließend werden die Zellen in 1 ml 20 mM CaCl₂ (kalt) Lösung resuspendiert, in 100 μl Aliquots portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren

B: Elektroporation

Die Elektroporation stellt eine einfache und zeitsparende Methode zur Übertragung von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien (*Agrobacterium tumefaciens* oder *Escherichia coli*) dar. Die gute Reproduzierbarkeit und hohe Transformationsraten von 10^8 - 10^9 Transformanten bei *E. coli* und 10^4 - 10^5 Transformanten bei *Agrobacterium tumefaciens* sind weitere Vorteile dieser Methode.

Ausführung

1. Aus einer gut gewachsenen Übernachtskultur werden 4 ml zum Animpfen von 400 ml YEB genutzt
2. Die Suspension wird bei 28°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 wachsen gelassen, für 10 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei 4°C und 4000 g abzentrifugiert.
3. Das Pellet wird 3x mit einer kalten HEPES-Lsg. (200ml, 1 mM, pH 7,5) gewaschen und in 5 ml einer HEPES-Glycerin-Lsg. (1 mM, pH 7,5, 10 % Glycerin) resuspendiert.
4. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 800 µl der HEPES-Glycerin-Lsg. aufgenommen, in 50 µl Aliquots portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.1.2 Transformation der Plasmid-DNA

Je nach gewählter Methode werden die kompetenten Zellen mit Hilfe der folgenden Protokolle mit den Plasmiden transformiert.

A: Freeze-thaw Methode

1. Ca. 1 µg Plasmid-DNA wird zu den gefrorenen Zellen gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert
2. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wird der Ansatz für 2 h bei 28°C und 150-200 rpm geschüttelt.
3. Die Zellen werden pelletiert, in 100 µl YEB aufgenommen und auf Selektionsplatten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen
4. Nach 2-3 Tagen bei 28°C sollten einzelne Kolonien gewachsen sein, die dann überprüft werden sollten.

B: Elektroporation

1. Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit 10-50 ng Plasmid-DNA (1-5 µl) versetzt. Die DNA sollte in H₂O oder verdünnter TE-Lsg gelöst sein, um das Durchbrennen der Küvetten zu verhindern.
2. Die Suspension wird in eine vorgekühlte 1 mm Küvette überführt und durch leichtes Klopfen zwischen die Electroden gebracht.
3. Die Küvette wird im Elektroporator (ECM 395 der Firma BTX) fixiert und durch Betätigen des Startknopfes wird ein Puls (1,5 kV, 5-6 msec) ausgelöst.
4. Sofort 500 µl vorgewärmtes YEB-Medium (28°C) dazugeben (in die Küvette), kurz mischen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
5. Der Ansatz wird für 2h bei 28°C und 150-200 rpm geschüttelt und auf Selektionsplatten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen.
6. Nach 2-3 Tagen bei 28°C sollten einzelne Kolonien gewachsen sein, die dann per Plasmid-Isolierung und Restriktionsverdau überprüft werden sollten.

C: Triparental Mating (Ditta *et al.* 1980)

Das Ziel der vorliegenden Methode ist die Überführung der neu konstruierten und in *Escherichia coli* klonierten Plasmide in Agrobakterien, die als Überträger der DNA in Pflanzenzellen fungieren können. Dazu werden drei Bakterienstämme benötigt:

- (1) *E. coli*-Stamm DH5α mit dem zu übertragenen Plasmid (Kanamycinresistenz)
- (2) *E. coli*- Stamm HB 101 als Helferstamm mit Transferfunktion im Plasmid
- (3) *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA 4404 (Streptomycin- und Rifampicinresistenz)

Die Agrobakterien werden für 24 Stunden bei 28°C und 215 rpm in 10 ml CPY-Flüssigmedium angezogen. Für die *E. coli*-Stämme ist eine Wachstumsdauer von 12 h (37°C, 215 rpm, LB-Medium) ausreichend. Von diesen Kulturen werden je 0,5 ml und 1 ml der Agrobakterienkultur zu 5 ml CPY gegeben. Die Suspension wird zentrifugiert (5 min, 2000 rpm), das Pellet in 0,5 ml CPY resuspendiert und auf festes CPY-Medium (9 cm Ø Petrischalen) ohne Antibiotika aufgetropft. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen (28°C) wird mit einer Probe von jeder Kolonie 0,5 ml CPY angeimpft. Von dieser Suspension wird

eine Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-4}) hergestellt, von der je 100 μ l auf Selektionsplatten mit Antibiotika ausgestrichen werden, die anschließend für 2 Tage bei 28°C inkubiert werden. Die gewachsenen Einzelkolonien der höchsten Verdünnungsstufe werden auf neue Selektionsschalen ausplattiert und können sofort einer Plasmidanalyse unterzogen werden.

2.1.3 Überprüfung der transformierten Agrobacterien

Es soll überprüft werden, ob die auf Selektionsmedium gewachsenen Kolonien das transformierte Plasmid erhalten. Dazu wird Plasmid-DNA isoliert und durch einen Restriktionsverdau überprüft. Drei verschiedene Methoden wurden getestet.

A: Inkubation mit Lysozym und Proteinase K

1. 1-2 ml einer Übernachtskultur werden pellettiert, zweimal mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen und in A: 50 μ l Proteinase K (5 mg/ml) oder B: 50 μ l Lysozym (10 mg/ml) aufgenommen.
2. Nach 30minütiger Inkubation bei A: 65°C und B: RT wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Quantum Plasmid Miniprep Kits der Firma Biorad isoliert und mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese überprüft.

B: Überprüfung durch Gesamt-DNA Isolierung

1. 1-2 ml einer Agro-Übernachtskultur werden pellettiert, zweimal mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen und in 50 μ l Proteinase K (5 mg/ml) aufgenommen.
2. Nach intensivem Vortexen wird der Ansatz mit 160 μ l SDS (10 %) versetzt und für 2 h bei 65°C inkubiert.
3. Der auf Raumtemperatur abgekühlte Ansatz wird phenolisiert und anschließend mit 0,6 Vol Isopropanol gefällt.
4. Die erhaltene Gesamt-DNA wird in *E. coli* transformiert, per Mini-Präp. Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese überprüft.

C: Überprüfung durch direkte Plasmid-DNA Isolierung

Mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kits der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH wurde Plasmid-DNA direkt aus *Agrobacterium* isoliert und mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese überprüft.

2.2 Methoden zur Klonierung für die Transformation geeigneter Vektoren

2.2.1 Kultur und Plasmidpreparation von *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden als Flüssig- oder Festkultur auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37°C kultiviert.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Kits der Firmen Biorad und PEQLAB verwendet.

2.2.2 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Die Versuche wurden mit Restriktionsenzymen der Firmen Promega, Pharmacia und MBI Fermentas durchgeführt. Für die Gelelektrophorese wurde TBE-Puffer, Agarose der Firma Seakem und Etidiumbromid als DNA-Färbereagenz verwendet. Die Versuche wurden nach Maniates *et al.* durchgeführt.

2.2.3 Gelelution und Ligation

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Kits QIAquick und QIAEX[®]II der Firma QIAGEN aus Agarosegelen eluiert.

Ligationen wurden mit nach folgender Formel berechneten DNA-Mengen bei 22°C für 3h durchgeführt.

$$\frac{\text{ng Vector} \times \text{bp Insert}}{\text{bp Vector}} \times 3 = \text{ng Insert}$$

Für Klonierungen im jeweiligen Binärvektor wurden 800 ng DNA pro Ansatz verwendet. Die Ligationen des Vektors zur Verwendung mit der Genkanone wurden mit 200 ng DNA pro Ansatz durchgeführt. Mittels PCR wurden für den jeweiligen Vektor (Binärvektoren und Vektoren zum Schießen) geeignete Schnittstellen am 5` bzw. am 3`-Ende eingefügt.

2.2.4 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* -Zellen wurde mit Hilfe des Electroporators ECM 395 der Firma BTX nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Präparation der kompetenten Zellen

Die für die Arbeiten verwendeten Bakterien (Stämme *DH5 α* , *Easypore*) wurden mittels Einzelkolonie und Übernachtskultur (1 l LB-Medium) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 wachsen gelassen. Nach 10 minütiger Abkühlung auf Eis erfolgten 4 Waschschriffe mit je 1 Volumen, 2 x 0,5 Volumen und 0,02 Volumen kaltem, autoklaviertem dH₂O. Das Pelletieren findet bei 4000 g, 4°C und 15 min statt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt werden die Zellen in einer kalten, vorher steril filtrierte Lösung (1 mM HEPES, pH 7,5, 10 % Glycerin) resuspendiert und als 40 μ l Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren.

Transformation mit Plasmid-DNA

Die schockgefrorenen Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 1-10 ng Plasmid-DNA vermischt und direkt zwischen die Elektroden der vorgekühlten Küvette pipettiert. Durch Kondensatorentladung wird ein Puls erzeugt (1,5 kV für 5-6 msec), der zu einer kurzfristigen Porenbildung in der Zellwand führt, wodurch die Plasmid-DNA in die Zelle gelangen kann. Die Zugabe von 500 μ l vorgewärmtem (37°C) LB-Medium sollte sofort nach Auslösung des Pulses erfolgen, um für die Bakterien ideale Bedingungen zur Regeneration zu schaffen. Die Zellen werden anschließend für 1 h bei 37°C geschüttelt und dann auf LB-Medium mit dem jeweiligem Antibiotikum ausplattiert.

Die auch verwendete Hitzeschocktransformation wurde nach Maniates *et al.* durchgeführt.

2.3 DNA-Extraktion aus pflanzlichem Gewebe

Es wurden 2 Methoden zur Isolierung von genomischer DNA aus Blattmaterial von *Petunia hybrida* angewendet. Methode 1 erlaubt eine relativ schnelle und zuverlässige Isolierung von genomischer DNA aus geringen Mengen Blattmaterial mit einer für die PCR ausreichenden Reinheit. Methode 2 beschreibt ein aufwendigeres Verfahren, bei dem größere Mengen genomischer DNA höherer Qualität isoliert werden können.

Methode 1

1. 1-2 cm² Blattmaterial (*in vitro* oder *ex vitro*) werden mit einer am Ende zusammenschmolzenen 1000 μ l Spitze in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zerquetscht.

2. Nach Zugabe von Glasbeads und 200 μ l 2x CTAB-Puffer wird der Ansatz gründlich gevortext und für 10 min bei 60°C inkubiert.
3. Der Ansatz wird mit 200 μ l Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gevortext und 5 min zentrifugiert
4. Durch Zugabe von 200 μ l EtOH zum Überstand und anschließendem Zentrifugieren wird die DNA gefällt.
5. Das Pellet wird mit EtOH gewaschen, getrocknet und in 50-100 μ l TE-Puffer oder dH₂O aufgenommen
6. 1-5 μ l (je nach Ausbeute) wurden zur PCR-Analyse eingesetzt

Methode 2

1. 1-3 g frisches Blattmaterial werden unter flüssigem Stickstoff sorgfältig gemörsert, mit 15 ml Extraktionspuffer versetzt und gründlich bis zum Auftauen der Probe gevortext
2. Die Probe wird mit 1 ml 20% SDS vermischt, für 10 min im Wasserbad bei 60°C inkubiert und mit 5 ml 5M KAc versetzt.
3. Nach 30minütigem Kühlen im Eiswasserbad wird für 30 min bei 37°C ein RNase-Verdau angesetzt (mit 25 μ g RNase)
4. Durch Zugabe von 15 ml Isopropanol und leichtem Mischen kann mit Hilfe einer Glaspipette durch leichtes Drehen DNA am Glas fixiert und isoliert werden
5. Die DNA wird mit 70% EtOH gewaschen, zweimal mit Phenol und zweimal mit Chloroform gereinigt und mit EtOH gefällt.
6. Das entstandene Pellet kann in dH₂O oder TE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt werden.

2.4 Methoden zur Gewebekultur

Die Einzelkomponenten (Salze, org. Bestandteile, Antibiotika, Phytohormone) der komplexen Medien zur Erhaltung und Transformation der bearbeiteten Kulturen wurden nach Herstellerangaben (Sigma, Duchefa) angesetzt. Arbeiten mit sterilem Pflanzenmaterial wurden in der Reinraumwerkbank, Transformationsversuche in der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

2.4.1 Kulturmedien

Die Zusammensetzung der benutzten Medien, wobei MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) als Basalmedium dient, ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Antibiotika wurden als sterilfiltrierte Lösungen nach dem Autoklavieren in das auf 50°C abgekühlte Medium gegeben. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren (20 min, 1,1 bar, 121°C) mit 1 N KOH auf pH 5,7 eingestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kulturmedien

Medien	MS-Medium	Gerbera-Medium
Makronährstoffe (mg/l)		
KH ₂ PO ₄	170	85
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	185
KNO ₃	1900	950
NH ₄ NO ₃	1650	825
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	220
Ca(NO ₃) ₂	---	
K ₂ SO ₄	---	
Mikronährstoffe (mg/l)		
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3	22,3
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6	8,6
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	0,025
KJ	0,83	0,83
FeNaEDTA	37,3	37,3

Vitamine (mg/l)		
Myo-Inosit	100	100
Nicotinsäure	0,5	0,5
Thiamin HCL	0,1	0,1
Pyridoxin HCL	0,5	0,5
Glycin	2	2
Saccharose	30 g/l	20 g/l
Agar	7 g/l	8 g/l

Tabelle 2: Gamborg B5 Vitamine

Vitamine (mg/l)	
Myo-Inosit	100
Nicotinsäure	1,0
Thiamin HCL	10,0
Pyridoxin HCL	1,0

2.4.1.1 Kulturmedien *Petunia hybrida*

Das *in vitro* Pflanzenmaterial wurde auf MS-Medium in 20 ml Reagenzgläsern oder 500 ml Weckgläsern per Sproßspitzen kultiviert. Zur Regeneration von Blattexplantaten wurde MS-Medium mit B5-Vitaminen, 1 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA verwendet (Regenerationsmedium). Als Selektionsmedium dient das Regenerationsmedium mit 100 mg/l Kanamycin und 250 mg/l Cefotaxime. Zur Sproßregeneration aus putativ stark wachsendem Kallus, der sich aus transformiertem Gewebe nach 4-6 Wochen auf Selektionsmedium gebildet hat, wurde ein Selektionsmedium mit einem um den Faktor 10 reduzierten NAA-Gehalt verwendet.

2.4.1.2 Kulturmedien *Gerbera hybrida*

Für die Gewebekultur von *Gerbera hybrida* wurde ausschließlich Daishin-Agrar verwendet. Das zur Regeneration verwendete Medium setzte sich aus den oben beschriebenen organischen und anorganischen Substanzen zusammen, als Phytohormone wurden IAA (0,1 mg/l), BAP (1,0 mg/l) und Zeatin (1,0 mg/l) eingesetzt. Zur Selektion wurde das Regenerationsmedium mit Kanamycin (25 mg/l) und je nach Phase des Selektionsprozesses

mit Cefotaxime (62,5-250 mg/l) versetzt. Zur Bewurzelung wurde folgendes Medium mit 0,25 mg/l IBA und 8 g/l Daishin-Agrar verwendet.

Gerbera Bewurzelungsmedium

MS-Makro´s	50 %
MS-Mikro´s	50 %
MS-NaFeEDTA	50 %
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	43 mg/l
L-Tyrosine	50 mg/l
Myo-Inosit	50 mg/l
Nicotinsäure	5 mg/l
Thiamin HCL	15 mg/l
Pyridoxin HCL	5 mg/l
Sucrose	45 g/l

2.4.1.3 Kulturmedien *Osteospermum ecklonis*

Als Grundlage für die Gewebekulturarbeiten mit *Osteospermum ecklonis* wurde das oben angeführte MS-Medium genutzt. Zur Vermehrung und Bewurzelung der Pflanzen *in vitro* wurde MS-Medium ohne den Zusatz von Phytohormonen verwendet.

Dem Regenerationsmedium wurde IAA (2 mg/l) und BA (1 mg/l) zugegeben, das Selektionsmedium enthielt zusätzlich Kanamycin (100 mg/l) und Cefortaxime (100 mg/l). Um gesunde Pflanzen aus vitrifizierten Sproßen zu regenerieren, wurde dem MS-Basalmedium 0,5 mg/l IAA, 0,3 mg/l BA und 0,6 mg/l GA3 zugegeben.

2.4.1.4 Kulturmedien *Pelargonium x zonale*

Die für die Arbeiten verwendeten Medien (Keimungs-, Regenerations- und Selektionsmedium) basieren auf dem oben genannten MS-Medium mit folgenden Abweichungen: Das Keimungsmedium setzt sich aus dem MS-Basalmedium mit 50% der Makronährstoffe, 20 g/l Saccharose und 7 g/l Zucker zusammen. Vitamine und Phytohormone sind nicht enthalten. Das Regenerationsmedium besteht aus dem MS-Basalmedium mit 50% der Makronährstoffe und folgenden Phytohormonzusätzen: 0,5 mg/l TDZ, 0,01 mg/l IBA und 1 mg/l TIBA. Zur Selektion wurde dem Regenerationsmedium 500 mg/l Cefotaxime und 10 mg/l Hygromycin zugesetzt.

2.4.1.5 Kulturmedien *Matthiola incana*

Zur Untersuchung der Regeneration und Vermehrung von *Matthiola incana in vitro* wurde wiederum das MS-Basalmedium mit einigen Abänderungen verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten Samen der Linien 1-16, die hinsichtlich der Flavonoidbiosynthese als isogen anzusehen sind. Daneben wurden Samen der Linien 17, 18 und 19 verwendet, die jeweils einen klar charakterisierten Block in der Flavonoidbiosynthese besitzen. Die nach folgender Methode sterilisierten Samen wurden auf 1/10 MS-Basalmedium gelegt und für 8-10 Tage im Dunkeln bei 24°C inkubiert.

- 2 min mit 70% EtOH waschen
- 15 min mit 3% NaOCl waschen
- 3 x 5 min mit dH₂O spülen

Die sich nach der Keimungsphase gebildeten Hypokotyle wurden von den Kotyledonen sowie der Samenschale mit Wurzel befreit, in 5-7 mm lange Stücke zerteilt und auf die jeweilige Medienvariante (MS-Basalmedium mit verschiedenen Phytohormonvarianten) aufgelegt (siehe Ergebnisteil).

2.4.1.6 Kulturmedien *Arabidopsis thaliana*

Da es für die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* kaum geeignete Protokolle zur Regeneration von Pflanzen aus verschiedenen Organen (Blatt, Stengel, Wurzel) gibt, wurden die Transformationsversuche mittels der "dip"- Methode durchgeführt.

Die dazu erforderlichen Pflanzen wurden wie folgt angezogen: 10-15 Samen werden auf angefeuchtete TKS II-Erde in 9 cm Töpfe ausgesät, deren Boden mit einer ca. 1 cm Perlit-Schicht bedeckt ist. Die Töpfe werden mit Untersetzern in einem Anzuchtkasten bei 22°C, 65% Luftfeuchte, 16 h (Tag) und 16°C, 75% Luftfeuchte, 8 h (Nacht) kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde mit 1-2 cm Wasser im Untersetzer gegossen. 4 Wochen nach der Aussaat wurde mit einer 1:5 Verdünnung der MS-Makrosalze gedüngt.

Die nach der Transformation geernteten Samen wurden sterilisiert und zur Selektion auf MS-Basalmedium mit 50 mg/l Kanamycin und 50 mg/l Betabactyl ausplattiert.

2.5 Transformationsmethoden mit *Agrobacterium tumefaciens*

2.5.1 Transformation von *Petunia hybrida*

Die Transformation der *Petunia hybrida* Mutante RL 01 wurde in Anlehnung an die "leaf-disk" Methode von Horsch et al. (1985) mit einigen Abänderungen durchgeführt. Blattmaterial aus dem Gewächshaus und *in vitro*-Material wurde für die Ansätze verwendet. *In vitro* Material wurde durch Samensterilisation (1,5 min in 1% NaOCl und 3 x 5 min mit dH₂O waschen) und anschließender Kultivierung auf 1/10 MS-Basalmedium gewonnen. Nach 2-tägiger Dunkelphase wurden die Samen unter Standardbedingungen im Kulturraum gehalten. Erste Keimungen waren nach weiteren 2-3 Tagen zu beobachten. Blattmaterial von Gewächshauspflanzen wurde durch 5 minütiges Waschen in NaOCl (1 %) und 3 minütigem Spülen mit dH₂O sterilisiert und anschließend für Transformations- und Regenerationsansätze genutzt.

Vor der Transformation wurden die unter sterilen Bedingungen in ca. 0,5 cm² große Vierecke zerschnittenden Blattexplantate für 2-3 Tage bei 24°C im Dunkeln auf Regenerationsmedium vorinkubiert. Dabei sollten die Blattstückchen möglichst an allen Seiten angeschnitten werden, um den Agrobakterien bei der Infektion eine möglichst große Angriffsfläche bieten zu können.

Der für die Transformation verwendete *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA 4404 (Hoekema et al. 1983) mit dem jeweiligem Binärvektor (pBIN19, pBI121, pGPVT) wird für 24-36 h bei 28 °C und 200 rpm mit den zur Selektion notwendigen Antibiotika (Rifampicin 50 mg/l, Streptomycin 300 mg/l, Kanamycin 50 mg/l) in YEB-Medium angeschüttelt. Unter sterilen Bedingungen werden von der gut gewachsenen Suspension 3-5 ml zu 30 ml flüssigem Regenerationsmedium in eine 9 cm Ø Petrischale pipettiert. Die vorinkubierten Blattexplantate werden zur Infektion mit den Agrobakterien für 5 min in die Bakteriensuspension getaucht, wobei auf eine vollständige Benetzung des Explantates zu achten ist. Durch leichtes Abtupfen auf sterilem Filterpapier wird das Explantat kurz getrocknet und anschließend auf Regenerationsmedium für 2 Tage bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Die anschließend anhaftenden Bakterien werden durch 3 x 5 minütiges Waschen mit dH₂O entfernt, wobei der mittlere Waschschrift mit einer Cefotaxime-Lsg. (250 mg/l) durchgeführt wird. Anschließend werden die Explantate auf sterilem Filterpapier kurz getrocknet und auf Selektionsmedium überführt. Die Kultur erfolgt für 16h bei 22°C und mittleren Lichtstärken. Alle 10-14 Tage werden die Explantate zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes und zur Erneuerung der Phytohormonwirkung auf frisches Medium

umgesetzt. Die sich in einem Zeitraum von 4-8 Wochen bildenden putativ transgenen Kalluskulturen werden zur Unterstützung der Sproßbildung auf ein Regenerationsmedium mit einem verringerten NAA-Gehalt transferriert. Regenerierende Sproße werden bei einer Größe von 1-2 cm abgenommen und zum weiteren Wachstum auf MS-Basalmedium mit 50 mg/l Kanamycin in große Reagenzgläser überführt. Die Bewurzelung in Anwesenheit von Kanamycin ist ein erster Test, um zu überprüfen, ob die Sproße die Fremd-DNA aufgenommen haben und transgen sind.

Ein weiterer Test besteht darin, von auf Selektionsmedium regenerierten Pflanzen Blattmaterial zu entnehmen und mit Wildtyp-Blattmaterial als Kontrolle auf Selektionsmedium zu legen. Im Gegensatz zur Kontrolle sollte sich eindeutig Kallus und anschließend Sproße bilden.

2.5.2 Transformation von *Gerbera hybrida*

Für die Regenerations- und Transformationsversuche wurde die Sorte Terra Regina der niederländischen Firma Terra Nigra verwendet. Das *in vitro* Pflanzenmaterial wurde in 250 bzw 500 ml Weckgläsern unter Standardbedingungen mit oben beschriebenen Medien kultiviert. Alle 4-6 Wochen wurden die Pflanzen zur Vermehrung auf neues Medium umgesetzt. 1 Woche vor der Infektion mit den Agrobakterien wurden die 4-6 Wochen alten Pflanzen von den Wurzeln befreit und zur Vorkultur auf Regenerationsmedium transferriert. Für die Infektion wurden 0,5-0,7 cm lange Petiolen verwendet, die in einer 6 cm Ø Petrischale (ca. 100 Explantate pro Schale) mit 6 ml flüssigem Regenerationsmedium und 30 µl einer gut gewachsenen Agrobakterien Kultur für 2 Tage im Dunkeln bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert werden. Für die Transformation wurde der Agrobakterien-Stamm C58 (McBride und Summerfelt, 1990) mit dem cointegrativen Vector pGV 2260 verwendet. Die Bakterien wurden mit den geeigneten Antibiotika (Rifampicin 50 mg/l, Streptomycin 300 mg/l, Sepctinomycin 100 mg/l) in YEB-Medium bei 28 °C und 200 rpm angezogen. Nach der Infektionsphase werden die Explantate 6 x 5 min (3x mit dH₂O, 3x mit 250 mg/l Cefotaxime) in sterilen Teesieben gewaschen und anschließend auf Regenerationsmedium mit 250 mg/l Cefotaxime gelegt, wobei auf Grund von phenolischen Ausscheidungen höchstens 12-15 Explantate pro Petrischale ratsam sind. Nach einer Woche beginnt die Selektion mit 25 mg/l Kanamycin im Medium während die Konzentration von Cefotaxime auf 125 mg/l reduziert wird. Die ersten 2 Wochen der Regenerationsphase werden die Kulturen zur Induzierung der Sproßbildung (Pierik *et al.* 1975) im Dunkeln gehalten. Danach findet der Transfer der

Nach einer 8-tägigen Inkubationszeit bei 24°C im Dunkeln werden Samenschale mit Wurzeln und die Kotyledonen entfernt. Das verbliebene Hypocotyl wird in 5-6 mm lange Abschnitte zerteilt und zur Präinkubation auf Regenerationsmedium für 8d im Kulturraum bei Standardbedingungen vorbehandelt.

Da zur Selektion Hygromycin anstatt von Kanamycin genutzt wird, muß dementsprechend ein Vektorsystem mit Hygromycin-Resistenz auf der T-DNA verwendet werden. In diesem Fall war es der Agrobakterien-Stamm EHA 101 (Hood *et al.* 1986) mit dem Binärvektor pKHG₃ (Rifampicin 50 mg/l, Hygromycin 50 mg/l, Kanamycin 50 mg/l). Die Bakterien wurden für die Transformation wie folgt vorbereitet:

- 24-36 h Kultur bei 28°C, 200 rpm in YEB mit Antibiotika
- 1 ml Bakteriensuspension mit dH₂O 3x waschen
- Bakterien in 25 ml dH₂O resuspendieren

Die vorinkubierten Hypocotyl-Explantate werden für 20 min unter leichtem Schütteln mit der vorbereiteten Agrobakterien-Suspension infiziert. Anschließend werden die Explantate für 2 d auf Selektionsmedium ohne Hygromycin Standardbedingungen im Kulturraum ausgesetzt. Die Selektion beginnt danach mit dem Transfer auf Selektionsmedium mit Hygromycin (10 mg/l), der routinemäßig alle 10-14 Tage wiederholt wird. Sich bildende Sprosse werden abgenommen und zur weiteren Kultivierung bzw. Wurzelbildung auf MS-Basalmedium in Babygläser umgesetzt.

Ansätze mit Gewächshausmaterial von *Pelargonium x zonale* und *Pelargonium x peltatum* wurden nach ähnlichem Muster mit einigen Abweichungen bei der Medienbeschaffenheit und der Sterilisationsmethode durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden Petiolen und Blattstücken gewählt, deren Sterilisation wie folgt vorgenommen wurde:

- 5 min in 70 % EtOH waschen
- 20 min in 1 % NaOCl waschen
- 3 x 5 min in dH₂O spülen

Die so vorbereiteten Explantate werden wie oben beschrieben einer Präkulturphase unterzogen und anschließend transformiert. Aufgrund von phenolischen Ausscheidungen wird dem Regenerations- und Selektionsmedium jeweils 0,5 mg/l PVP (Polyvinyl Pyrrolidon) beigemischt.

2.5.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die wie unter 2.4.1.5. beschrieben kultivierten Pflanzen kamen nach ca. 6 Wochen zur Blüte. Ca. 1 Woche nach Zurückschneiden der Blüten kam es zu einer vermehrten Bildung von neuen Blütenständen. Pflanzen aus diesem Stadium wurden für die Transformationsversuche genutzt. Für die Transformation wurden 400 ml einer gut gewachsenen (OD_{600} 0,7-0,8) Agro-Suspension (YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika) durch mehrmaliges Zentrifugieren und Resuspendieren gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 400 ml MS 50% mit 50 g Zucker, 0,5 g MES, 0,01 mg BAP und 50 μ l Silvet, pH 5,7 aufgenommen. Die 7 Wochen alten Pflanzen mit verschiedenen Blütenstadien werden für 3-5 sec. kopfüber bis einige Zentimeter über der Erde in die vorbereitete Bakteriensuspension getaucht, kurz abgetrocknet und mit einer Plastiktüte abgedeckt (wird am nächsten Tag wieder entfernt) in den Kulturraum gestellt. Die behandelten Pflanzen werden noch 2-3 x gegossen und einmal gedüngt. Jeweils nach 4, 5 und 6 Wochen werden Samen geerntet und über Nacht bei 50°C im Trockenschrank getrocknet. Nach folgender Methode werden die Samen sterilisiert und auf Selektionsmedium ausplattiert (ca. 100 mg pro Schale).

- 20-30 min 80 % EtOH, 0,1 % Tween
- 1 min 4% NaOCl, 0,1% Triton
- 5-6 x je 2-3 min in dH₂O spülen

Die Platten werden bei Standardbedingungen im Kulturraum bebrütet. Die nach 5-7 Tagen keimenden Sprosse werden auf neue Platten umgesetzt. Zur Unterstützung des Wurzelwachstums werden die Pflanzen auf das Medium in der Platte gelegt, die dann stehend im Kulturraum fixiert wird. Bei einer Größe von 2-3 cm und ausreichenden Wurzeln werden die Pflanzen in gedampfte TKS II-Erde pikiert (siehe 2.4.1.5.).

2.6 Transiente Genexpression mittels Genkanone

Der direkte Gentransfer in pflanzliche Zellen wurde notwendig, da sich im Gegensatz zu den meisten dicotylen Pflanzen, die monocotylen Pflanzen nicht oder nur sehr schwierig mit *Agrobacterium tumefaciens* transformieren lassen. Es wurden zahlreiche Methoden eines direkten Gentransfers in monocotyle Pflanzen entwickelt (Potrykus, 1990), die eine transiente oder stabile Genexpression in der Empfängerpflanze ermöglichten. Dabei erwies sich die DNA-Übertragung mittels stark beschleunigter DNA-beladener Mikroprojectile (Gold oder

Wolfram) als besonders effizient und reproduzierbar, so daß mit dieser Methode alle bedeutenden Getreidearten stabil transformiert werden konnten (Vasil, 1994). Bei dieser Methode kommt dem Fixieren der DNA an die Goldpartikeln "coating" besondere Bedeutung zu, weswegen zwei verschiedene Methoden angewandt wurden.

Methode 1 (Glycerin als Hilfsmittel)

Bei dieser Methode werden die gereinigten Goldpartikel in einer Glycerin-Lsg. resuspendiert, mit DNA beladen, durch leichtes Schütteln und Zentrifugieren gewaschen und in 100 % EtOH aufgenommen. Im Einzelnen werden die Partikel wie folgt vorbereitet:

Vorbereitung der Microcarrier

- 60 mg Goldpartikel (Biorad, 1 µm) für 15 min mit 70 % EtOH waschen
- 3 x mit dH₂O waschen und jeweils durch kurzes Zentrifugieren pelletieren
- in sterilem 50 % Glycerin resuspendieren (Endkonzentration 60 mg/ml)

Coating der DNA auf die Microcarrier

Für 6 Schüsse werden 50 µl der vorbereiteten Microcarrier unter Vortexen mit folgenden Substanzen vermischt:

- 5 µl DNA (1 µg/µl)
- 50 µl CaCl₂ (2,5 M)
- 20 µl Spermidin (0,1 M, alle 4 Wochen neu angesetzt)

Das Gemisch wird für 2-3 min gevortext, 1 min sich setzen gelassen und für 2 sec zentrifugiert. Anschließend wird erst mit 140 µl 70% und dann mit 140µl 100% EtOH gewaschen, wobei das Pellet nicht resuspendiert und abzentrifugiert wird. Unter leichtem Schütteln werden dann die Microcarrier vorsichtig in 48 µl 100% EtOH aufgenommen und durch kurzes Vortexen gut resuspendiert. Je 8 µl der Suspension werden pro Schuß eingesetzt.

Methode 2 (ohne Glycerin)

Anstatt von Glycerin als Hilfsmittel werden größere Mengen an DNA und Gold-Partikeln eingesetzt. Außerdem wird die Fixierung der DNA an den Partikeln durch stärkeres Vortexen und Zentrifugieren unterstützt. Nach folgendem Protokoll werden die Partikel vorbereitet:

6 mg DNA (Biorad, 1 μ m) werden zweimal mit dH₂O gewaschen und gründlich abzentrifugiert. Das Goldpellet wird direkt in 30 μ l DNA (1 μ g/ μ l) resuspendiert und nach gründlichem Mischen mit 70 μ l dH₂O versetzt. Das Fällern der DNA auf die Goldpartikel wird durch Zugabe von 100 μ l CaCl₂ (2,5 M, sterilfiltriert) erreicht. Nach gründlichem Mischen werden 40 μ l Spermidin (0,1 M, sterilfiltriert) dazugegeben und wiederum wird gründlich gemischt. Das Gemisch wird dann für 10-15 min bei 4°C geschüttelt, kurz abzentrifugiert und zweimal mit 100% EtOH gewaschen. Die Partikel werden dann in 35 μ l 100% EtOH resuspendiert, wovon pro Schuß 10 μ l verwendet werden.

2.7 Analyse von putativ transgenem Pflanzenmaterial

Für die Analyse von putativ transgenem Pflanzenmaterial wurde einerseits die Integration der übertragenden DNA ins pflanzliche Genom mittels PCR überprüft und andererseits die Funktion des übertragenden Gens anhand dessen Expression und damit verbundener Enzymaktivität bzw. phänotypischer Ausprägung untersucht.

2.7.1 Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität

Die Untersuchung der transformierten Petunien- bzw. Pelargonienpflanzen auf Einbau und Funktion des übertragenen Reportergens erfolgte nach dem Protokoll von Jefferson et al. (1987). Dabei wurde die funktionelle Fremdgenexpression anhand des Reportergens *uidA* nachgewiesen.

Blattexplantate der transgenen Pflanzen wurden mit der Färbelösung nach Jefferson (940 μ l 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0; 1,6 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure (X-Gluc); 40 μ l β -Mercaptoethanol; 20 μ l DMSO) beträufelt und für 12-16-h bei 37°C inkubiert. Zur besseren Infiltration der Färbelösung wurde vor der Inkubation für 5 min ein Vakuum angelegt. Nach der Inkubation wurde das Chlorophyll durch leichtes Schütteln für jeweils 10 min in 70%igem Ethanol und 80%igem Aceton extrahiert. Die Aktivität der β -Glucuronidase kann anhand von blauen Farbstoffkomplexen im Bereich der exprimierenden Zellen nachgewiesen werden.

2.7.2 Standard PCR-Techniken

Für Standard PCR-Techniken wurde die AGS Gold™-Polymerase der Firma Hybaid und das Expand™ High fidelity PCR System der Firma Boehringer verwendet. Die Primer wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) bezogen. Ein Ansatz besteht jeweils aus 10x Reaktionspuffer, Primern, dNTP's, Polymerase und einer DNA-Probe. Folgende Bedingungen wurden routinemäßig angewendet:

90 sec Denaturierung bei 95°C

90 sec Annealing bei 55°C

90 sec Synthese bei 72°C

35-40 Zyklen wurden angesetzt, zum Schluß wurde zum Auffüllen ein 10minütiger Schritt bei 72°C durchgeführt. Die vorher mittels Gradienten-PCR optimierte Annealing-Temperatur richtete sich je nach Länge und G/C-Gehalt der Primer. Die zur Erzeugung von für die Subklonierung notwendigen Schnittstellen wurde mit neu synthetisierten Primern durchgeführt (siehe Anhang).

2.7.3 PCR-Überprüfung der Integration der Fremd-DNA ins pflanzliche Genom

Als erstes wurde die Übertragung des Resistenzgens *npt II* mit folgenden Primern überprüft: Der 5'-Primer (nos 5':5'-CCCCTCGGTATCCAATTAGAG-3') bindet 33 bp upstream vom *nos* ATG in der *nos* Promotorregion. Der 3'-Primer (nos 3':5'-CGGGGGGTGGGCGAAGAACTCCAG-3') bindet 150 bp vor dem Stop-Codon (TAA) am 3'-Ende. Das zu erwartende PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 1000 bp. Zur Kontrolle wurden 2 weitere Primer verwendet (5'-T-DNA: 5'-GAGCGGAGAATTAAGGGAGTCACGTTATG-3' und 3'-T-DNA: 5'-GTTCTGTCG-TAATGATATCGGCACCTTCG-3'), die auch im Bereich des *nos*-Promotors sowie am 3'-Ende des Neomycin Phosphotransferase Genes binden. Daraus resultiert ein PCR-Produkt von 1334 bp. Da es vorkommen kann, daß die Übertragung der DNA unterbrochen wird und somit nur Teile der T-DNA in das pflanzliche Genom integrieren, wurde das Vorhandensein des jeweils übertragenden Genes mittels spezifischer Primer gesondert überprüft

Die Überprüfung wurden routinemäßig mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 min Denaturierung bei 94°C

2 min Annealing bei 63°C

3 min Synthese bei 72°C

35 Zyklen wurden pro Ansatz durchlaufen. Ein Ansatz bestand aus 50 µl, von denen jeweils 25 µl per Gelelektrophorese analysiert wurden.

2.8 Inhaltsstoffanalyse und Enzymtests

2.8.1 Extraktion und Analyse der Inhaltstoffe

Die Extraktion von Flavonoiden und Anthocyanen erfolgte nach am Lehrstuhl etablierten Standardmethoden mit Ethylacetat, Methanol oder 1 % Methanol-HCL. Nach Einengung am Rotationsverdampfer wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Abspaltung des Zuckerrestes erfolgt eine Hydrolyse mit 2 N HCL bei 95°C für 15min (N.Oswald, pers. Mitteilung). Die Analyse erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf G1440 Cellulose Platten mit verschiedenen Laufmitteln. Anthocyanidine werden in Forestal (CH₃COOH-HCL-H₂O, 30:3:10), Flavonoide mit CAW (CHCl₃-CH₃COOH-H₂O, 50:45:5) aufgetrennt. Die Identifizierung erfolgt über den Vergleich mit authentischen Vergleichssubstanzen, bekannten R_f-Werten, Besprühen mit Färbereagenzien und Analyse unter UV-Licht. Weiterhin lassen sich Flavonoide und Anthocyane im Rohextrakt anhand von photometrischen Messungen bestimmen, so haben z.B. Flavonole Absorptionsmaxima um 270 und 360 nm während Anthocyane bei 520-550 nm absorbieren.

2.8.2 Nachweis von Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten wird tiefgefrorenes Pflanzenmaterial mit geglühtem Seesand unter flüssigem Stickstoff zermörsert, mit Dowex 1x2 versetzt, in dem jeweiligem Aufarbeitungspuffer aufgenommen und zweimal zentrifugiert. Im klaren Überstand befinden sich die für die weiteren Untersuchungen verwendeten Enzyme. F3'H, F3'5'H und FNS II werden mittels Mikrosomenpräparation in ihrer aktiven Form angereichert, wodurch bessere Enzymaktivitäten erreicht werden.

Für einen Enzymtest wird eine definierte Menge an Proteinextrakt, die notwendigen Cofaktoren, das radioaktiv markierte Substrat und der jeweilige Reaktionspuffer zusammengegeben. Zeit-, Temperatur- und pH-Optimum sind je nach Enzym unterschiedlich (Seitz, 2000). Durch Zugabe von Ethylacetat wird die Reaktion gestoppt und gleichzeitig werden die Flavonoide und andere Reaktionsprodukte in der entstehenden Oberphase angereichert. Die durch zweimaliges Extrahieren (mit 50 und 100 µl EtOAc bei Flavonoiden) gewonnene Phase wird zur Trennung auf DC-Platten aufgetragen. Die Identifizierung erfolgt über den Vergleich mit Standardsubstanzen. Dazu wird die sich auf den Dünnschichtplatten befindliche Radioaktivität mit Hilfe eines Bioimaging Analysers (Fuji BAS 1000) gemessen. Anhand von Standards lassen sich die gemessenen Werte in gebräuchliche Einheiten der Radioaktivität (dpm) umrechnen.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierungen

3.1.1 Klonierungen in Binärvektoren

Für die Transformationen mit *Agrobacterium tumefaciens* wurde überwiegend der Stamm LBA 4404 und der Binärvektor pBI121 (Abb.6) der Firma Clontech verwendet. In das Grundgerüst von pBIN19 (Bevan 1984) wurde eine GUS-Kassette mit 35S-Promotor, β -Glucuronidase-Gen und NOS-Terminator kloniert. Zur Selektion in *E. coli* und *Agrobacterium* enthält der Vektor eine Kanamycin-Resistenz

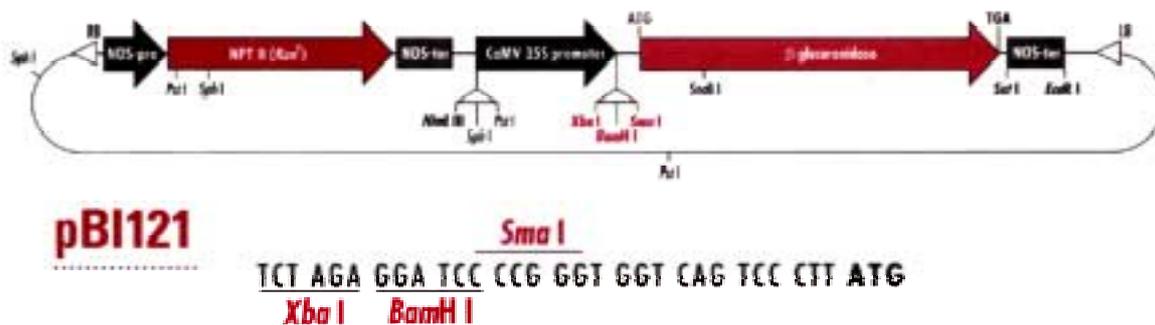


Abb.6: NOS-pro bzw NOS-ter stehen für Promotor und Terminator der Nopalinsynthese. NPT II (Neomycinphosphotransferase II) verleiht eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Der 35S Promotor stammt aus dem Blumenkohlmosaikvirus (*cauliflower mosaic virus*, CaMV). RB und LB bezeichnen die die T-DNA rechts und links eingrenzenden Bordersequenzen, weiterhin sind die zur Klonierung nutzbaren Schnittstellen angegeben (Sst I entspricht Sac I).

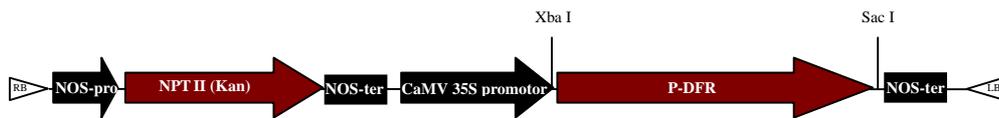
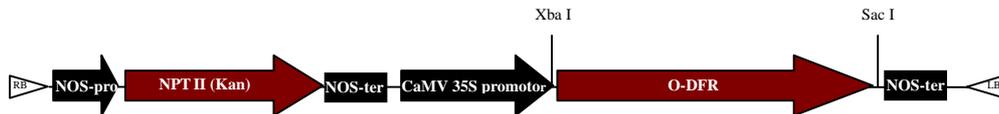
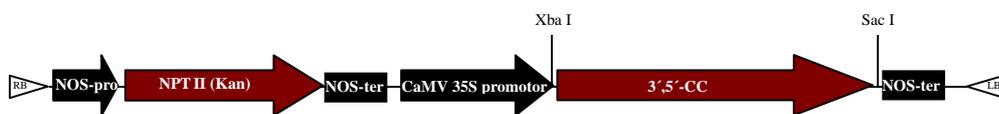
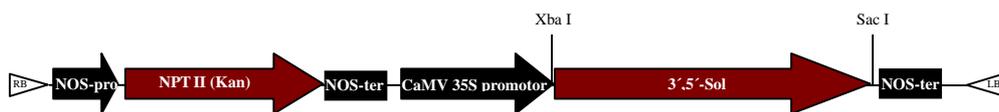
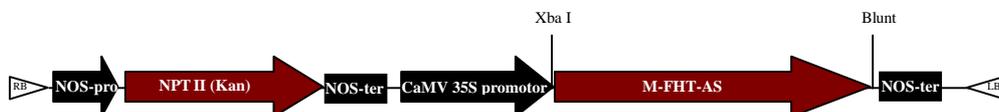
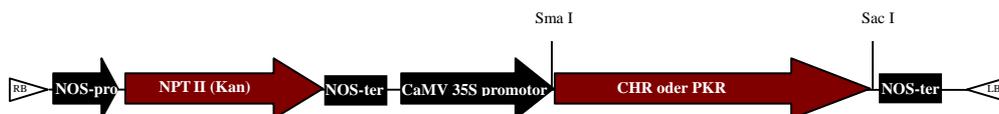
Folgende Gene wurden mit oben erwähnten Methoden in die Xba I-Sac I (Sst I) Schnittstelle des Binärvektors kloniert:

1.: Die Flavonsynthase II (FNS II) aus *Gerbera hybrida* (Martens, 2000)



2.: Die Dihydroflavonol 4-Reduktase aus *Malus domestica* "Weirouge" (MDFR)



3.: Die Dihydroflavonol 4-Reduktase aus *Pyrus communis* "Pyrodwarf" (PDFR)4.: Die Dihydroflavonol 4-Reduktase aus *Osteospermum* (ODFR)5.: Die 3',5'-Hydroxylase aus *Callistephus chinensis* (3',5'-CC; Eder, 2001)6.: Die 3'-Hydroxylase aus *Matthiola incana* (3'-Lev)7.: Die 3',5'-Hydroxylase aus *Lycianthes rantonnetii* (3',5'-Sol; Eder, 2001)8.: Die Flavanon 3-Hydroxylase aus *Malus domestica* "Weirouge" (M-FHT-AS)9.: Die Chalkonreduktase (CHR oder PKR) aus *Glycine max* cv. Harosoy 63 (Welle, 1988)

Alternativ zu pBI121 wurden Binär-Vektoren der pGPTV-Serie (Becker *et al.* 1992) verwendet, bei denen der Selektionsmarker neben der linken Bordersequenz platziert ist (Abb.7).

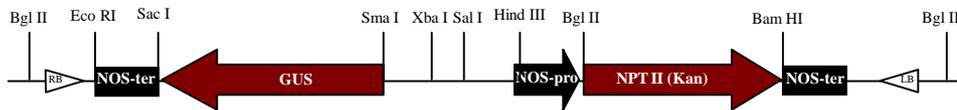
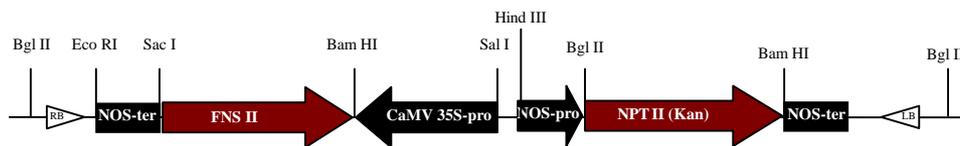


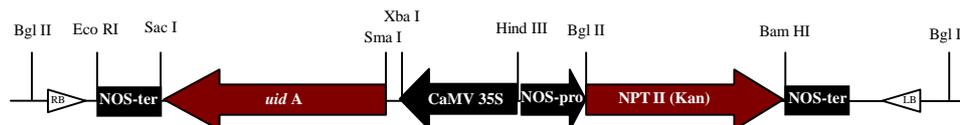
Abb.7: Schematische Darstellung der T-DNA von pGPTV-KAN, die Beschriftung entspricht der von pBI121 (s.o.)

Folgende Konstrukte wurden zur Verwendung in Transformationsansätzen kloniert:

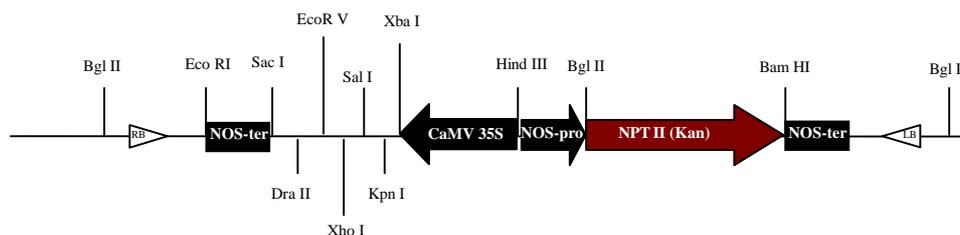
1.: Die Flavonsynthese II (FNS II) aus *Gerbera hybrida*, in Antisense-Orientierung (Martens, 2000).



2.: Der 35S-Promotor aus pBI121 wurde in die HindIII-XbaI Schnittstelle von pGPTV ligiert. Über XbaI-SacI und SmaI-SacI kann *uidA* entfernt und durch einen anderen Klon ersetzt werden.



3.: Anstatt des GUS-Gens wurde in die XbaI-SacI Site ein Adapter mit verschiedenen Schnittstellen eingefügt, so daß Alternativen bei der Klonierung vorhanden sind.



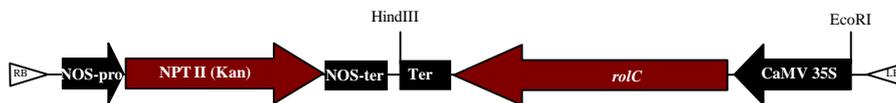
Einige Konstrukte wurden aufgrund der größeren Klonierungsmöglichkeiten in die **multiple cloning site** von pBin 19 inseriert (Abb.8).



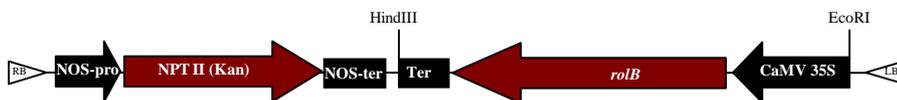
Abb.8: Schematische Darstellung der T-DNA von pBIN 19, die Beschriftung entspricht der von pBI 121 (s.o.), die MCS besteht aus folgenden Schnittstellen: Hind III, Sal I, Xba I, Bam I, Sma I, Kpn I, Sac I, EcoRI

Folgende Konstrukte wurden zur Verwendung in Transformationsansätzen kloniert:

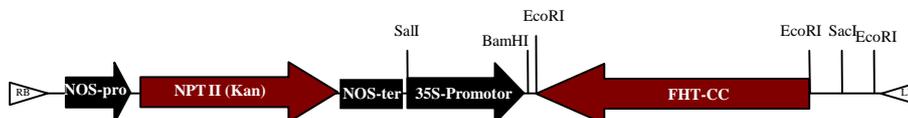
1.: *rolC* aus *Agrobacterium rhizogenes* unter Kontrolle des 35S-Promotors



2.: *rolB* aus *Agrobacterium rhizogenes* unter Kontrolle des 35S-Promotors

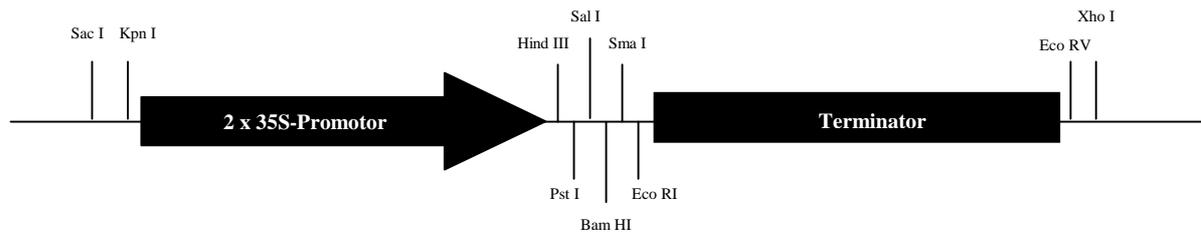


3.: Die Flavanon 3-Hydroxylase aus *C. chinensis* (FHT-CC), in Antisense-Orientierung.



3.1.2. Klonierungen für die particle gun

Der Vector pGun besteht aus einem doppeltem CaMV 35S-Promotor, einem Terminator und einer gegenüber pUC18 leicht abgeänderten multy cloning site. Die Ampicillin-Resistenz von pÜC18 kann zur Selektion in *E. coli* genutzt werden (100 mg/l). Promotor und Terminator haben jeweils 800 bp, der gesamte Vektor 3724 bp.



Vector pGun als Grundlage für die Klonierung von Konstrukten für die particle gun

Über die unikalene Schnittstellen der MCS wurde folgende Gene in den Vector kloniert:

1. Die Chalkonreduktase (CHKR oder PKR) aus *Glycine max* cv. Harosoy 63 in die EcoRI-Site und mit internen Schnittstellen überprüft
2. Die 3',5'-Hydroylase aus *Callistephus chinensis* in die HindIII-EcoRI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen
3. Die 3'-Hydroylase aus *Matthiola incana* in die HindIII-BamHI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen
4. Die 3'-Hydroylase aus *Pelargonium zonale* in die PstI-EcoRI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen
5. Die Flavanon 3-Hydroxylase aus *Gerbera hybrida* in die BamHI-EcoRI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen
6. Die 3',5'-Hydroxylase aus *Lycianthes rantonnetii* in die BamHI-EcoRI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen
7. Die Anthocyanidinsynthase aus *Matthiola incana* in die BamHI-EcoRI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen
8. Die Chalkonsynthase aus *Callistephus chinensis* und *Dianthus caryophyllus* in die EcoRI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen
9. Die Chalkonsynthase aus *Gerbera hybrida* in die BamHI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen

10. Die Dihydroflavonol 4-Reduktase aus *M. domesticus* in die EcoRI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen
11. Die Dihydroflavonol 4-Reduktase aus *Gerbera hybrida* in die BamHI-EcoRI-Site, Überprüfung mit internen Schnittstellen

Die Konstrukte wurden zur Transformation von Blütenblättern mittels particle-bombardement angefertigt. Dabei sollen die Gene im Gewebe transient exprimiert werden, um anschließend durch Enzymaktivität eine lokale Farbbildung zu bewirken. Interessant sind in dem Zusammenhang die Komplementation von Mutanten und die frühzeitige Lokalisation des Blocks bei aufgrund einer Blockade in der Anthocyan synthese weißblühenden Zierpflanzen.

3.2 Transformation von *Agrobacterium* und Überprüfung der Ergebnisse

3.2.1 Transformation von *Agrobacterium*

Mit den unter 2.1.2 beschriebenen Methoden wurden die Stämme LBA 4404 und EHA 105 vorbereitet und transformiert. Aufgrund des höheren Aufwands wurde die Plasmid-Übertragung mittels "Triparental Mating" nur als Alternativ-Methode verwendet. Niedrige Transformationsfrequenzen und nur bedingte Reproduzierbarkeit waren weitere Gründe, diese Methode nicht als Standardmethode zu etablieren. Die freeze-thaw-Methode stellt aufgrund ihrer einfachen Vorbereitung und Durchführung eine Alternative dar. Allerdings lassen sich trotz der großen Menge an eingesetzter Plasmid-DNA (ca.1 µg) nur relativ geringe Transformationsraten erzielen. Die Electroporation ist dagegen die schnellste und effektivste Methode der Plasmid-Übertragung in kompetente *Agrobacterium tumefaciens* Zellen. Optimierbare Parameter wie DNA-Menge, Puls-Stärke, Kuvetten-Größe oder Inkubationsdauer ermöglichen eine Anpassung an verschiedene Stämme, so daß für den jeweiligen Stamm Bedingungen gefunden werden können, die reproduzierbar sind und ausreichende Transformationsraten ermöglichen. Die unter 2.1.2 beschriebenen Bedingungen gewährleisten reproduzierbar gute Transformationsraten, so daß die Methode routinemäßig zur Transformation von LBA 4404 und EHA 105 genutzt wird.

3.2.2 Überprüfung der transformierten *Agrobacterien*

Zur Überprüfung der Aufnahme des Binär-Vektors von den auf Selektionsmedium gewachsenen Kolonien muß dieser isoliert (siehe 2.1.3) und mittels Restriktionsverdau untersucht werden. Die unten beschriebenen Methoden führten zu folgenden Ergebnissen (siehe auch Abb. 9).

1. Isolierung von Gesamt-DNA: Die material- und zeitaufwendigste Kontrollmethode erlaubt die eindeutige Identifizierung der übertragenen Plasmide nach 2 Tagen. Da der Kontrollverdau mit aus *E. coli* isolierter Plasmid-DNA durchgeführt wird, treten keine Probleme bezüglich der Reinheit auf.

2. Lysozym: Der Vorverdau mit Lysozym führt zwar zur Isolierung von Plasmid-DNA mit einer für einen Kontrollverdau ausreichenden Reinheit, erbringt aber nicht die notwendige Ausbeute. Eine eindeutige Identifizierung des Plasmides ist nicht möglich.

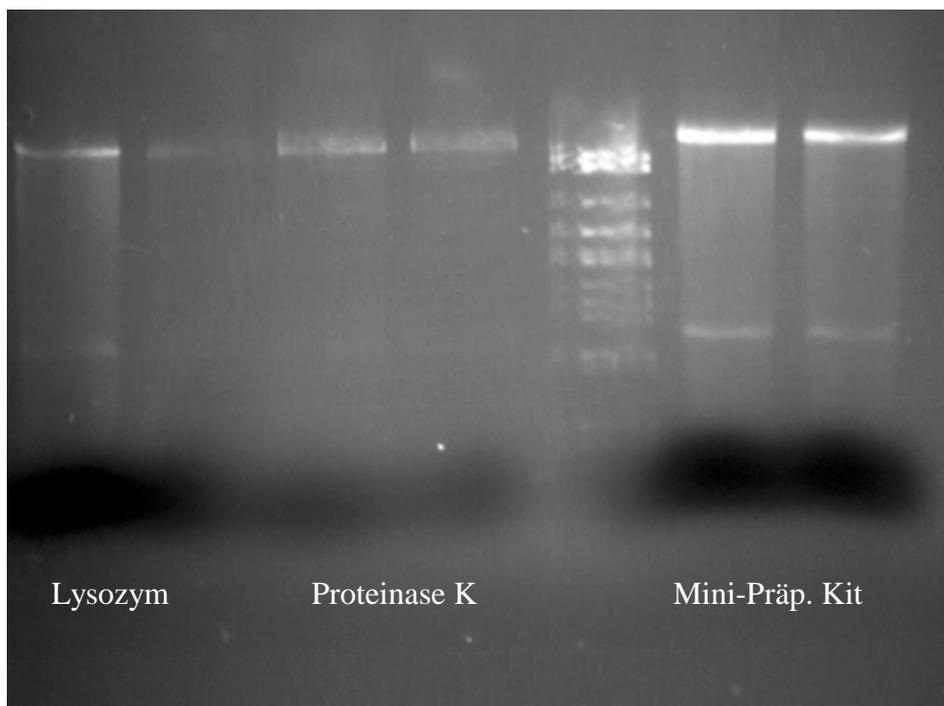


Abb.9: Vergleich verschiedener Plasmid-Isolierungsmethoden aus *A. tumefaciens*

3. Proteinase K: Die Vorbehandlung mit Proteinase K ermöglicht die Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des angegebenen Kits. Trotz ausreichender Ausbeute bewirkt die mangelhafte Reinheit Probleme beim Restriktionsverdau, so daß die eindeutige Identifizierung des übertragenen Plasmids auch hier nicht möglich ist.

4. E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit: Kontroll-verdaute Plasmid-DNA läßt die eindeutige Identifizierung der Plasmide zu, d.h. diese Methode erlaubt die Isolierung von Plasmid-DNA in ausreichender Reinheit. Aus diesem Grund wurde diese Methode routinemäßig eingesetzt.

3.3 Ergebnisse zur Transformation der untersuchten Pflanzen

3.3.1 Pelargonium

An folgenden Sorten verschiedener Züchter (siehe Anhang) wurden die Untersuchungen durchgeführt:

Pelargonium zonale

Nebelung: Multibloom red (MR)
 Multibloom white (MW)
 Multibloom scarlet (MS)

Walz: Elite white (EW)
 Elite scarlet (ES)

S+G (Novatis) Pulsar white (PW)
 Pulsar red (PR)
 Pulsar scarlet (PS)
 Pulsar salmon (SAL)

Pelargonium peltatum

S+G (Novatis) Cadix lilac (CL)
 Felix white (FW)

Das mit den Phytohormonen 2iP und IAA nach Reuther (1983) versetzte Regenerationsmedium (MS 1/2) brachte folgende Ergebnisse. Die Mengenangaben der Phytohormone sind in mg/l angegeben. Als Ausgangsmaterial wurden sterile Hypocotylexplantate der Sorten MR, ES und PW verwendet.

Die Ansätze mit 2iP im Überschuß (0,5 IAA-1 2iP; 0,25 IAA-1 2iP) zeigten zwar deutliche Kallusbildung, aber keine Bildung von sproßansätzen. IAA im Überschuß (1 IAA-0,5 2iP; 0,5 IAA-0,25 2iP) führte dagegen neben starker Kallusbildung zur Ausprägung von teilweise mehreren sprossen pro explantat. Die höchste rate erreichte der ansatz 0,5 IAA-0,25 2iP (variante I, Reuther) mit zum teil 8 sproßansätzen pro explantat und wurde daher für weitere ansätze verwendet.

Zum Vergleich wurde die regenerierbarkeit der sorten mit medienvarianten von Dunbar *et al.* und Robichon *et al.* getestet.

Variante II, Dunbar: MS-Medium mit 2 mg/l Zeatin und 1,9 mg/l IAA

Variante III, Robichon: MS-Medium mit 50 % Makronährstoffe und 0,5 mg/l TDZ, 0,01 mg/l IBA, 1 mg/l TIBA

Tab. 3: Durchschnittliche sproßbildung an Hypocotyl-Explantaten der untersuchten sorten auf verschiedenen medien

Sorte\Variante	I	II	III	Sorte\Variante	I	II	III
MR	5	2	9	Sal	8	3	12
MW	5	3	9	EW	6	2	9
MS	4	3	6	ES	6	2	10
PR	7	2	10	CL	4	1	7
PW	7	2	10	FW	3	1	7
PS	7	1	8				

Die variante "Dunbar" (II) führte zur bildung von stark wässrigem kallus bei allen sorten, vereinzelt konnten sich bildende sproße beobachtet werden, die dann abgenommen und auf MS 1/2 in babygläser überführt wurden.

Die besten ergebnisse in bezug auf regeneration und sich bildende sprosse pro explantat ergab die variante "Robichon" (III), so daß zur wahl geeigneter selektionsbedingungen diese medienvariante eingesetzt wurde. Sehr ähnliche ergebnisse waren bei der regenerierbarkeit von verschiedenen sorten einer serie zu beobachten.

Zur untersuchung der selektionsbedingungen wurden hypocotylexplantate auf medien mit verschiedenen antibiotika-konzentrationen (Kanamycin 100, 200, 300 mg/l, Hygromycin 10, 20, 30 mg/l) kultiviert. Während nach 2 wochen konzentrationen bis 300 mg/l Kanamycin die kallusbildung nicht unterbinden konnte, bewirkten schon 10 mg/l Hygromycin ein komplettes absterben der explantate. Hygromycin wurde daher mit einer konzentration von 10 mg/l zur selektion verwendet.

Sterilisation und Keimung

Die Sterilisation und Keimfähigkeit von Samen verschiedener Sorten wurde wie unter 2.5.4 beschrieben durchgeführt. Pro Sorte wurden 15 Samen in drei Weckgläsern kultiviert. Der Ansatz wurde dreimal wiederholt. Die Samen blieben in allen Fällen steril und keimten zu 100 %, d.h. die Sterilisationsmethode ist zur Gewinnung von keimfreien vitalen Samen geeignet.

Übersicht zur Gewinnung von zur Transformation genutzten Hypocotyl-Explantaten. Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl an Explantaten pro Samen.

MR: 7	PR: 9	SAL: 12	CL: 6
MW: 8	PW: 9	EW: 9	FW: 5
MS: 7	PS: 10	ES: 9	

Entsprechend der Regeneration zeigt auch die Keimfähigkeit bei den Sorten innerhalb eines Sortimentes fast identische Werte. Aufgrund der schlechteren Ergebnisse wurden die *Pelargonium peltatum* Hybriden CL und FW für die weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Da die Sorte "Pulsar Salmon" (SAL) die besten Ergebnisse zeigte, wurden die Transformationsansätze mit dieser Sorte durchgeführt.

Die Transformation wurde wie unter 2.5.4 beschrieben mit dem *Agrobacterium*-Stamm EHA 101 (Binärvektor pKHG₃) durchgeführt. Die unter Selektionsbedingungen regenerierten Pflanzen wurden durch histochemische Färbung auf funktionelle Genexpression anhand des Reportergens *uidA* untersucht. Abbildung 10 zeigt die GUS-Expression in Blättern von drei unabhängig voneinander regenerierten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Damit wurde die erfolgreiche Transformation der Sorte "Pulsar Salmon" gezeigt.

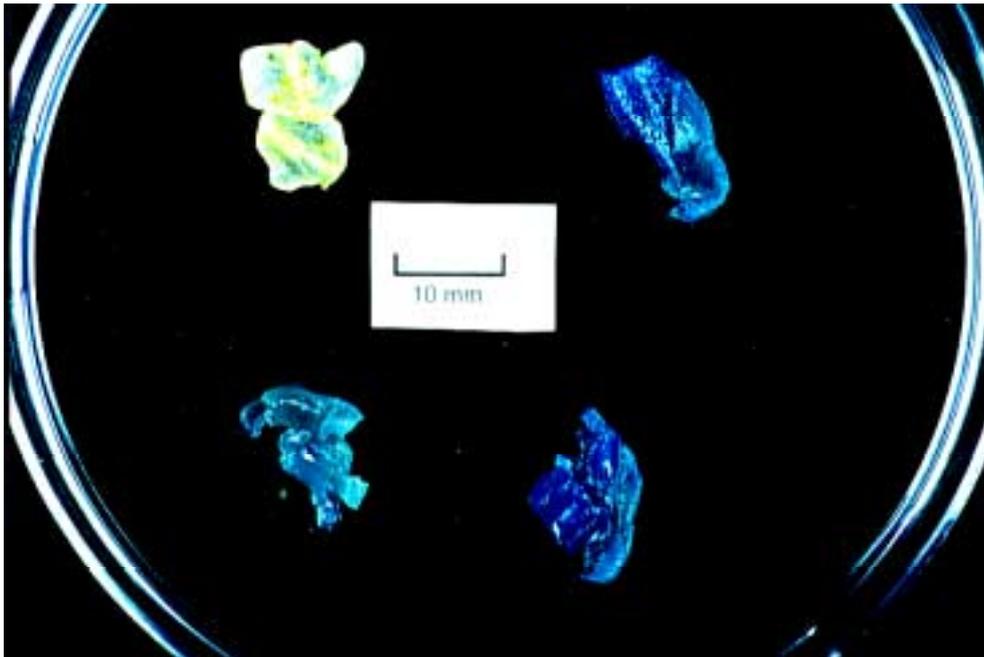


Abb.10: Histochemische GUS-Färbung von Blattexplantaten transgener Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle

Aufgrund von Überschneidungen der Kanamycin-Resistenz von Binärvektor und *Agrobacterium* Stamm EHA 101 wurden für weitere Konstrukte der Vector pGPTV-HPT (Abb.11) und der *Agrobacterium* Stamm EHA 105 verwendet. Durch die Hygromycin-Resistenz in der T-DNA eignet sich der Vektor zur Transformation von *Pelargonium*.

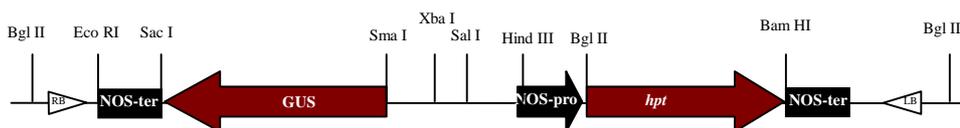


Abb.11: Schematische Darstellung der T-DNA von pGPTV-HPT, die Beschriftung entspricht der von pBI 121 (s.o.)

Über XbaI-SacI wurde das GUS-Gen gegen die Promotor-Terminator-Kassette von pGun ausgetauscht, so daß ein Vektor mit Hygromycin-Resistenz zur Verfügung steht, in den über die unikalen Schnittstellen SmaI und PstI weitere Konstrukte eingefügt werden können (Abb.12).

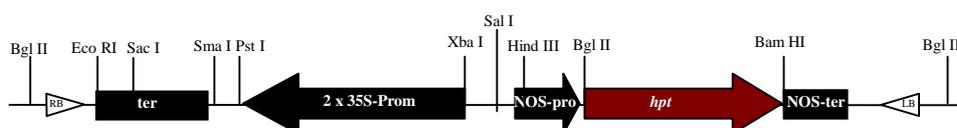


Abb.12: Schematische Darstellung der T-DNA von pGPTV-HPT mit der Promotor-Terminator-Kassette von pGun

Als Strukturgen wurde die Chalkonreduktase (CHKR oder PKR) aus *Glycine max* cv. Harosoy 63 in den Binär-Vektor ligiert (Abb.13). Somit können transgene Pflanzen erzeugt werden, die auf einem Nebenweg 6'-Deoxychalkone synthetisieren und als Folge eine Farbänderung zeigen.

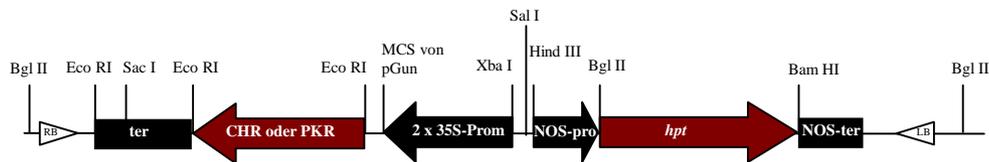


Abb.13: Schematische Darstellung der T-DNA von pGPTV-HPT mit der Chalkonreduktase unter Kontrolle des 35S-Promotors

3.3.2 *Gerbera hybrida*

Mit den unter 2.4.1.2 und 2.5.2 beschriebenen Medien und Methoden wurden bei verschiedenen Sorten Regenerationsversuche (Abb.14) durchgeführt. Bei "Terra Regina" konnte eine Regenerationsrate von über 60 % beobachtet werden, während beispielsweise Alkmene deutliche Kallusbildung und nur eine Regenerationsrate von etwa 30 % zeigte.



Abb.14: Regenerierende Petiolen-Explantate von *Gerbera hybrida*

Sorten wie "Chubby", "Kelly", "Campidano" und "Orca" zeigten unter den angegebenen Bedingungen zwar deutliche Kallusbildung, Regeneration von Sprossen war jedoch nicht zu beobachten. Damit läßt sich das an "Terra Regina" angepaßte Regenerationsprotokoll nur bedingt auf andere Handelssorten übertragen. Aus diesem Grund wurden die Transformationsversuche mit der Sorte "Terra Regina" durchgeführt. Transformationen wurden mit den *A. tumefaciens* Stämmen C58 pGV2260 und EHA105 und verschiedenen Konstrukten (siehe 3.1.1) durchgeführt.

3.3.3 Petunia hybrida

3.3.3.1 Gewebekultur

Die Sorte RL 01 wurde als Modellsystem für die Transformation und für die Expression am Lehrstuhl isolierter Gene im pflanzlichen System eingeführt. Daneben wurden spezielle Linien und Mutanten in bezug auf die Flavonoidbiosynthese hinsichtlich ihrer Regenerierbarkeit und damit ihrer Eignung für Transformationsansätze untersucht. Das für die Linie RL 01 etablierte Regenerationsprotokoll (2.4.1.1) konnte nur bedingt auf andere Sorten übertragen werden, weshalb für R 27, R 4, V 18, G 55 und W 39 ein Phytohormon-Raster zur Bestimmung der am besten geeigneten Regenerationsbedingungen angelegt wurde.

Medienvarianten:

1. 0,2 mg/l ,2 mg/l und 6 mg /l BA bei jeweils 0,2 mg/l NAA
2. 0,2 mg/l ,2 mg/l und 6 mg /l Kinetin bei jeweils 0,2 mg/l NAA
3. 0,2 mg/l ,2 mg/l und 6 mg /l 2iP bei jeweils 0,2 mg/l NAA
4. 0,2 mg/l ,2 mg/l und 6 mg /l Zeatin bei jeweils 0,2 mg/l NAA

Als Medien-Grundlage diente jeweils das MS-Medium mit B5-Vitaminen wie unter 2.4.1 beschrieben. Aufgelegt wurden durch Skalpell-Schnitte verletzte Blattexplantate. Nach 2, 4 und 6 Wochen wurden die Ansätze jeweils ausgewertet:

R 27: Beste Ergebnisse bei Variante 2 mit 2 mg/l Kinetin. 0,2 mg Kinetin bewirkten starke Wurzelbildung während 6 mg zu leichter Kallusbildung führte. Andere Varianten ergaben keine reproduzierbaren Ergebnisse.

R 4: Es konnten ähnliche Ergebnisse wie bei R 27 beobachtet werden. Höhere Kinetin Konzentrationen beschleunigten das Absterben der Explantate, d.h. es kam weder zu Kallusbildung noch zur Induktion von Sprossen.

V 18: Diese Sorte reagierte am besten auf Variante 3, 2 mg/l 2iP führte zur Bildung von 3-5 Sprossen pro Explantat. 0,2 mg/l 2iP bewirkte starke Kallusbildung mit 1-2 Sprossen pro Explantat während bei 6 mg/l 2iP kaum Regeneration zu beobachten war.

G 55: G 55 zeigte die besten Ergebnisse bei 2 mg/l BA. 2-4 Sprosse waren pro Explantat zu beobachten, während 0,2 und 6 mg/l BA zwar Kallusbildung bedingten, jedoch keine Sproßbildung einsetzte.

W39: Hier konnte der für RL 01 verwendete Ansatz genutzt werden, d.h. BA und NAA im Verhältnis 10:1 führte zu den besten Ergebnissen. Allerdings ist Blattmaterial von *in vitro* Pflanzen oft sehr dünn und empfindlich, so daß für Transformationen auf Gewächshausmaterial zurückgegriffen werden sollte. Zu beachten ist, daß dieses erst sterilisiert werden muß, was zu Beeinträchtigungen bei der Regeneration führen kann.

3.3.3.2 Transformationen

Um die Eignung des *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA 4404 für die Transformation von RL 01 zu nutzen, wurden Blattexplantate wie unter 2.5.1 beschrieben transformiert.

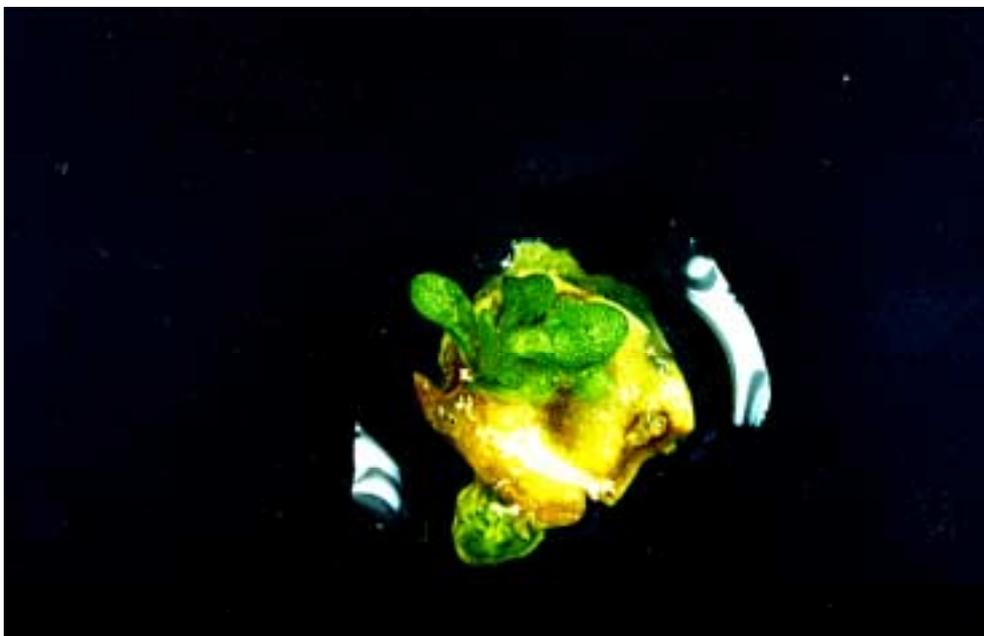


Abb.15: Regenerierender Sproß aus auf Selektionsmedium kultiviertem Explantat

Abbildung 15 zeigt die Regeneration an einem Blattexplantat, das auf Selektionsmedium inkubiert wurde. Die aufgrund des Selektionsdruckes absterbenden Regionen des Explantates

sind anhand der Braunfärbung deutlich zu erkennen. Die erfolgreiche Transformation wurde durch histochemische GUS-Färbung bewiesen (Daten nicht gezeigt). Da es trotz Selektionsdruck bei *Petunia hybrida* zu "escapes" (falsch Positive) kommen kann, wurden Blattexplantate putativ transgener Pflanzen auf Selektionsmedium inkubiert. Der Vergleich zum Wildtyp verdeutlicht die Expression des übertragenen Resistenzgens (Abb. 16).



Abb.16: Vergleich von Blattexplantaten putativ transgener Pflanzen zur Kontrolle nach 8-wöchiger Inkubation auf Selektionsmedium

Die weitere Untersuchung der putativ transgenen Pflanzen erfolgte mittels PCR und den unter 2.7.2 und 2.7.3 beschriebenen Primern und Bedingungen. Als Positiv-Kontrolle (+) wurde DNA einer das GUS-Gen exprimierenden Pflanze verwendet. DNA einer nicht transformierten Pflanze diente als negativ Kontrolle (-). Nr.1-5 sind unabhängig voneinander regenerierte Pflanzen der Linie RL 01. Die verwendeten Primer (5'-T-DNA und 3'-T-DNA) ergeben ein 1334 bp-Fragment, das anhand des Markers deutlich zu identifizieren ist (Abb.17).

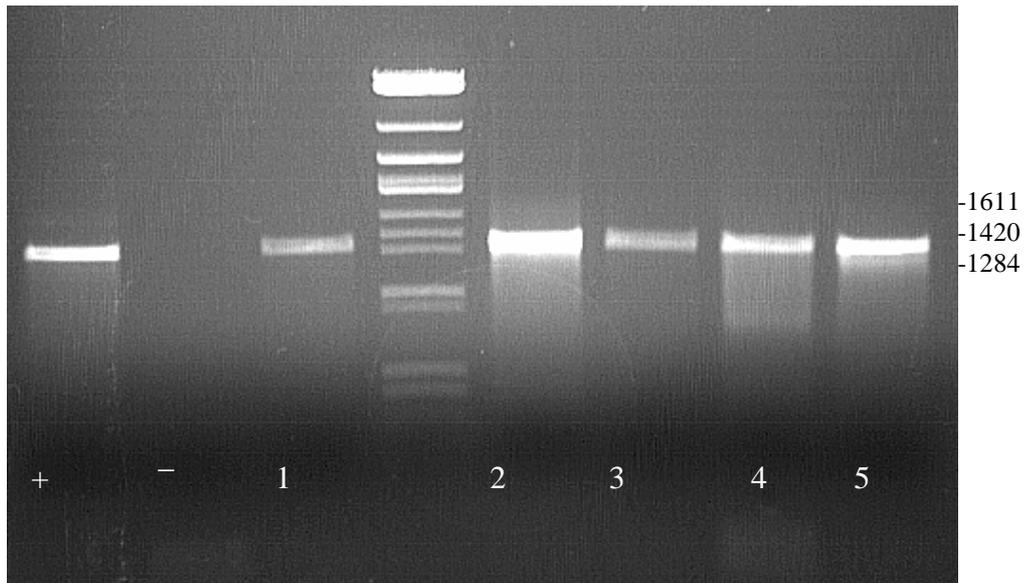


Abb.17: PCR-Überprüfung putativ transgener Pflanzen mit NPT II-Primern

In Pflanzen, die mit folgenden Konstrukten transformiert wurden, konnte der Selektionsmarker mittels PCR nachgewiesen werden:

- | | |
|-----------------------------|----------------------------|
| 1. pBI121 - 35S-FNS II | 6. pBI 121 - 35S-CHKR |
| 2. pBI121 - 35S-F3'H Lev | 7. pBIN 19 - 35S-FHT-AS-CC |
| 3. pBI121 - 35S-F3',5'H CC | 8. pBIN 19 - 35S-rolC |
| 4. pBI121 - 35S-FHT-AS Ma | 9. pBI 121 - MDFR |
| 5. pBI121 - 35S-F3',5'H Sol | 10. pBI 121 - PDFR |

Beim Agrosystem besteht die Gefahr des Abbruches der DNA-Übertragung, d.h. nur ein Teil der T-DNA wird übertragen bzw. inseriert und ist daher auch nur nachweisbar. Da sich bei dem verwendeten Binärvektor das *npt II*-Gen am Startpunkt (rechte Bordersequenz) der DNA-Übertragung befindet, ist bei einer Teilübertragung nur die Integration des Selektionsmarkers möglich. Die Präsenz des jeweils übertragenen Genes wurde deshalb mit genspezifischen Primern überprüft. Die Beschriftung entspricht der von Abbildung 17. Als Positiv-Kontrolle wurde Plasmid-DNA verwendet, was die wesentlich stärkere Bande erklärt. Die verwendeten "End to End" Primer sollten ein "full-length" Fragment (1535 bp) ergeben (Abb.18).

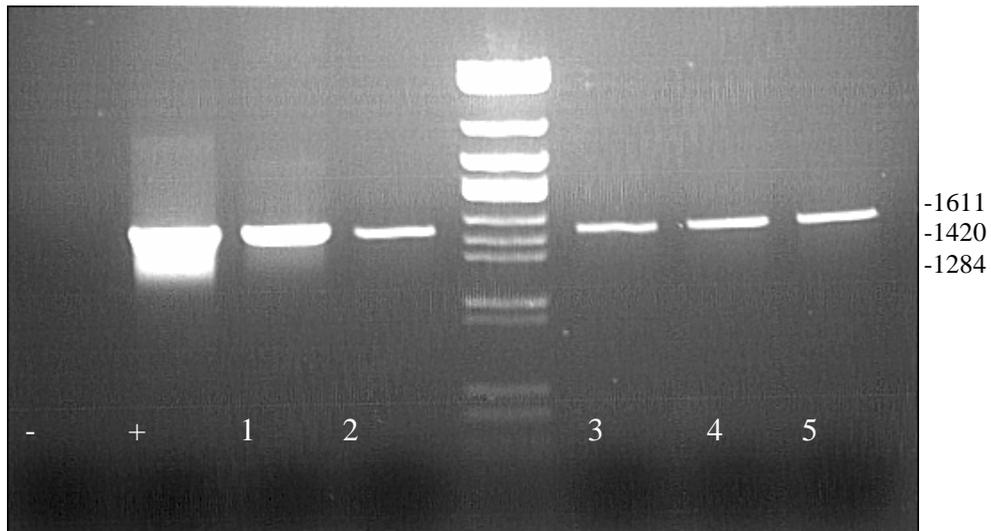


Abb.18: PCR-Überprüfung putativ transgener Pflanzen mit FNS-spezifischen Primern

3.3.3.3 Biochemische Untersuchung transgener Pflanzen

Die mittels PCR (NPT- und Genspezifische Primer) auf Integration der T-DNA positiv getesteten Pflanzen wurden mit biochemischen Methoden hinsichtlich Enzymaktivität und dadurch bedingten Änderungen der Inhaltstoffe untersucht.

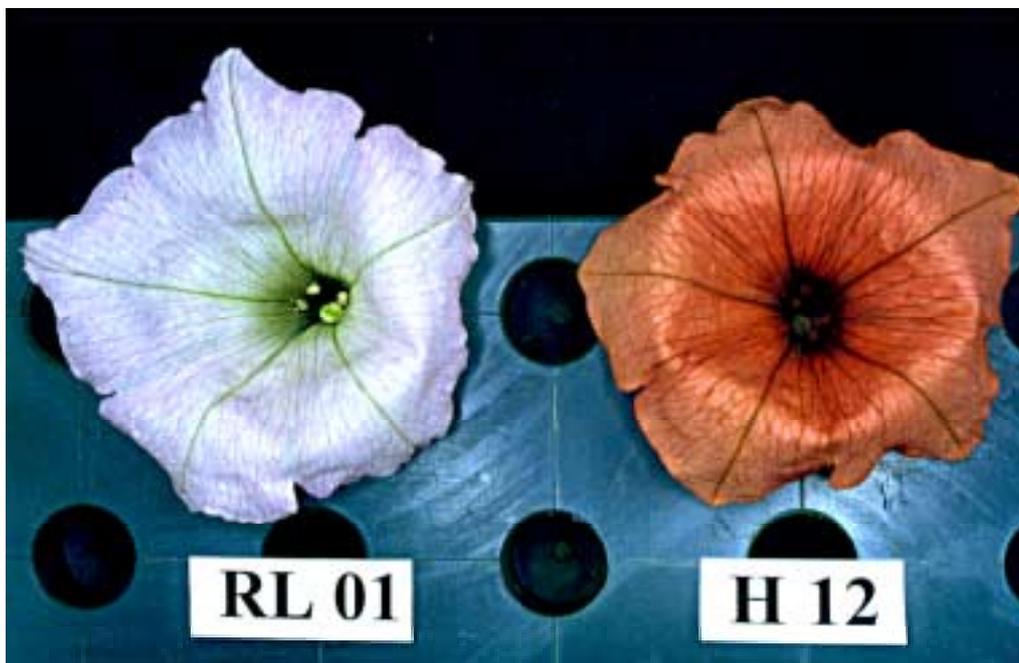


Abb.19: Vergleich der Blütenfärbung zwischen der transgenen Linie H12 (GDFR) und der Linie RL 01

Wie schon von Eloma *et al.* (1995) beschrieben, führt die Expression der DFR aus *Gerbera hybrida* in der Linie RL01 zur Synthese von Pelargonidin und damit zu orange-roter Blütenfärbung (Abb. 19). Mit dem A1 Gen (DFR) aus Mais und der gleichen Petunien-Linie wurde dieser Ansatz bereits 1987 durchgeführt (Meyer *et al.*).

Die Inhaltsstoffanalyse mittels Dünnschichtchromatographie (siehe 2.8.1) zeigte wie erwartet deutliche Vorkommen von Pelargonidin, das im Wildtyp aufgrund der Substratspezifität der DFR von *Petunia hybrida* nicht gebildet wird, weshalb Dihydrokämpferol (DHK) angereichert wird. Die Gerbera-DFR kann dagegen DHK als Substrat nutzen, was dann zur Bildung von Pelargonidin führt (Abb.20).

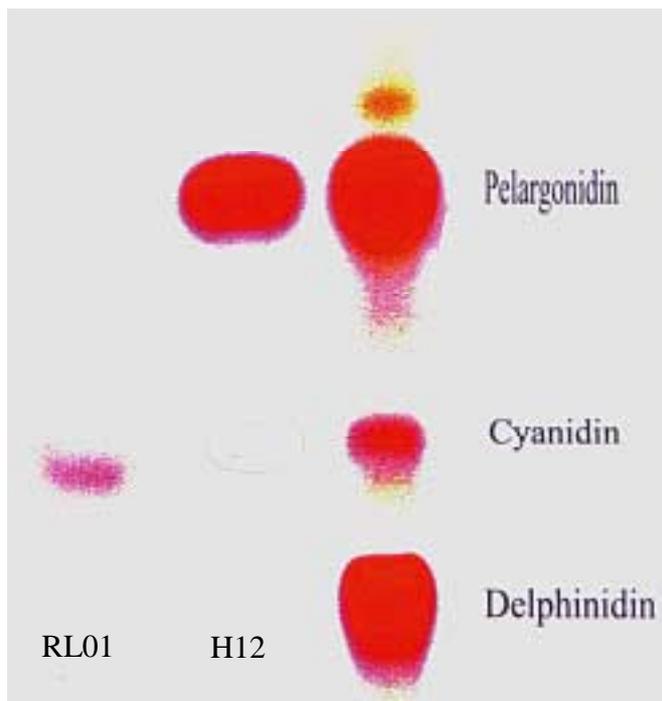


Abb.20: Inhaltsstoffanalyse der transgenen Pflanze im Vergleich zur Kontrolle. RL01: Kontrollpflanze, H12: Mit GDFR transformierte Pflanze

Per PCR positiv getestete transgene Pflanzen, die das Antisense-Konstrukt der Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) von *Callistephus chinensis* aufgenommen haben, wurden im Enzymtest auf dessen Wirkung hin untersucht. Bei erfolgreicher Reprimierung des Enzyms ist eine Akkumulierung des jeweiligen Flavanons zu erwarten, während der Gehalt an Dihydroflavonolen zurückgehen sollte. In diesem Fall sollte das im Enzymtest eingesetzte Naringenin nicht umgesetzt werden und es nicht zur Bildung von Dihydrokämpferol kommen. In der Pflanze sollte sich Naringenin anreichern, das dann von anderen Enzymen, die Flavanone als Substrat akzeptieren, umgesetzt werden kann. Dihydrokämpferol als Zwischenprodukt sollte nicht oder nur zu einem geringen Maße entstehen. Da die Untersuchungen mit *in vitro* Material durchgeführt wurden, müssen die Ergebnisse durch Analyse von Gewächshausmaterial noch überprüft werden.

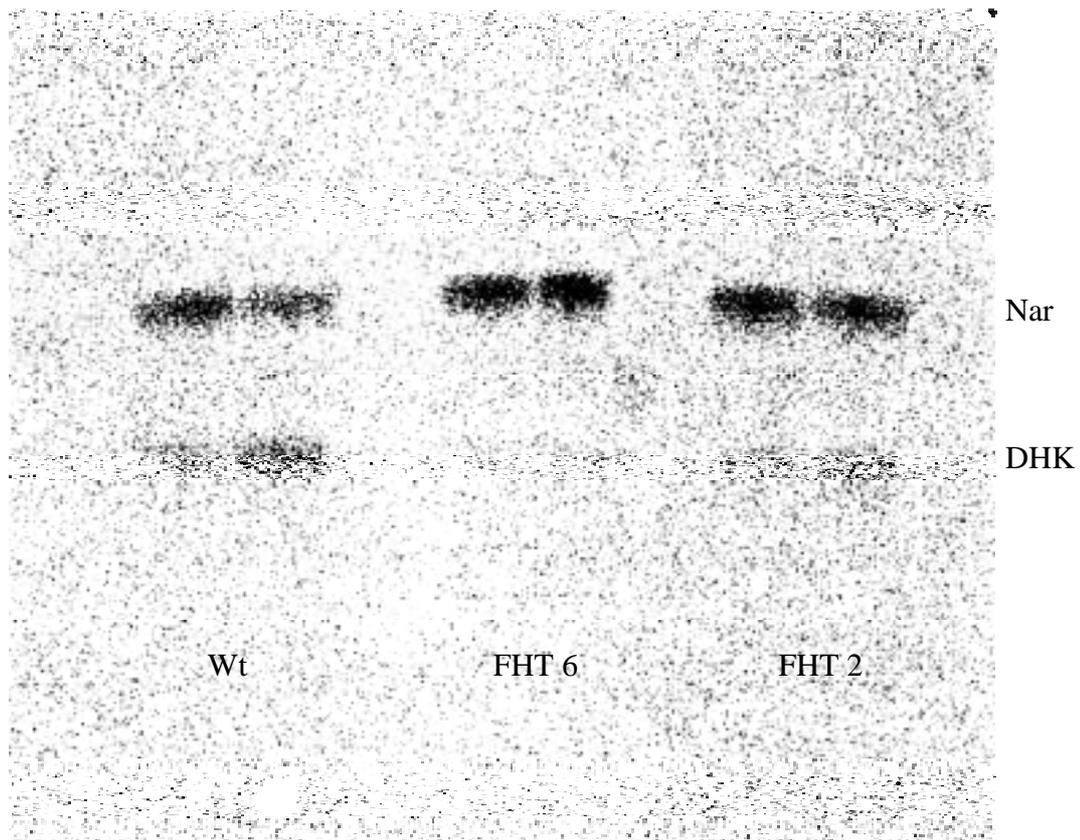


Abb.21: FHT-Enzymtest von Antisense FHT-CC (*Callistephus chinensis*), WT: Enzymtest aus Petalen nicht transformierter Pflanzen; FHT6, FHT2: Enzymtest aus Petalen transformierter Pflanzen

Im FHT-Enzymtest ist bei FHT6 und FHT2 eine reduzierte Bildung von DHK (Dihydrokämpferol) zu beobachten während das als Substrat eingesetzte Naringenin deutlich zu erkennen ist (Abb.21). Dagegen ist beim Wildtyp (Wt) eine deutlich höhere FHT-Aktivität zu beobachten, d.h. Naringenin wird zu einem bestimmten Teil zu Dihydrokämpferol umgesetzt. Anhand dieser Ergebnisse ist von einer Hemmung der FHT durch das heterologe Antisense-Konstrukt auszugehen.

3.3.4 *Osteospermum*

Aus enzymatischen Untersuchungen ging hervor, daß die Anthocyan synthese bei der Sorte "Zulu" und auf der Blattoberseite von "Nairobi" unterbrochen ist. Fehlende DFR-Aktivität, fehlende ANS-Aktivität oder eine Kombination sind als Grund dafür anzusehen. Da die Anthocyan synthese bei der Sorte Kalanga intakt ist, zeigt sich eine rosa-pinke Blütenfärbung (C. Seitz, pers. Mitteilung).

Die Gewebekultureignung von *Osteospermum* zeigt sich bei Regenerationsansätzen nach Allavena *et al.* (1996).

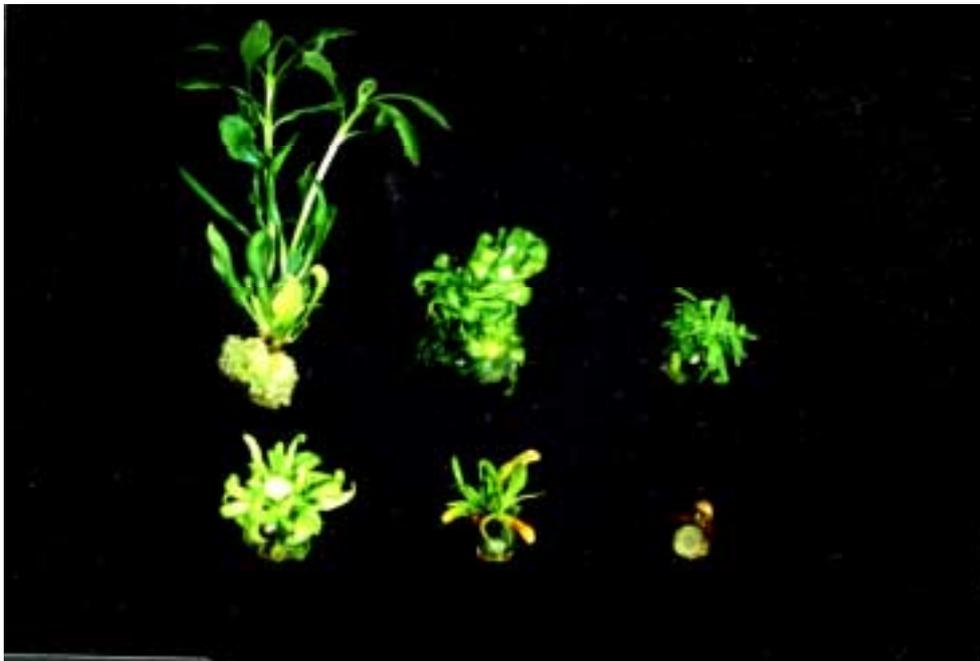


Abb.22: Regeneration von Sproßexplantaten

Die aus Abbildung 22 deutlich hervorgeht, ist an jedem Explantat die Bildung von mindestens einer Sproßanlage zu beobachten, d.h. die gewählten Bedingungen stellen gute Voraussetzungen für Transformationsansätze dar.



Abb.23: Putativ transgener Sproß aus *Osteospermum* Blattexplantaten nach 6-wöchiger Kanamycin Selektion

Transformationen wurden mit einem cointegrativen (DFR aus *Gerbera hybrida*) und einem binären Vektorsystem (DFR von *Malus domestica* bzw. *Pyrus communis*) durchgeführt. *Agrobacterium*-Stamm und zugehörige Selektion des cointegrativen Systems sind unter 2.5.3 beschrieben. Das binäre System besteht aus dem Stamm EHA 105 und dem Binärvektor pBI 121. Die zur Erstellung des Systems notwendigen Methoden sind unter 2.1 und 2.2 beschrieben. Da der für *Petunia hybrida* genutzte Stamm LBA 4404 nach Allavena *et al.* (1998) für *Osteospermum ecklonis* nicht geeignet ist, wurde der Stamm EHA 105 verwendet. Damit werden Probleme mit der Infektiösität und der DNA-Übertragung grundsätzlich ausgeschlossen. Die für die Transformation gewählten Bedingungen führten zur Regeneration und zum Teil auch zur Sproßbildung unter Selektionsbedingungen (Abb.23).

3.3.5 *Matthiola incana*

Ansätze zur Regeneration und Transformation von am Lehrstuhl vorhandenen Zuchtlinien wurden durchgeführt, da die genaue Kenntnis der Flavonoidbiosynthese einiger Linien den gezielten Eingriff mit gentechnischen Methoden erlaubt. Dadurch wäre man in der Lage, durch Komplementationen bestimmte Blockaden im Syntheseweg zu beheben.

Die Linien 7 und 8 wurden auf Regenerierbarkeit mit verschiedenen Medien (MS-Medium als Grundlage) getestet. Für die Versuche wurden Hypocotyl-Explantate verwendet, die wie unter 2.4.1.5 beschrieben angezogen wurden. Folgende Medienvarianten wurden getestet:

Variante 1: 0,1 mg/l Thidiazuron	Variante 2: 0,01 mg/l Thidiazuron
Variante 3: 1 mg/l Thidiazuron	Variante 4: 2 mg /l Kinetin; 2 mg/l NAA
Variante 5: 2 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA	Variante 6: 2 mg/ l 2iP; 0,2 mg/l NAA

Da die Unterschiede zwischen Linie 7 und 8 nur gering waren, wurden die einzelnen Linien nicht extra erwähnt. Die Varianten 4, 5 und 6 führten durchweg zu leichter Kallusbildung an den Explantatenden. Wurzelbildung an mehr als 50 % der Explantate wurde bei Variante 5 beobachtet. Wesentlich deutlichere Auswirkungen ergaben die Ansätze (Varianten 1, 2, 3) mit verschiedenen Thidiazuron-Konzentrationen. Hier war im Gegensatz zu den Varianten 4 bis 6 zwar keine Kallusbildung zu beobachten, jedoch kam es zu klar sichtbaren Verdickungen an den Explantaten. Besonders deutlich zeigte sich dies bei Variante 1. Bei 80 % der Explantate kam es hier zu Verdickungen, zum Teil waren Sprossansätze zu erkennen. Während der

weiteren Kultivierung konnten einige Sprosse zu Pflanzen regeneriert werden. Allerdings war die Regenerationsrate für Transformationsexperimente zu gering und nicht immer reproduzierbar. Für die erfolgreiche DNA-Übertragung sind daher nicht auf die Gewebekultur angewiesene Transformationsmethoden wie Infiltration oder Meristem-Electroporation besser geeignet.

3.3.6 *Arabidopsis thaliana*

Das Ausgangsmaterial wurde wie unter 2.4.1.6 beschrieben angezogen und für die Transformation vorbereitet, die wie unter 2.5.4 beschrieben durchgeführt wurde. *Arabidopsis thaliana* wurde zur Transformation verwendet, da sich die Pflanze durch ihre kurze Generationszeit gut als Testsystem eignet. Da bei *Arabidopsis* bislang keine Flavone nachgewiesen wurden, wäre die funktionelle Expression der Flavonsynthase II (FNS II) relativ einfach mittels Inhaltsstoffanalyse nachzuweisen. Dazu wurden Transformationsversuche mit der FNS II aus *Gerbera hybrida* unternommen.



Abb.24: *A. thaliana* Keimlinge auf Selektionsmedium

Außerdem läßt sich die große Anzahl an bekannten und gut charakterisierten Mutanten für Komplementationen ausnutzen. Die Mutante *tt7* (transparent testa 7) besitzt beispielsweise keine 3'-Hydroxylase-Aktivität, was zu einer ungefärbten, leicht grünlich schimmernden

Samenschale führt. Durch die Expression der klonierten 3'-Hydroxylase aus *Matthiola incana* (Eder, 2001) könnte einerseits deren Funktion bewiesen und andererseits der Defekt in der Flavonoidbiosynthese behoben werden.

Neben den oben beschriebenen Eigenschaften von Arabidopsis war die ohne Gewebekultur auskommende Transformationsmethode ein weiterer Grund, sich mit dem System näher zu befassen. Die gesammelten Erfahrungen mit der "dip"-Methode (Clough und Bent 1999) könnten auf die ebenfalls zur Familie der *Brassicaceae* gehörenden Levkojen übertragen werden. Dadurch könnte ein Transformationssystem für *Matthiola incana* etabliert werden, das ohne die in diesem Fall problematische Gewebekultur auskommt. Es wurden mehrere Transformationen durchgeführt, Samen geerntet, sterilisiert und auf Selektionsmedium ausplattiert (Abb.24).

Die nach vier Wochen auf Selektionsmedium (100 mg/l Kanamycin) kultivierten Pflanzen wurden wie unter 2.5.5 beschrieben in Erde überführt (Abb.25).



Abb.25: Auf Selektionsmedium gekeimter Sproß von *A.thaliana* in Erde überführt

Aus Blattmaterial isolierte DNA wurde mittels PCR auf Integration der Fremd-DNA überprüft.

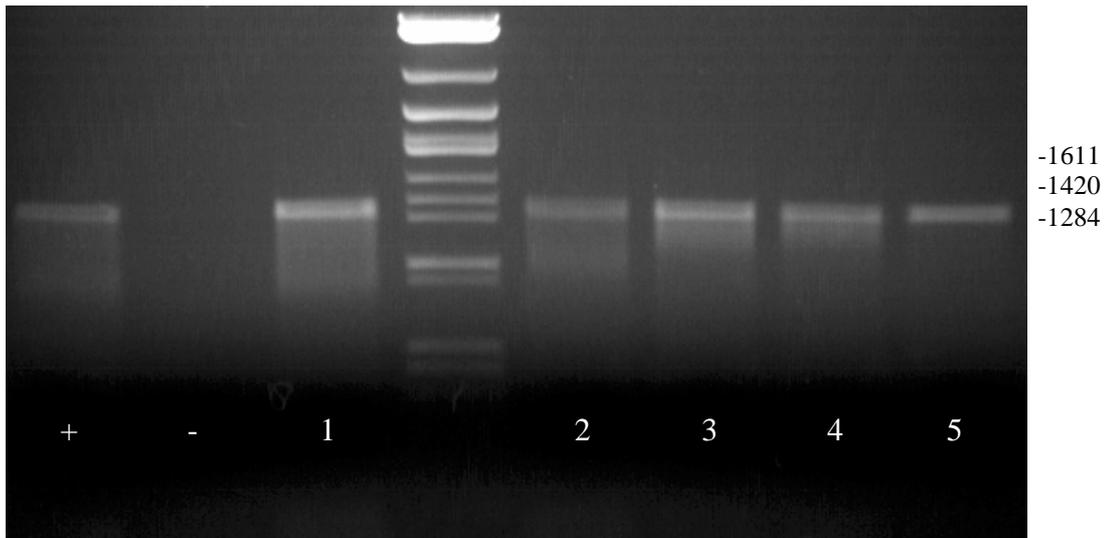


Abb.26: PCR-Überprüfung auf Selektionsmedium gekeimter Pflanzen mit NPT II-Primern

Positiv (+) und negativ (-) Kontrolle zeigen im Zusammenhang mit den Proben 1-5 die Übertragung des Selektionsmarkers (Abb.26). Damit wurde die erfolgreiche Transformation von *A. thaliana* nachgewiesen, die durch Southern Hybridisierung und Nachweis der Enzymaktivität noch bestätigt werden muß.

3.4 Ergebnisse der transienten Genexpression mittels Genkanone

Die transiente Genexpression mittels Genkanone ist eine Technik, die eine Bestätigung angenommener Blockaden der Flavonoidbiosynthese in relativ kurzer Zeit erlaubt. Die dazu angesetzten Versuche wurden wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle wurden Blütenblätter einer weißblühenden Linie von *Matthiola incana* mit einem GUS-Konstrukt beschossen. Die nach Jefferson (1987) durchgeführte Anfärbung zeigt deutlich die Expression des GUS-Gens im pflanzlichen Gewebe (Abb. 27).

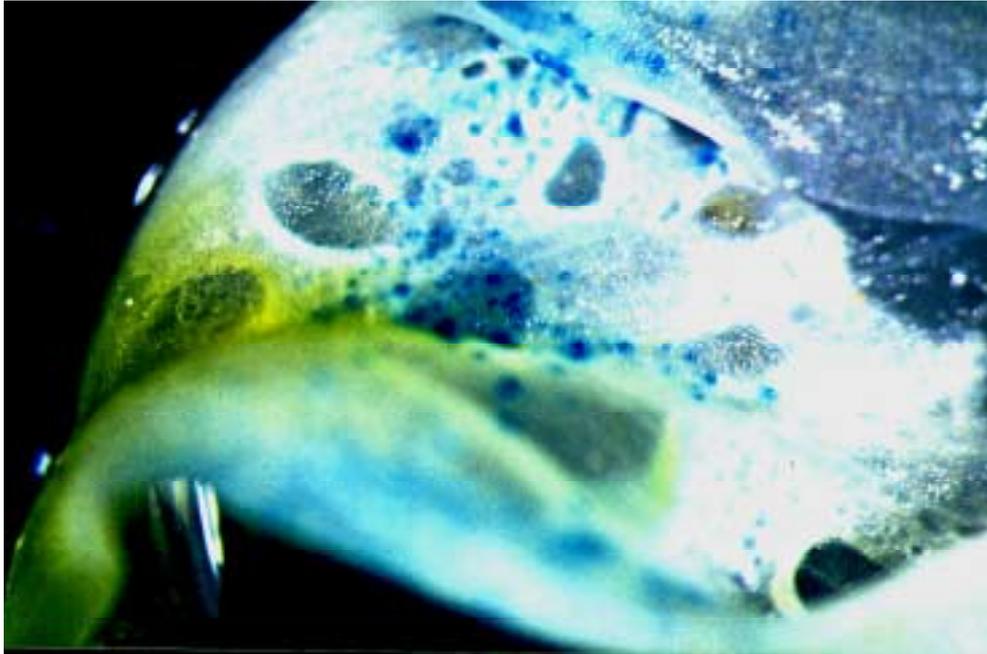


Abb.27: GUS-Assay von beschossenen *M. incana* Petalen (Linie 17)

Mit einem ANS-Konstrukt (Anthocyanidinsynthase), wie unter 3.1.2 beschrieben, wurden 2-3 cm² große Stücke der Spatha von *Zantedeschia spreng.* beschossen

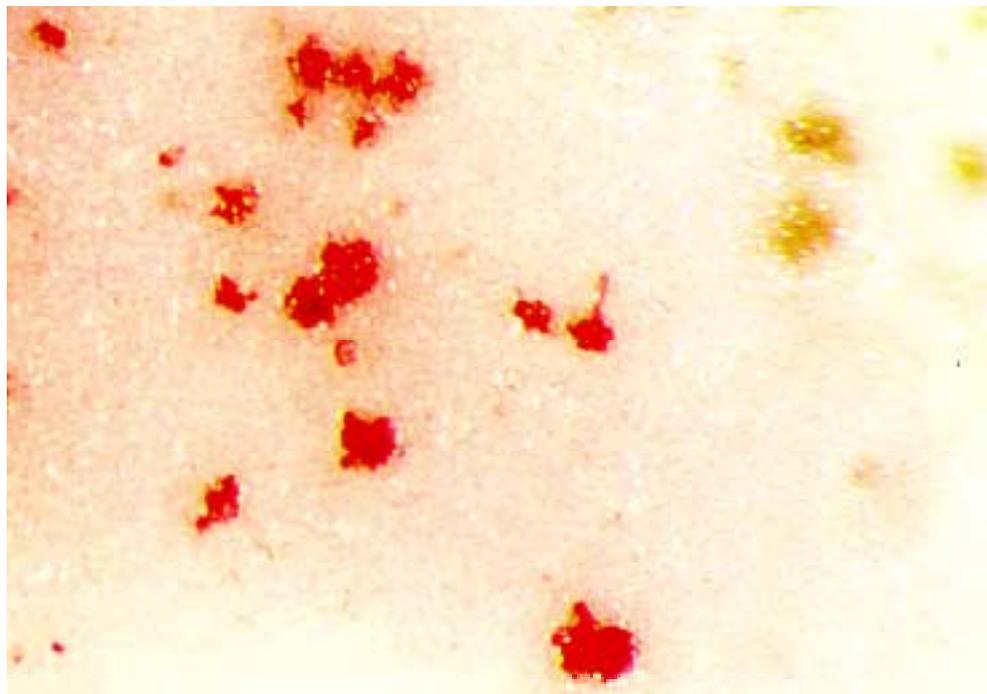


Abb.28: Mit einem ANS-Konstrukt beschossendes *Z spreng.* Blütenblatt

Die verwendete Sorte wurde bezüglich der farbgebenden Inhaltsstoffe von N. Oswald (pers. Mitteilung) näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die weiße Blütenfarbe auf eine

Blockade der Anthocyansynthese zurückzuführen ist. Höchstwahrscheinlich ist die fehlende Funktion der ANS der Grund für die weißen Blüten.

Die Stellen, an denen die Goldpartikel auf das Gewebe getroffen sind und die Partikel selbst sind deutlich zu erkennen (Abb.28+29). An den Rändern bildet sich eine rötliche Färbung, die wahrscheinlich durch gebildete Anthocyane bedingt ist. In den mit "nackter" DNA beschossenden Kontrollen ist keine Verfärbung zu beobachten, d.h. die Bildung der Farbstoffe hängt mit der Übertragung und transienten Expression der ANS zusammen. Zur genaueren Überprüfung sollten die Farbstoffe extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie oder HPLC analysiert werden.

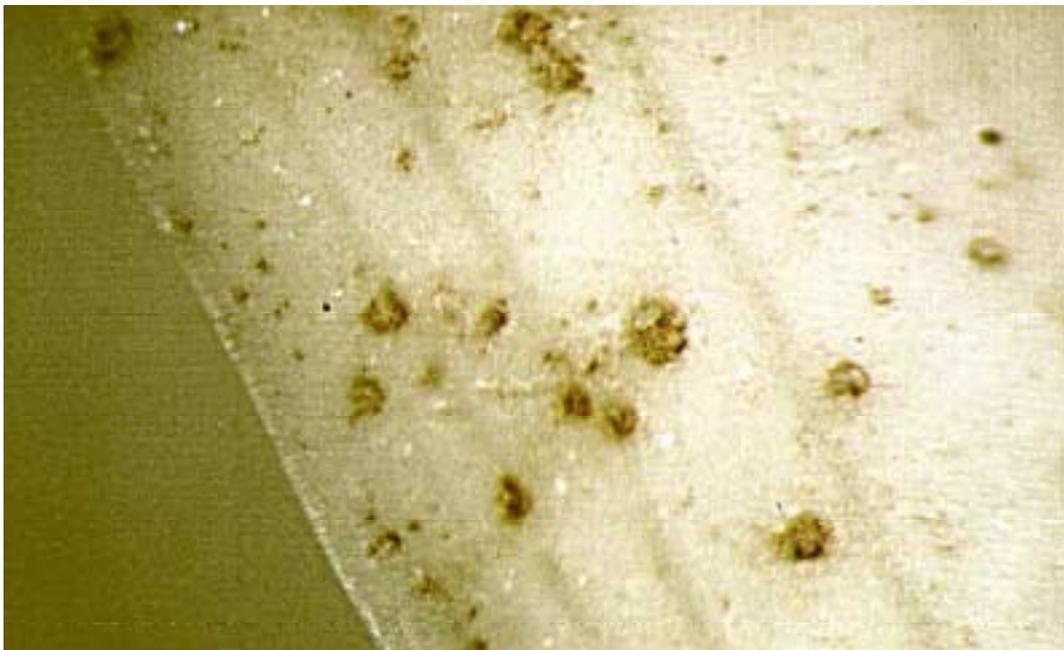


Abb.29: Kontrolle mit leerem Vektor

4. Diskussion

4.1 Vektoren und Selektionssysteme

Die für Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* zwingend notwendigen und in dieser Arbeit verwendeten Binärvektoren sind unter 3.1.1. angegeben. Die Vektoren pBi121 und pGPTV sind Abkömmlinge von pBIN19, das Grundgerüst ist gleich und die Unterschiede beziehen sich auf die Organisation der T-DNA. Während pBIN19 neben dem Selektionsmarker nur das *lacZ*-System zum "Bluewhite-screening" enthält, besitzen pBi 121 und pGPTV vollständige, bzw. zur Überprüfung von Promotoren geeignete Reporter-genkassetten. Der wichtigste Unterschied von pGPTV zu pBIN19 und zu pBi121 besteht jedoch in der Anordnung des Selektionsmarkers, der bei pGPTV an der linken Bordersequenz liegt. Dadurch wird bei der am RB beginnenden DNA-Übertragung gewährleistet, daß zuerst das jeweilige Gen und dann der Selektionsmarker übertragen wird. Es wird somit das Auftreten von marker-resistenten (Kanamycin) Pflanzen vermieden, die aufgrund eines Abbruches bei der DNA-Übertragung nur den Selektionsmarker enthalten.

Eine ebenfalls wichtige Rolle spielt die Selektion des Plasmides in *E. coli* und besonders in *Agrobacterium*. Da einige *Agrobacterium*-Stämme eine chromosomale oder Ti-Plasmid lokalisierte Resistenz besitzen, ist bei der Zusammenstellung von Bakterien-Stamm und Binärvektor auf eventuelle Überschneidungen bezüglich der Resistenz zu achten. Alternativen zu den oben erwähnten und auf Kanamycin zu selektionierenden Vektoren bieten z.B. die pGA-Serie mit Tetracycline (An *et al.* 1985) oder die pCGN-Serie (McBride und Summerfelt, 1990) mit Gentamycin als Selektionsmarker. Von Bedeutung sind diese Vektoren bei der Verwendung des Stammes EHA 101, der auf dem Ti-Plasmid eine Kanamycin-Resistenz enthält. Das Problem von sich überschneidenden Resistenzen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Nutzung von EHA 105 gelöst. Dieser Stamm entspricht EHA 101 bis auf die deletierte Kanamycin-Resistenz, besitzt also die gleiche Infektiosität und das gleiche Wirtsspektrum. Auf Kanamycin selektierte Binärvektoren wie pBi121 oder die pGPTV-Serie können deshalb in Verbindung mit EHA 105 für Transformationsansätze genutzt werden.

Weiterhin ist es vorteilhaft, Binärvektoren zu benutzen, die Alternativen bei der Auswahl des Selektionsmarkers bieten, da bestimmte Pflanzen (z.B. Pelargonium) nicht mit Kanamycin selektiert werden können. Außerdem lassen sich Konstrukte für eine Zweit- oder Dritt-Transformation, bei der jeweils andere Selektionssysteme verwendet werden müssen, leichter herstellen, da in den betreffenden Vektorsystemen oft nur der Selektionsmarker ausgetauscht wurde und daher die zur Klonierung notwendigen Schnittstellen nicht verändert wurden. Gute Beispiele dafür sind die schon erwähnte pGPVT-Serie und die pGreen-Serie (Hellens *et al.*

2000), die neben Kanamycin und Hygromycin unter anderem auch einen Selektionsmarker für Bialaphos besitzen. Problematisch sind chromosomale oder Plasmid (Ti-Plasmid oder Binärvektor) lokalisierte Resistenzen bei *Agrobacterium tumefaciens*, die Penicillin-Derivate betreffen, da diese Art von Antibiotika (z.B. Ampicillin oder Carbenicillin) häufig zum Abtöten der Bakterien nach der Co-Kultur eingesetzt wird.

Neben den etablierten Selektionsmethoden, die eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide verleihen, sind aufgrund von Bedenken der Öffentlichkeit neue Strategien zur Selektion entwickelt worden. Während einerseits die Anwendung von alternativen Auslesemethoden verfolgt wird, konzentriert man sich andererseits auf das Entfernen des jeweiligen Resistenzgens. Dabei werden bei der Transformation für das jeweilige Gen und den Selektionsmarker zwei T-DNA's eingesetzt, so daß bei einer nicht vorhandenen Kopplung der Marker durch Kreuzungen entfernt werden kann (Komari *et al.* 1996). Ein anderer Ansatz nutzt das Cre-lox System zur Entfernung des Markers nach erfolgter Selektion. Dabei wird der Selektionsmarker zwischen zwei lox-Motive kloniert, die von der Recombinase Cre erkannt und ausgeschnitten werden. Das Enzym kann durch Kreuzungen, eine zweite Transformation oder induzierbare Promotoren exprimiert werden (Dale und Ow 1991). Erfolgversprechender sind Entwicklungen, die eine Selektion ohne Antibiotika oder Herbizide verfolgen. Das Gen *xylA* aus *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* katalysiert beispielsweise die Reaktion von D-Xylose zu D-Xylulose, das von Pflanzen als C-Quelle genutzt werden kann, was bei D-Xylose nicht möglich ist (Haldrup *et al.* 1998). Eine ähnliche Reaktion bewirkt das *manA* Gen aus *E. coli*, das Mannose-6P, von Pflanzen nicht als C-Quelle nutzbar, zu Fructose-6P umformt, das dann von der Pflanze verwertet werden kann (Joersbo *et al.* 1998). Die Verwendung von Markern, die die C-Versorgung des regenerierenden Gewebes betrifft, stellt damit eine sinnvolle Alternative zu den in die Kritik geratenden, auf Antibiotika basierenden Systemen dar.

Für den Gebrauch in rein wissenschaftlichen Untersuchungen ist die Handhabbarkeit des Binärvektors (Größe, Kopienzahl, Schnittstellen) wichtiger als der Selektionsmarker, da aufgrund der Beschränkung auf geschlossene Systeme (Kulturraum, Gewächshaus) auf eventuelle Auswirkungen auf die Umwelt keine Rücksicht genommen werden muß. Im Gegensatz dazu spielt bei konkret anwendungsbezogenen Ansätzen die Wahl des Selektionsmarkers eine große Rolle. Zum einen sind patentrechtliche Gegebenheiten zu bedenken, und zum anderen würde der Verzicht auf Antibiotika oder Herbizid basierenden Selektionssystemen Gegenargumente bei Freisetzungen entkräften.

Weitere Vektor- und Selektionssysteme wie die "negative Selektion" oder NTL-Vektoren stellen Anwendungen dar, die für besondere Fälle verwendet werden. So besteht z.B. mit Hilfe der negativen Selektion die Möglichkeit, gewebespezifische Modifikationen genauer zu untersuchen, da das übertragene Gen eine im Medium befindliche Substanz in deren phytotoxische Form umwandelt, die dann zum Absterben des betroffenen Gewebes führt. Die NTL-Vektoren (Non T-DNA Lethal gene containing T-DNA vectors) enthalten direkt neben der linken Bordersequenz ein letales Gen, das bei Expression zum Absterben des transgenen Gewebes führt. Dadurch wird die Übertragung von Vektor-Sequenzen, die außerhalb der Border-Sequenzen liegen, vermieden (Hanson *et al.* 1999).

Eine Kombination zwischen *Agrobacterium* vermitteltem Gentransfer und dem biolistischen Verfahren stellt die Agrolistic dar (Hansen und Chilton 1996). Dabei werden die im Agrosystem für die Generation des T-Stranges notwendigen Gene *virD1* und *virD2* zusammen mit dem Gen von Interesse per Genkanone übertragen. Das Konstrukt von Interesse wird dabei von den aus dem Agro-System stammenden Bordersequenzen flankiert, so daß es durch die Funktion von *VirD1* und *VirD2* zur Bildung von Einzelsträngen kommt, die dann in das pflanzliche Genom integriert werden. Durch dieses System wird die Bildung von "multi-copy"-Insertionen vermieden, die häufig bei der biolistischen Transformation auftreten und zu Instabilitäten oder "Silencing" führen können.

Neben den oben erwähnten Binärvektoren kommen für Transformationen auch cointegrative Vektoren zum Einsatz, die aus der homologen Rekombination zwischen einem vorbereiteten intermediären Vektor und dem entwaffneten Ti-Plasmid hervorgehen. Es wird angenommen, daß die Verwendung dieser Vektoren zu höheren Transformationsraten führt, was mit der Anordnung der *vir*-Gene "in cis" zusammenhängen könnte. Nachteilig wirken sich die im Gegensatz zu den Binärvektoren aufwendigere Herstellung und Überprüfung aus, sicherlich ein Grund für die geringe Verbreitung dieser Vektoren.

Um große DNA-Fragmente in pflanzliche Zellen übertragen zu können, wurden spezielle Vektoren entwickelt. BIBAC und TAC (Shibata und Liu 2000) sind ähnlich wie Binärvektoren aufgebaut, enthalten aber zusätzliche Elemente, um die Stabilität der Plasmide in *E.coli* und *Agrobacterium* zu gewährleisten. Es konnte die Übertragung von einem 150 kb Fragment mit BIBAC in Tabak und einem 80 kb Fragment mit TAC in Arabidopsis nachgewiesen werden. Die Funktion dieser Vektoren ist unabhängig von dem verwendeten *Agrobacterium*-Stamm, wie Versuche mit LBA 4404, EHA 105, C58C1 und anderen zeigten. Der Einsatz dieser Vektoren könnte bei der gentechnischen Manipulation von Blütenfarben eine Rolle spielen, da es teilweise die fehlende Funktion mehrerer Gene der Flavonoid-

biosynthese ist, die zu schwacher oder keiner Färbung der Petalen führt. Außerdem könnten Gene mit regulatorischen Eigenschaften oder mit Einfluß auf den Transport in die Vakuole mitübertragen werden. Zusammengenommen erlauben diese Vektoren die Übertragung mehrerer Gene mit einem Transformationsansatz, so daß auf zeit- und arbeitsintensive Zweit- oder Dritt-Transformationen mit jeweiligem Markerwechsel verzichtet werden kann.

4.2 Einfluß verschiedener *Agrobacterium*-Stämme auf die Transformation

Den sicherlich größten Einfluß auf den Erfolg einer Transformation hat die Wahl des verwendeten Bakterien-Stammes. Aus Untersuchungen von De Cleene und De Ley (1976) ging hervor, daß WHR-Stämme (wide-host-range) einen Großteil von 93 getesteten Familien infizieren konnten, darunter auch die zu den Monokotylen zählenden Familien Liliaceae und Araceae. Im Gegensatz dazu sind LHR-Stämme "limited-host-range" nur zur Infektion einiger weniger Familien fähig. Die Unterschiede im Wirtsspektrum und der Infektiösität sind vor allem in verschiedenartiger T-DNA und Strukturunterschieden bei einigen *vir*-Genen begründet (Hansen und Chilton 1999). Als infektiös wurden Stämme angesehen, die an den behandelten Pflanzen und Geweben eine Bildung von Tumoren induzierten. Weitere Indizien waren Kalluswachstum auf hormonfreiem Medium und das Vorkommen von Opinen und dessen Derivaten in behandeltem Gewebe (Smith und Hood 1995). Der Nachweis der Genübertragung durch Opin-Vorkommen gilt nur für Monokotyle, da Dikotyle in der Lage sind, Opine als Nebenprodukt des Arginin-Stoffwechsels im Kallus und im pflanzlichen Gewebe zu bilden können (Christou *et al.* 1986).

Die heute am häufigsten verwendeten Stämme sind der supervirulente Stamm A281 mit dem Ti-Plasmid pTiBO542 und einer chromosomalen C58-Abstammung. Die entwaffneten Varianten des Succinamopine-Typen sind EHA 101 und EHA 105. Daneben wird der Octopin-Typ Ach5 genutzt, dessen chromosomaler Hintergrund Ach5 mit dem Ti-Plasmid pTiAch5 ist. Die entwaffnete Variante heißt hier LBA 4404. Am weitesten verbreitet ist der Stamm C58 (Nopaline-Typ) mit gleichnamigem chromosomalem Hintergrund, dem Ti-Plasmid pTiC58 und verschiedenen Helferplasmiden wie pMP90 oder pGV3850. Die Variante C58C1 des Stammes enthält anstatt des Wildtyp-Ti-Plasmides entwaffnete Ti-Plasmide anderer *Agrobacterium*-Stämme wie z.B. pGV3101 oder pGV2260 (Gartland und Davey 1995).

4.3 Transformationsmethodik

4.3.1 Allgemeiner Transformationsablauf

Da es zur Zeit und in absehbarer Zukunft kein Transformationsprotokoll gibt, bzw. geben wird, das generell anwendbar ist und bei verschiedenen Arten zu transgenen Pflanzen führt, kann man nur grundsätzliche Schritte vergleichen und übertragen. Die Grundlage von vielen Transformationsmethoden beruht auf der Blattscheiben-Methode "Leaf disc" von Fraley (1983) und Horsch (1985). Blatt- oder Gewebeexplantate werden dabei mit geeigneten *Agrobacterien* infiziert, für eine bestimmte Zeit kokultiviert und auf geeignetem Medium selektiert, das gleichzeitig die Regeneration putativ transgener Sprosse bewirkt. Zur Abtötung der *Agrobacterien* ist neben dem Zusatz von wirksamen Antibiotika im Selektionsmedium oft ein Waschschrift zum Entfernen der anhaftenden Bakterien notwendig. Die am häufigsten variierten Parameter sind Art des zu transformierenden Gewebes, Bakterienstamm, Infektionszeit, Dauer der Kokultur, Art der Selektion und Art der Bakterienabtötung. Zu den weiteren Faktoren, die einen Einfluß besitzen, aber nicht entscheidend sind, gehören pH-Wert, Temperatur während der Übertragung, Antioxidantien und der Einsatz von Ammenkulturen (Hansen und Chilton 1999 und Zitate darin). Wichtiger ist dagegen die Vorbehandlung des zu transformierenden Gewebes. Eine Pre-Kultur-Phase auf hormonhaltigem Medium bewirkt z. B. bei *Petunia hybrida* Änderungen im Zellzyklus. Der Status der sich normalerweise in der G₀-G₁ Phase (zu 98%) befindlichen Mesophyllzellen wird durch den Hormoneinfluß geändert, so daß sich nach 2-3 Tagen über 75% der Zellen in der S-G₂-M Phase befinden. Besonders während der DNA-Replikation (S-Phase) und der Zellteilung (M-Phase) findet die stabile Integration der T-DNA statt, d. h. diese Phasen sind am geeignetsten für Transformationsansätze (Villemont *et al.* 1997). Eine andere Art der Vorbehandlung beschreiben Ansätze, in denen Gewebe vor der eigentlichen Infektion mit *Agrobacterium* durch Partikelbeschuß oder Ultraschall verletzt werden. So konnten beispielsweise transgene Nelken regeneriert werden, die vor der *Agrobacterium*-Transformation mittels Partikelbeschuß verletzt wurden (Zucker *et al.* 1998). Durch Ultraschallbehandlung einer Lösung aus *Agrobacterium* und einer embryogenen Suspensionskultur von *Glycine max* (L.) Merrill konnten transgene Pflanzen regeneriert werden, was bei der Transformation ohne Ultraschallbehandlung nicht der Fall war (Trick und Finer 1997). Anhand der beschriebenen Methoden und Alternativen bzw. Besonderheiten lassen sich Hinweise zur Verbesserung der Effizienz und zur Transformation noch nicht verwendeter Arten und Sorten ableiten.

Trotz der weitreichenden Kenntnisse und Erfahrungen auf dem Gebiet der Transformation mit *Agrobacterium* hat sich gezeigt, daß die Kompetenz des pflanzlichen Ausgangsmaterials in

Bezug auf Aufnahme, Kerntransport und Integration der T-DNA, sowie in Bezug auf die Regeneration den größten Einfluß auf den Erfolg eines Transformationsansatzes hat. Deutlich wird dies besonders bei den gemachten Fortschritten bei der Transformation monokotyler Pflanzen, die neben der Weiterentwicklung des Agro-systems (Super-Binärvektoren) hauptsächlich auf optimierten Gewebekulturmethoden beruhen. Obwohl mittlerweile für fast alle wichtigen Kulturpflanzen erfolgreiche Transformationen publiziert sind, betreffen diese Methoden doch oft nur bestimmte "Laborsorten", wie z. B. "Golden Promise" bei *Hordeum vulgare* oder "A 188" bei *Zea mays*. Eine Ausnahme bildet die unter 2.5.5 beschriebene "dip-Methode" zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, die bereits bei vielen Ökotypen erfolgreich angewendet wurde. Die Sortenspezifität verlangt daher die Anpassung des jeweiligen Protokolles für jede Linie oder Sorte einer Art. Diese Anpassung bezieht sich dann vor allem auf die *in vitro* Kultur, d.h. auf eine effektive Regeneration und Selektion.

4.3.2 Spezielle Transformationmethoden

4.3.2.1 *Petunia hybrida*

Ein Beispiel für die Sortenspezifität sind diverse Transformationsmethoden für verschiedene Sorten von *Petunia hybrida*. So wird beispielsweise *Petunia axillaris* M1 x SKR4 auf MS-Medium mit 1 mg BA und 0,1 mg 2,4 D vorkultiviert und auch regeneriert (Villemont *et al.* 1997). Jorgensen *et al.* (1996) transformierten die Sorte "Pink Cascade" mit Hilfe von 75-100 µM Acetosyringon während der Co-Kultur und 1 mg BA, 0,2 mg IAA für die Regeneration. 3 mg/l BA und 0,2 mg/l IAA nutzen Deroles *et al.* (1988a) für die Transformation der Hybride "Mitchell", die als Grundlage für Untersuchungen zur Vererbung des Selektionsmarkers und zur Strukturanalyse der übertragenden T-DNA verwendet wurde (Deroles *et al.* 1988b). Ältere Methoden nutzen den direkten Gen-Transfer in Protoplasten zur Erstellung transgener Petunien. Die Regeneration wird durch 1 mg BA, 1mg IAA (Meyer *et al.* 1987) und auch durch die Verwendung einer "feeder layer" (Suspensionkultur, die durch ein Filterpapier getrennt in der selben Petrischale die Regeneration unterstützt) bewirkt. Wie der Vergleich der Protokolle zeigt, haben das Cytokinin 6-Benzylaminopurin (BA) und die Auxine Indoleessigsäure (IAA) und 1-Naphtyllessigsäure (NAA) einen großen Einfluß auf die Regeneration von *Petunia hybrida* Blattexplantaten. Bei der Entwicklung von Regenerationsprotokollen für weitere Linien sollte dabei vor allem die Modifikation des BA:NAA bzw. IAA-Verhältnisses betrachtet werden. Ähnliche Regenerationseffekte wurden bei *Nicotiana tabacum* beobachtet, während die auch zur Familie der Solanaceae gehörende *Lycopersicon*

esculentum (Tomate) und *Solanum tuberosum* (Kartoffel) andere Hormonzusammensetzungen für die Regeneration benötigen. Dadurch wird deutlich, daß Regenerationsprotokolle nur bedingt innerhalb einer Art und selten innerhalb einer Familie übertragen werden können.

Trotz einer funktionierenden Regeneration konnten von der FHT-Mutante W39 keine transgenen Pflanzen regeneriert werden. Wie schon unter 3.4.1 erwähnt, ist das hauptsächlich auf die fehlende Vitalität des Blattmaterials zurückzuführen, was durch die Verwendung von Gewächshausmaterial umgangen werden kann. Eine andere Möglichkeit besteht darin, eine nur sehr kurze Infektionszeit zu wählen oder die Infektion durch ein in Agro-Suspension getauchtes Skalpell während des Zerschneidens der Explantate durchzuführen. Langfristig besteht auch die Möglichkeit, durch Kreuzungen einen kräftigeren Habitus zu erzeugen, was allerdings langwierig und arbeitsintensiv ist.

4.3.2.2 *Gerbera hybrida*

Als eine der wichtigsten Schnittblumen besteht für *Gerbera hybrida* schon seit jeher ein Interesse an der Qualitätsverbesserung mit züchterischen Methoden und seit ein paar Jahren auch mit molekularbiologischen Methoden. Basierend auf den in den siebziger und achtziger Jahren erlangten Kenntnissen (Pierik *et al.* 1975, Jerzy *et al.* 1991, Reynoird 1996) bezüglich der Regenerationsfähigkeit einzelner Organe gelang es, von einzelnen Sorten transgene Pflanzen zu regenerieren. Bei den Untersuchungen wurde deutlich, daß sich Petiolen junger Blätter für die Regeneration am besten eignen. Zum Teil konnten auch gute Regenerationsergebnisse an jungen Blättern beobachtet werden, während ausdifferenzierte Blätter wesentlich schlechter auf die Hormongaben ansprachen. Die Grundlage für Transformationsansätze schafften Caissard *et al.* (1987) mit dem Nachweis der erfolgreichen Transformation von verwundeten *G. jamesonii* Sprossen mittels Wildtyp *Agrobacterium rhizogens* Stämmen. GUS-Aktivität konnte in transgenen *Gerbera*-Pflanzen (Kaul, unveröffentlicht) nachgewiesen werden, die mit dem System LBA 4404/pBI121 transformiert worden sind (Hutchinson *et al.* 1992). Elomaa (1996) gelang erstmals eine phänotypische Änderung durch Fremdgenexpression in *Gerbera hybrida*. Die rotblühende Sorte "Terra Regina" wurde mit einem antisense-Konstrukt der Chalkonsynthase 1 aus *Gerbera* transformiert, was in einigen Transformanten zu einer stark reduzierten Blütenfärbung führt. Das dazu entwickelte Transformations-Protokoll erlaubt reproduzierbare Transformationsraten von 0,1-2% und wurde als Grundlage für die Ansätze am Lehrstuhl genutzt. Den Einfluß

von unterschiedlichen Agro-Stämmen auf die Transformation untersuchten Orlikowska und Nowak (1997) an fünf verschiedenen Sorten. Die Stämme LBA 4404, EHA101 und EHA105 zeigten sich als geeignet, die T-DNA zu übertragen. EHA101 erbrachte die höchste Effizienz, was wahrscheinlich mit der Selektion gegen Phosphinotricin anstelle von Kanamycin zusammenhängt. Andere Gründe sind auszuschließen, da sich EHA101 und EHA 105 nur in der bei EHA 105 deletierten Kanamycin-Resistenz unterscheiden. Die Versuche zeigen, daß *Gerbera hybrida* auch mit einem Binärsystem zu transformieren ist und nicht unbedingt das von Elomaa (1996) verwendete und der Annahme nach effizientere co-integrative System benötigt.

4.3.2.3 *Osteospermum*

Die Grundlage für die *in vitro* Kultur von *Osteospermum* bilden die zur Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten gemachten Versuche an *Dimorphotheca* und *Rudbeckia* (Al-Atabee und Power, 1987). Zur Kallusinduktion wurde MS-Medium mit 2 mg/l IAA und 1 mg/l BAP verwendet, das in Verbindung mit 0,3 mg/l GA₃ das Auftreten von vitrifizierten Sprossen verhinderte (Al-Atabee und Power 1990). Die Vitrifizierung ist ein in der *in vitro* Kultur häufig auftretender Prozeß, der wahrscheinlich durch ein Ungleichgewicht von Wachstumsregulatoren im Medium bedingt wird (Leshem und Sachs 1985).

Anhand der von Rabaglio *et al.* (1995) durchgeführten Versuche wurde erstmals die erfolgreiche Transformation von *Osteospermum*-Hybriden nachgewiesen. Durch die Übertragung des Regenerationsprotokolles von *Dimorphotheca* und einer Kanamycin-Selektion konnte mittels histochemischer GUS-Färbung die stabile Fremdgenexpression gezeigt werden. Sowohl der *Agrobacterium*-Stamm GV2260 als auch der Stamm EHA105 waren geeignet, die Fremd-DNA zu übertragen. Weitere Untersuchungen zeigten dies für GV3101 (pMP90RK), während der Stamm LBA4404 nicht in der Lage war, DNA stabil ins pflanzliche Genom zu integrieren. Durch diese Ergebnisse wird die Notwendigkeit eines für die zu transformierende Pflanze infektiösen Agro-Stammes unterstrichen.

Die erfolgreiche Übertragung von phänotypisch relevanten Genen (verschiedene Konstrukte der *rol*-Gene) wurde 1999 (Giovanni *et al.*) beschrieben. Wirtschaftlich interessant ist die Erzeugung einer Resistenz gegen den TSWV-Virus "tomato spotted wilt virus" durch die Übertragung des Kapsidproteingens *N* (Vaira *et al.* 2000).

Durch die Kooperation mit einem Züchter steht dem Lehrstuhl eine große Auswahl an Sorten zur Verfügung, die hinsichtlich der Blütenfärbung sehr unterschiedlich sind. Einige Sorten

wurden in Bezug auf die Flavonoidbiosynthese genauer untersucht (C.Seitz, pers. Mitteilung), so daß unter Ausnutzung der am Lehrstuhl klonierten Gene eine Manipulation der Blütenfarbe mit gentechnischen Methoden möglich erscheint. Aufgrund des Fehlens von Flavonen sind Ansätze mit der Flavonsynthase I oder II zur Unterstützung der Co-Pigmentierung geeignet, die zu einer veränderten Farbausprägung führen könnten. Eine weitere Möglichkeit wäre die Einführung einer am Lehrstuhl klonierten 3'-Hydroxylase, um eine Anreicherung von Cyanidinglykosiden in den Petalen zu erreichen, die natürlicherweise nicht vorkommen. Außerdem ist die Expression einer DFR mit anderer Substratspezifität, z. B. aus *Malus* oder *Gerbera*, denkbar. Neben der Manipulation der Blütenfarbe durch die Expression von natürlicherweise in *Osteospermum* nicht aktiver Gene, besteht auch die Möglichkeit, Veränderungen in der Flavonoidzusammensetzung durch Überexpression oder gezielter Hemmung zu erzeugen. Von Vorteil wäre dabei die Verwendung von homologen Genen, die aus *Osteospermum* isoliert und hinsichtlich ihrer Funktion getestet werden müssen.

4.3.2.4 *Matthiola incana*

Neben *Arabidopsis thaliana* und *Antirrhinum majus* wurde *Matthiola incana* in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts als Modellpflanze für Untersuchungen der klassischen Genetik verwendet. In letzter Zeit wurde die Pflanze aufgrund ihres hohen Linolensäure-Gehalts in den Samen als Alternative bei der Ölgewinnung interessant. Daneben wurde festgestellt, daß *M. incana* eine natürliche Resistenz gegen Phytophathogene besitzt, die besonders die Gattung *Brassica* befallen, wie *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* ssp. und *Plasmodiophora brassicae* (Siemens und Sacristan, 1995 und zitierte Publikationen).

Der Nachweis von Anthocyanen in einer Kallus-Kultur war die erste Beschreibung von Gewebekultur-Ansätzen bei *M. incana* (Leweke und Forkmann, 1982), die sich allerdings bei speziellen Linien der Anthocyan-Synthese auf die Induzierung von Kallus an bestimmten Geweben beschränkte. Die Regeneration von Pflanzen aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial wurde von Gautam *et al.* (1983) und Mensuali-Sodi *et al.* (1994) beschrieben. Gautam *et al.* fanden dabei, daß geringe Mengen von BA (0,1-0,8 mg/l) im MS-Medium bei Kotyledonen zur Bildung von Sproßen führte, die durch 1 mg/l NAA bewurzelt werden konnten. Verschiedene Kombinationen von Auxinen in Verbindung mit Cytokininen bewirkten aber weder Sproßbildung noch Wurzelansätze. Im Gegensatz dazu bewirkte bei der Hybride "White King" 1 mg/l BA die höchste Sproßbildungsrate, unabhängig von der IBA-Konzentration (Mensuali-Sodi *et al.* 1994).

Infektionsversuche mit verschiedenen *Agrobacterium*-Wildtypstämmen an der Linie SC/SC führte zur Bildung von Tumoren, d.h. *M. incana* gehört zum Wirtsbereich von *Agrobacterium* (Köhn, 1994). Darauf folgende Transformationsversuche erbrachten keine Ergebnisse, so daß davon auszugehen ist, daß keine DNA-Übertragung stattgefunden hat, was durch eine nicht nachweisbare GUS-Färbung belegt wurde. Für erfolgreiche Ansätze sollte ein effektives Regenerationssystem entwickelt werden, an dem die DNA-Übertragung mittels geeigneter Reportergene (z. B. GUS oder GFP) sowohl transient als auch stabil verfolgt werden kann. Das für *A. thaliana* etablierte Protokoll der Transformation mittels Vakuum-Infiltration oder einfachem Eintauchen (dip-Methode) beschreibt eine Alternative, die auch für *M. incana* interessant ist, da sie wie auch *Arabidopsis* zur Familie der *Brassicaceae* gehört und viele Samen bildet, eine Voraussetzung für diese Methode.

Eine weitere Alternative stellt die Elektroporation von isolierten Meristemen oder von Achselknospen-Meristemen *in vivo* dar. Chowrira *et al.* (1995) nutzten eine runde Elektroporationsküvette, um sich noch an der Pflanze befindliche Achselknospen in eine Suspension aus DNA und Lipofectin-Reagenz zu tauchen und durch Anlegen einer Spannung zu transformieren. Vor der eigentlichen Elektroporation wurde mittels einer sterilen Kanüle ein Teil der DNA-Lsg. direkt in das meristematische Gewebe injiziert. Am Tag zuvor wurde das Apikalmeristem und, bis auf das terminale Achselknospenmeristem, alle weiteren Meristeme entfernt. Während in Blättern von *Pisum sativum*, die von dem behandelten Meristem abstammen, nur eine unregelmäßige GUS-Färbung zu beobachten war, zeigten einige aus Samen angezogene Nachkommen eine deutliche Färbung. Die Integration der Fremd-DNA wurde durch Southern-Blot Analysen bestätigt. Ähnliche Ergebnisse fanden Collen *et al.* (1997) bei der Elektroporation von isolierten Apikal-Meristemen von *Galegae orientalis*. Die transiente Expression des GUS-Gens wurde an Hypocotyl- und Epicotyl-Explantaten von *Phaseolus vulgaris* (Bohne) nachgewiesen. Dabei wurde deutlich, daß linearisierte DNA die Fremdgenexpression deutlich erhöht (Dillen *et al.* 1995). Der Nachteil dieser Methode besteht in der hohen benötigten DNA-Menge (200-300 µg pro Ansatz) und dem Zeitaufwand, da stabil transformierte Pflanzen erst in der F1 nachzuweisen sind. Dagegen entfällt jegliche Gewebekultur, sowie Probleme mit Kontaminationen durch *Agrobacterium*.

Die Übertragung von DNA in pflanzliches Gewebe mittels Elektrophorese beschreibt eine weitere Methode, die nur bedingt auf Gewebekultur-Techniken angewiesen ist. Dabei wird das Laufverhalten von DNA zwischen zwei Elektroden ausgenutzt, um sie in meristematisches Gewebe zu transportieren. GUS-positive Pflanzen von *Calanthe sedenii*

"Cornelius Vanderbilt" konnten von Griesbach (1994) durch die elektrophoretische Behandlung von meristematischem Gewebe *in vitro* regeneriert werden. Durch *in vivo* Versuche an *Euphorbia pulcherrima* konnten mit der gleichen Methode GUS-positive Pflanzen regeneriert werden, die Fremd-DNA stabil ins Genom integriert hatten (Bakke und Gjerde 1998).

Neben dem Verzicht auf die Gewebekultur ist die patentrechtliche Situation ein Vorteil dieser Entwicklung, da diese Methode nicht patentiert und somit frei nutzbar ist, was besonders für Transformationen mit wirtschaftlichem Hintergrund von Bedeutung ist.

4.3.2.5 Arabidopsis thaliana

Die Bedeutung von *A. thaliana* als Modellpflanze für physiologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen erfordert ein effektives und reproduzierbares Transformationssystem. Trotz bekannter Schwierigkeiten bei der *in vitro* Kultur konnten transgene Pflanzen aus verschiedenen Organen, wie z.B. Blättern (Lloyd *et al.* 1986), Wurzeln (Valvekens *et al.* 1988) oder Kotyledonen (Barghchi *et al.* 1990) regeneriert werden. Allerdings sind alle Methoden mit zeit- und arbeitsaufwendigen Gewebekulturarbeiten verbunden, die neben anderen Problemen immer die Gefahr von somaklonalen Variationen mit sich bringen. Die Verbesserung der "Agrobacterium vacuum infiltration" Methode durch Bechthold *et al.* (1993) umging diese Probleme durch eine direkte Transformation von Blütenständen *in vivo* mittels *A. tumefaciens* und verzichtete somit auf aufwendige Gewebekulturtechniken. Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes beschreibt die "floral dip" Methode (Clough und Bent 1998). Wie unter 2.5.5 ausführlich beschrieben, genügt das kurze Eintauchen blühender *A. thaliana* Pflanzen in eine mit Zucker und Silwet L-77 versetzte *Agrobacterium* Suspension, um DNA übertragen zu können. Putativ transgene Pflanzen werden aus den Samen der transformierten Pflanzen angezogen, die sterilisiert auf Selektionsmedium zum Keimen ausplattiert werden. Faktoren wie Phytohormone, Gewebekulturmedien oder Dichte der Agrobacterien sind für die Transformation nicht essentiell. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß die Methode nicht *Agrobacterium*-Stamm spezifisch und auf viele Ökotypen anzuwenden ist, was allerdings mit stark variierenden Transformationsraten verbunden ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Wildtyp "Columbia" mit der Flavonsynthase II (FNS) aus *Gerbera hybrida* transformiert, um durch funktionelle Expression des Gens die natürlicherweise in *A. thaliana* nicht vorkommenden Flavone nachzuweisen. Geerntete Samen

wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und nach erfolgter Keimung vereinzelt (3.3.6). Von den mittels PCR auf Übertragung der T-DNA positiv getesteten Pflanzen (3.3.6) wurden Samen geerntet um für weitere Untersuchungen (Inhaltsstoffanalyse, Enzymtests) Ausgangsmaterial kultivieren zu können. Außerdem wurde versucht, die Flavonoid 3'-Hydroxylase Mutante *tt7* (transparent testa 7) durch Expression der F 3'-Hydroxylase aus *Matthiola incana* zu komplementieren. Diese Mutante wurde von Koornneef *et al.* (1982) als Flavonoid 3'-Hydroxylase beschrieben. Bei *A. thaliana* sind 11 Loci (*tt1* - *tt10* und *ttg*) bekannt, die einen Einfluß auf die Flavonoidsynthese besitzen, wobei *tt3*, *tt4*, *tt5*, *tt6* und *tt7* für Strukturgene codieren, *tt8* und *ttg* wahrscheinlich für regulatorische Sequenzen codieren und für *tt1*, *tt2*, *tt9* und *tt10* noch keine Funktion bekannt ist (Shirley *et al.* 1995).

4.3.2.6. *Pelargonium*

Trotz der Bedeutung von *Pelargonium* als Zierpflanze sind relativ wenig Berichte veröffentlicht, die sich speziell auf die Transformation oder, weiter gefaßt, auf die Züchtung mit molekularbiologischen Methoden beziehen. Einerseits spielen beobachtete somaklonale Variationen bei der Regeneration eine Rolle, andererseits werden Untersuchungen an wirtschaftlich interessanten Pflanzen häufig von privatwirtschaftlichen Unternehmen durchgeführt, die ihre Projekte und Ergebnisse aus kommerziellen Gründen nicht veröffentlichen. Methoden zur Regeneration von Sprossen aus verschiedenen Organen wie *Hypocotyl*-, *Petiolus*- oder *Lamina*-Explantaten sind beschrieben. Zum größten Teil findet die Regeneration über somatische Embryogenese statt und nur vereinzelt über direkte Sprossbildung (Boase *et al.* 1998 und Referenzen). Die erste erfolgreiche Transformation beschrieb Pellegrineschi *et al.* (1994) mit der Regeneration transgener Pflanzen von Duftgeranien. Dabei wurden Petiolen mit verschiedenen *Agrobacterium rhizogenes* Wildtyp-Stämmen infiziert, die auf Medium ohne Selektionsmarker und Phytohormonzusatz Sprosse bildeten. Die DNA-Übertragung wurde durch den Nachweis von Agropine bzw. Mannopine und Southern Blot Hybridisierung belegt.

Hypocotyl-Explantate von *in vitro* angezogenen Keimlingen von *Pelargonium X zonale* bilden die Grundlage für das in dieser Arbeit verwendete Protokoll (siehe 2.5.4), das die erste erfolgreiche DNA-Übertragung mittels *Agrobacterium tumefaciens* darstellt (Robichon *et al.* 1995). *Lamina*-Explantate von *Pelargonium X hortorum* Dubonnet wurden von Boase *et al.* (1996) genutzt, um transgene Pflanzen durch Infektion mit *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 und Acetosyringon als "vir-Gen Inducer" zu regenerieren. Im Gegensatz zu der vorliegenden

Arbeit wurde von Boase *et al.* Kanamycin mit 50 mg/l während der Regeneration und 200 mg/l bei der Bewurzelung zur Selektion eingesetzt. Konzentrationen von bis zu 500 mg/l Kanamycin konnten bei den am Lehrstuhl verwendeten Sorten die Regeneration nicht vollständig verhindern, so daß Hygromycin als Selektionsmarker verwendet wurde. Für die Transformation einer bereits transgenen Pflanze (weiterer Selektionsmarker notwendig) besteht die Möglichkeit der Selektion mit geringen Kanamycinmengen während der Regeneration und höheren Kanamycinkonzentrationen bei der Bewurzelung (s.o.).

Wie Boase *et al.* verwendeten auch KrishnaRaj *et al.* (1997) den Stamm LBA 4404 und Kanamycin als Selektionsmarker zur Regeneration von transgenen Pflanzen, die über somatische Embryogenese von mit *A. tumefaciens* infizierten Blattstielen von Duftgeranien (*Pelargonium* sp. "Frensham") hergestellt wurden.

Die Transformation des cecropin B Gens aus *Hyalophora cecropioia* zur Erzeugung einer Resistenz gegen *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* beschreibt den ersten konkreten Ansatz zur Übertragung von wirtschaftlich interessanten Genen (Renou *et al.* 1998). Eine ähnliche Strategie verfolgen Berthome *et al.* (1998) mit der Übertragung verschiedener Gene zur Erlangung einer Resistenz gegen Viruserkrankungen (vor allem aus der Familie der *Tombusviridae*). Das aus Mais isolierte Regulatorgen *Leaf colour* (*Lc*) bewirkt im Gegensatz zu *Petunia hybrida* bei der Expression in *Pelargonium* keine phänotypischen Veränderungen, d. h. um eine verstärkte Expression der Flavonoidgene zu erreichen, ist die Übertragung von weiteren regulatorischen Sequenzen notwendig (Bradley *et al.* 1999). Dieser Ansatz stellt den ersten Versuch zur Manipulation der Flavonoidbiosynthese bzw. der Blütenfarbe bei *Pelargonium* mit molekularbiologischen Methoden dar. In dieser Hinsicht ist besonders die Kreation von natürlicherweise bei *Pelargonium* nicht vorkommender Farben wie blau und gelb interessant. Biochemische Untersuchungen ergaben, daß rote und violette Blütenfärbungen durch ein Gemisch von mehreren Anthocyanen hervorgerufen werden, und daß keine reinen Pelargonidin-, Cyanidin-, oder Delphinidintypen auftreten (Hassenpflug 1995). Cremefarbende Sorten wie "Botham's Surprise", "Thompson Morgan" oder *P. aridum* "R. D. Dyer" sind aufgrund von Flavonol-Glycosiden wie Quercetin 7-O-Glucosid ("Botham's Surprise", "Thompson Morgan") oder Carotinoiden (*P. aridum* "R. D. Dyer") leicht gelb gefärbt (Mitchell *et al.* 1997). Gentechnische Modifikationen in Richtung Gelbfärbung betreffen daher vor allem die Carotinoid-Synthese und die Erhöhung des Gehaltes von Flavonol-Glykosiden in den Blüten. Erste Ansätze zur Klonierung der Flavonolsynthese (FLS) aus *Pelargonium* wurden am Lehrstuhl bereits unternommen. Weitaus schwieriger gestaltet sich die Erzeugung blau blühender Pflanzen, da zwar durch

Copigmentierung eine Farbverstärkung erreicht werden kann, Delphinidin aber auch bei violetten Typen höchstens 50 % der Anthocyane ausmacht. Der pH-Wert hat nur einen begrenzten Einfluß auf die Farbgebung bestimmter Sorten, wie unterschiedliche pH-Werte bei fast gleicher Färbung zeigen (Mitchell *et al.* 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde das von Robichon *et al.* (1995) entwickelte Protokoll (siehe 2.5.4) zur Transformation von Hypocotylexplantaten am Lehrstuhles etabliert. Die erfolgreiche Fremdgenübertragung wurde durch GUS-Färbung von Blatlexplantaten von mit Hygromycin als Selektionsmarker regenerierter Sprosse nachgewiesen. Da sich die Sorte "Pulsar Salmon", die als Modellobjekt verwendet wurde, mit dieser Methode transformieren läßt, ist davon auszugehen, daß sich durch Anpassung der Regenerations- bzw. Transformationsbedingungen weitere Sorten der Pulsar-Serie transformieren lassen. Die weiter oben erwähnten Probleme mit der chromosomalen Kanamycin-Resistenz des *A. tumefaciens* Stammes EHA101 wurden durch die Verwendung des Stammes EHA105 behoben, da dieser bei gleichem genetischen Hintergrund (Chromosomal und Ti-Plasmid) keine Kanamycin-Resistenz mehr besitzt. Eine Alternative wäre die Verwendung von Binär-Vektoren, die andere Resistenzmarker zur Selektion in *Agrobacterium* nutzen, wie z. B. die pGA-Serie (Resistenzmarker Tetracycline) oder die pPCV-Serie (Resistenzmarker Ampicillin). Dabei ist allerdings das Vorhandensein der Hygromycin-Resistenz für die Transformation von *Pelargonium* Hypocotyl-Explantaten in der T-DNA unerläßlich. Die in die XbaI - SacI Site von pGPTV-HPT (Selektionsmarker Hygromycin) ligierte Promotor-Terminator-Kassette (siehe 3.2.) ermöglicht die Klonierung der jeweils zu übertragenden Gene. Damit steht ein *A. tumefaciens* Stamm-Vektorsystem zur Verfügung, das auf Basis der Hygromycin-Resistenz zur Transformation von *Pelargonium* verwendet werden kann. Dieses System kann in Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen am Lehrstuhl (Untersuchung der Flavonoidbiosynthese bei *Pelargonium*) und der Kooperation mit interessierten Gartenbaubetrieben zur wirtschaftlichen Anwendung von Gentechnik im Zierpflanzenbau genutzt werden.

4.4 Verwendete Konstrukte

Die unter 3.1.1 beschriebenen Konstrukte stellen unterschiedliche Ansätze zur gentechnischen Manipulation des Phänotyps verschiedener Zierpflanzen dar. Hauptsächlich werden dabei Gene der Flavonoidbiosynthese (siehe Abb. 4) verwendet, deren Einfluß auf die Blütenfarbe ausgenutzt werden soll. Daneben werden Strategien verfolgt, die eine

Veränderung des Habitus betreffen oder bei der Erzeugung einer pflanzeigenen Resistenz eine Rolle spielen. Ein weiterer Punkt ist die Expression der am Lehrstuhl klonierten Gene in einem pflanzlichen Testsystem, um deren Funktion *in vivo* nachweisen zu können.

4.4.1 Flavonsynthase II (FNS II)

Die am Lehrstuhl aus *Gerbera hybrida* klonierte Flavonsynthase II (Martens, 2000) wurde in pBI121 subkloniert und zur Transformation von *Petunia hybrida*, *A. thaliana* und *Osteospermum* verwendet. Einerseits soll die Funktion im pflanzlichen System und andererseits die Auswirkung der natürlicherweise in der betreffenden Pflanze nicht vorkommenden Flavone auf den Phänotyp betrachtet werden. Dabei geht es vor allem um den Einfluß der Flavone auf die Blütenfarbe. Ein Aspekt kann dabei die Konkurrenz um das Substrat sein, da Flavanone, insbesondere Naringenin; neben der FNS II auch noch von der Flavanon 3-Hydroxylase und der Flavonoid 3' bzw. 3', 5'-Hydroxylase umgesetzt werden können. Die funktionelle Expression der FNS II könnte daher den Anthocyangehalt in der Blüte verringern und somit zu einer weniger tiefen Färbung führen.

Ein anderer Ansatz betrifft die durch Flavone unterstützte und zu einer Farbveränderung führende Kopigmentierung. Dieser farbverstärkende Effekt kann aber nur bei Pflanzen auftreten, die natürlicherweise keine Flavone enthalten, wie z.B. *Osteospermum*. Bei flavonhaltigen Pflanzen wäre die Hemmung des Enzyms durch Antisense-Inhibierung oder Kosuppression denkbar. Dieser Eingriff würde den Anthocyangehalt der Blüte beeinflussen und zu einer Farbverstärkung führen. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Antisense-Hemmung der Flavonolsynthase von *Nicotiana tabaccum* beobachtet, die durch dann fehlende Konkurrenz eine deutliche Erhöhung des Anthocyangehaltes in den Blüten bewirkte (Holton *et al.* 1993a).

Interessant wäre auch ein Vergleich der Funktion zwischen der FNS II und der kürzlich am Lehrstuhl (Martens, pers. Mitteilung) aus *Petroselinum crispum* isolierten Flavonsynthase I (FNS I), da beide Enzyme zwar die gleiche Reaktion katalysieren, aber zu verschiedenen Enzymklassen gehören. Eine erhebliche Erhöhung des Flavongehaltes in der Pflanze könnte durch die Übertragung beider Gene erreicht werden, deren Expression aufgrund von geringen Homologien nicht durch Silencing-Mechanismen der Pflanze beeinträchtigt werden dürfte.

Ein erhöhter Flavongehalt hätte positive Effekte auf die bei der Stickstofffixierung vorkommende Symbiose zwischen Wirtspflanze und Rhizobien, da die besonders von den Leguminosen abgegebenen Flavonoide einen positiven Einfluß auf die Symbiose haben.

Denkbar ist ein ähnlicher Mechanismus wie bei der chemotaktischen Erkennung verwundeter Pflanzenteile durch *Agrobacterium*, die zum Teil auch auf Flavonoide zurückgeht.

Die Erhöhung des Flavonoidgehaltes in den für die Nahrungsmittelproduktion wichtigen Kulturpflanzen durch gentechnische Methoden wäre ein möglicher Ansatz, da der positive Einfluß von Flavonoiden auf die Gesundheit des Menschen hinreichend untersucht und bekannt ist. Zu berücksichtigen ist dabei auf jeden Fall die momentan sehr kritische öffentliche Meinung gegenüber der Gentechnik allgemein und gegenüber gentechnisch veränderten Lebensmittel im Besonderen.

4.4.2 Das *rolC* Gen

Verschiedene aus *Agrobacterium rhizogenes* isolierte Gene führten bei Expression in transgenen Pflanzen zu Veränderungen im Phänotyp, wie z.B. reduzierte Apikaldominanz, faltige Blätter, verkürzte Internodien oder veränderte Blütengröße. Die für diesen Effekt verantwortlichen *rol* Gene (root loci) wurden in A, B, C und D unterschieden und durch funktionelle Expression in verschiedenen Pflanzen genauer charakterisiert (Michael und Spena 1995). Durch die Transformation von Kombinationen aus *rolA*, B und C konnte beispielsweise bei *Rosa hybrida* (Salm *et al.* 1996), *Eustoma grandiflorum* (Kiyokawa *et al.* 1996) und *Begonia tuberhybrida* (Kiyokawa *et al.* 1996) die Apikaldominanz gebrochen und die Pflanzenhöhe reduziert werden. Einen großen Einfluß besitzt dabei *rolC*, das Cytokinin β -Glucoside hydrolysiert und somit den Cytokiningehalt im pflanzlichen Gewebe anhebt (Estruch *et al.* 1991). Da eine verringerte Pflanzengröße bei der Züchtung von Kulturpflanzen eine Rolle spielt, stellt die Expression von *rolC* in der jeweiligen Pflanze eine interessante Möglichkeit dar, diesen Effekt ohne die Nachteile der konventionellen Züchtung zu erreichen. In *Osteospermum ecklonis* führte die Expression von *rolC* zu kompakterem Wachstum, verlängerter Haltbarkeit als Topfpflanze, früherem Blütenansatz und einer deutlich erhöhten Anzahl von Blüten pro Pflanze, wobei die Blütengröße allerdings um ca. 25 % gegenüber dem Wildtyp abnahm (Giovanni *et al.* 1999). Ähnliche Ergebnisse fanden Winefield *et al.* (1999) bei der Expression von *rolC* in transgenen Petunien. Auch hier zeigte sich ein kompakterer Habitus mit reduzierter Sproßlänge bei gleichzeitiger Verdreifachung der Sproßzahl pro Pflanze. Während die transgenen Pflanzen 10-12 Tage vor der Kontrolle blühten und auch die Blütengröße reduziert war, konnte im Gegensatz zu *O. ecklonis* keine Erhöhung der Blütenanzahl beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde die Petunien Linie RL01 mit einem 35S-Promotor-*rolC* Konstrukt (3.1.1) transformiert. Mittels PCR positiv

getestete Pflanzen bezüglich der übertragenen T-DNA stehen für weitere Untersuchungen (Southern-Blot, phänotypische Vergleiche) zur Verfügung.

4.4.3 Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) in Antisense

Die Flavanon 3-Hydroxylase katalysiert die Reaktion von Flavanonen zu Dihydroflavonolen und stellt somit einen der notwendigen Schritte bei der Anthocyan synthese bzw. bei der Synthese von Blütenfarbstoffen dar. Der funktionelle Einfluß der FHT auf die Blütenfarbe ist bei den Petunien FHT-Mutanten W37 und W39 deutlich zu sehen, da sie keine Anthocyane bilden und weiße Blüten besitzen (Stotz 1983). Die Hemmung der FHT würde somit zu einer Verringerung des Anthocyan-Gehaltes und damit zu einer Farbabschwächung bzw. zu einem Verschwinden der Blütenfärbung führen. Prohexadione-Ca, ein Strukturanalogon von 2-Oxoglutarat, inhibiert die 2-oxoglutaratabhängige FHT-Reaktion auf Enzymebene, was die beschriebenen Auswirkungen auf die Blütenfarbe bewirkt. Die fehlende FHT-Aktivität führt in der Pflanze zur Anreicherung von Flavanonen (siehe 3.4.2), die entweder von anderen Enzymen (z.B. FNS) als Substrat verwendet werden können oder akkumuliert werden. Ein möglicher Seitenweg ist die Synthese von Flavan 4-olen, die durch die enzymatische Aktivität der Flavanon 4-Reduktase (FNR) gebildet werden und als Vorstufe für die Synthese von 3-Desoxy-flavonoiden von Bedeutung sind. Diese ungewöhnliche Flavonoidstoffklasse spielt wahrscheinlich bei der durch Prohexadione-Ca induzierten Resistenz gegen *Erwinia amylovora* und *Venturia inaequalis* eine wichtige Rolle. Um die FHT-Aktivität mit gentechnischen Methoden zu hemmen, wurden Antisense-Konstrukte der *Malus*-FHT und der *Callistephus*-FHT erstellt, die in Petunien transformiert und hinsichtlich ihrer Funktion untersucht wurden. Die Ergebnisse der heterologen Antisense-Hemmung mit der *Callistephus*-FHT zeigen die erwarteten Ergebnisse. Allerdings wurden diese bei *in vitro* Pflanzen erzielt und müssen an Gewächshausmaterial bestätigt werden. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß das Konstrukt keinen Terminator enthält, was sicherlich einen Einfluß auf die Transkription hat, aber noch nicht näher untersucht wurde. Diese Ergebnisse müssen durch enzymatische Untersuchungen der mit dem *Malus*-antisense Konstrukt transformierten Pflanzen noch bestätigt werden. Denkbar wäre dann die Erzeugung einer Resistenz gegen Feuerbrand und Apfelschorf bei *Malus* und *Pyrus* durch die FHT-Hemmung mittels homologem Antisense-Ansatz. Transformationsprotokolle für verschiedene Apfel- und Birnensorten sind beschrieben (Hanke *et al.* 2000, Yao *et al.* 1995, Sriskandarajah *et al.* 1994, Lebedev und Dolgov 2000), die entweder an die untersuchten Sorten angepaßt werden

müßten oder bei denen ein eventueller Effekt der FHT-Hemmung untersucht werden müßte. Die wirtschaftliche Verwendung der auf diesem Weg hergestellten resistenten Pflanzen dürfte aber im Moment aufgrund der negativen öffentlichen Meinung gegenüber gentechnisch veränderten Nahrungsmitteln sehr schwierig sein.

4.4.4 Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR)

Die für die Petunien Linie RL01 verwendete Transformationsmethode wurde anhand der Expression der DFR aus *Gerbera hybrida* überprüft. Wie bereits bei Elomaa (1996) beschrieben, verwendet das aktive Enzym Dihydrokämpferol als Substrat und führt dann anschließend zur Synthese von Pelargonidin, wodurch die vorher kaum gefärbten Blüten eine orange-rote Farbe erhalten (siehe 3.4.3). Voraussetzung für diesen Ansatz sind Pflanzen, die eine substratspezifische DFR oder eine nicht funktionelle DFR enthalten, wie z.B. die Petunien Linie W80 (Huits *et al.* 1999), die schon erwähnte Linie RL01 (Forkmann und Ruhnau 1987) oder *Cymbidium hybrida* (Johnson *et al.* 1999).

Die Linie RL01 wurde ebenfalls mit der von T. Fischer klonierten DFR aus *Malus domestica* und *Pyrus communis* (siehe 3.1.1) transformiert. Enzymtests mit dem jeweiligem Enzym hatten gezeigt, daß sowohl Dihydrokämpferol (DHK) als auch Dihydroquercetin (DHQ) als Substrat angenommen werden und zu dem entsprechenden Leucoanthocyanidin umgesetzt werden (T. Fischer, pers. Mitteilung). Daher ist davon auszugehen, daß in den transgenen RL01 Pflanzen das akkumulierte DHK zu Leucopelargonidin umgesetzt wird, und es anschließend zur Bildung von Pelargonidin und orange-rot gefärbten Blüten kommt. Interessant ist dabei, ob Unterschiede bei der Expression und Funktion im Vergleich zu den mit dem A1-Gen und der Gerbera-DFR transformierten Pflanzen zu beobachten sind. Neben dem bereits von Linn (1990) beschriebenen Effekt der Promotormethylierung und damit Inaktivierung des Gens bei Pflanzen mit mehreren ins Genom integrierten Kopien des übertragenden Konstruktes, spielen auch Positionseffekte eine Rolle. Beispielsweise führte die Integration in einem "uniquen" Bereich des Genoms zu einer stabilen Expression des A1-Gens in Petunien, während die Integration in einen Bereich mit einem hohem Anteil an repetitiver DNA zu einer weitaus geringeren Expression führt (Linn, 1990). Denkbar ist auch ein Einfluß des GC-Gehaltes, der bei dem nur schwach exprimierten A1-Gen bei 60 % liegt, während Apfel und Birne mit jeweils 49 % einen vergleichbaren Abstand zur Petunien-DFR (44 %) wie die Gerbera-DFR zeigen (39 %), und daher eine ähnliche Blütenfärbung zu erwarten ist.

Durch Vergleich der funktionellen Expression von DFR-Genen verschiedener Pflanzen in der Linie RL01 könnten Aussagen über den Verwandtschaftsgrad der jeweiligen Pflanzen untereinander und zu Petunien getroffen werden. Die deutlichen Unterschiede bei dem A1-Gen aus *Zea mays* (Monokotyle) und der Gerbera-DFR (Dikotyle) können diesbezüglich als erster Hinweis gewertet werden. Interessant wäre dabei der Vergleich der kürzlich von C. Seitz isolierten DFR aus *Osteospermum* mit der Gerbera-DFR, da beide Pflanzen zu den Asteraceae gehören, aber verschiedene Anthocyanmuster aufweisen. Wichtig ist dabei die Verwendung der selben Petunien-Linie, da die Expression der DFR aus *Rosa hybrida* in *petunia* cv. Surfinia Purple (starke F3'H und F3'5'H-Aktivität) keine Änderung der Blütenfarbe bewirkt, womit deutlich wird, daß Fremd-DNA nur sehr bedingt mit den endogenen Konstrukten konkurrieren kann (Tanaka *et al.* 1998).

Innerhalb der Dicotyledoneae besteht eventuell die Möglichkeit über die Enzymaktivität phylogenetische Daten zu erhalten, die eine deutlichere Einordnung in Klassen und Ordnungen erlaubt, wobei die Apfel- und Birnen-DFR aufgrund der Homologie von 99 % nicht voneinander getrennt zu betrachten ist. Einen ersten Hinweis könnte die Expression der Apfel-DFR in der Linie RL01 ergeben, die aufgrund der größeren phylogenetischen Distanz (im Vergleich von Gerbera zu Petunie) eine weniger tiefe Färbung zeigen sollte.

4.4.5 Chalkonreduktase (CHR oder PKR)

Da die Chalkonsynthase (CHS) als Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese angesehen werden kann, wurden Versuche mittels Kosuppression und Antisense-Hemmung zur Manipulation der Aktivität durchgeführt, die einerseits zu einer deutlichen Veränderung der Blütenfarbe führten und andererseits zeigten, daß unterschiedliche Mechanismen den Hemmungsarten zugrunde liegen (Que *et al.* 1998 und zitierte Referenzen). Eine andere Möglichkeit zur Reduzierung des 5'-Hydroxyflavonoid-Gehaltes besteht in der Schaffung von Substratkonkurrenz durch funktionelle Expression entsprechender Gene. Geeignet wären z.B. die Chalkonreduktase (CHR), die in Verbindung mit der CHS die Bildung von 6'-Deoxychalconen katalysiert (Welle und Griesebach 1988), Stilbensynthasen, die zur Bildung von Stilbenen wie Resveratrol oder Pinosylvin führen (Schröder und Schröder 1990) oder Mitglieder der CHS-Superfamilie wie die 2-Pyrone Synthase (Eckermann *et al.* 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die CHR aus *Glycine max* in den Binärvektor pBI121 subkloniert (siehe 3.1.1) und per *Agrobacterium* in die Petunien Linie RL01 transformiert. Außerdem wurde ein für die Transformation von *Pelargonium* geeignetes Konstrukt auf Basis

des Vektors pGPTV-HPT erstellt (siehe 3.2). In Verbindung mit der CHS führt die CHR zur Bildung der 6'-Deoxychalcone, die relativ selten sind und von Chalkonisomerasen (CHI) aus Pflanzen, die natürlicherweise keine 6'-Deoxychalcone besitzen, nicht als Substrat akzeptiert werden können (Dixon *et al.* 1988). Daher kommt es in diesem Fall zu einer Akkumulierung von 6'-Deoxychalconen, die bei *Petunia hybrida* enzymatisch zu seltenen 6'-Deoxychalcon-Derivaten umgesetzt werden. Diese Umleitung der Biosynthese führt zu einer Verringerung des Gehaltes an 5-Hydroxy Flavonoiden um bis zu 60 % (Davies *et al.* 1998). Interessant an diesem Ansatz ist die von Chalconen hervorgerufene Gelbfärbung der Blüten verschiedener Pflanzen. Bei *Dianthus caryophyllus* (Forkmann und Danglmayr 1980) und *Callistephus chinensis* (Kuhn *et al.* 1978) resultiert diese vor allem durch eine nicht funktionelle CHI. Da Versuche zur Antisense- oder Sense-Hemmung der Chalkonisomerase bei *Petunia* und *Eustoma grandiflorum* nicht erfolgreich waren (van Blokland *et al.* 1993), stellt die durch Fremdgenexpression bewirkte Synthese von in der Pflanze stabilen Chalkon-Derivaten eine Möglichkeit zur Erzeugung von gelben Blütenfarben dar.

4.4.6 Flavonoid 3'- und 3'-5'-Hydroxylase

Die 3'-Hydroxylase aus *Matthiola incana* (3'-Lev), die 3',5'-Hydroxylase aus *Callistephus chinensis* (3'-5'-CC) und die 3',5'-Hydroxylase aus *Lycianthes rantonnetii* (3'-5'-Sol) wurden in den Binärvektor pBI121 subkloniert (siehe 3.1.1) und per *Agrobacterium* in die Petunien-Mutante RL01 transformiert. Diese für die Hydroxylierungen am B-Ring verantwortlichen Enzyme der Cytochrom P450-Klasse zeichnen sich durch die im Bereich der Flavonoidbiosynthese breiteste Substratazeptanz aus, da neben den Flavonen und Flavanonen auch die an der 3-Position hydroxylierten Flavonole und Dihydroflavonole umgesetzt werden können (Kaltenbach *et al.* 1999). Bei funktioneller Expression der übertragenen Gene in der Linie RL01 ist die Synthese von Cyanidin und Delphinidin zu erwarten, da die DFR eine Substratspezifität besitzt und daher die Zwischenprodukte der Cyanidin- und Delphinidinsynthese bilden kann, während Pelargonidin nicht synthetisiert werden kann. Aufgrund der Mutationen in den Loci *ht1* und *ht2* (F3'H) bzw. *hf1* und *hf2* (F3'5'H) werden in der Linie RL 01 nur Spuren von Delphinidin und Cyanidin gebildet (Oud *et al.* 1995). Daher ist diese Linie zur Überprüfung der übertragenen Gene anhand von phänotypischen Veränderungen geeignet. Erstmals wurde die Isolierung der F3',5'H von Holton *et al.* (1993a) und die Isolierung der F3'H von Brugliera *et al.* (1999) aus *Petunia hybrida* veröffentlicht. Die funktionelle Überprüfung fand jeweils durch Expression der Gene

in der Linie Skr4 x Sw63 statt, die in den Loci *ht1/ht2* und *hf1/hf2* eine Mutation besitzen. Gene, die für die F3',5'H codieren, wurden auch aus *Catharanthus roseus* (Kaltenbach *et al.* 1999) *Solanum melongena*, *Gentiana triflora* und *Eustoma grandiflorum* isoliert und zum Teil in Pflanzen exprimiert (Shimada *et al.* 1999 und Ref.). Die F3'H wurden unter anderen aus *Pelargonium*, *Matthiola incana* (C. Eder, 2000) und *A. thaliana* (Schoenbohm *et al.* 2000) isoliert. Da die Hydroxylierungen am B-Ring maßgeblich für die Anthocyan-bedingte Blütenfärbung verantwortlich sind, wurde die F3',5'H für kommerzielle Zwecke verwendet, um eine blaue Blütenfärbung bei Pflanzen zu erzeugen, die diese Farbe natürlicherweise nicht besitzen. Erfolgreich war die Erstellung blauer Nelken durch die australische Firma Florigene, die 1996 die Sorte "Moondust" und 1998 die Sorte "Moonshadow" auf den australischen Markt brachte. Trotz der erfolgten Zulassung für den europäischen Markt 1998 wurde die Pflanze nur sehr begrenzt vermarktet, was vermutlich mit der in Europa verbreiteten Anti-Gentechnik Stimmung verbunden ist. Interessanter sind blaue Rosen, mit denen in Asien, besonders in Japan mythische Vorstellungen verbunden werden und die daher ein wirtschaftliches Potential besitzen.

4.5 Weitere Faktoren zur Manipulation der Blütenfarbe

Neben den beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit verfolgten Strategien zur Manipulation der Blütenfarbe sind weitere Ansätze denkbar und zum Teil durchgeführt, die sich auf die Hemmung oder Überexpression von Struktur- bzw. Regulatorgenen der Flavonoidbiosynthese beziehen. Die Manipulation des vakuolischen pH-Wertes und des Transportmechanismus in die Vakuole stellt eine weitere Möglichkeit der Einflußnahme dar. Alternativ wird auch die durch Komplexbildung entstandene Blütenfärbung untersucht, die allerdings aufgrund ihrer Komplexität nur sehr schwer mit molekularbiologischen und gentechnischen Methoden auf andere Pflanzen übertragen werden kann.

4.5.1 Flavonolsynthase (FLS)

Obwohl Flavonole zumeist farblos sind (selten gelblich), spielen sie aufgrund mehrerer Faktoren bei der Blütenfärbung eine Rolle. Da die FLS bei der Flavonolsynthese mit der DFR in Substratkonkurrenz um die Vorstufe (Dihydroflavonole) steht, wirkt sich jede Veränderung der Enzymaktivität auf den Anthocyan Gehalt und damit auf die Farbtiefe aus. So führt beispielsweise die Antisense-Hemmung der FLS in Petunien und Tabak zur Erhöhung

des Anthocyangehaltes und damit zu einer tieferen Blütenfärbung (Holton *et al.* 1993b). Der gleiche Effekt wurde ebenfalls bei Petunie durch Co-Suppression mittels Ausprägung einer FLS in Sense-Orientierung erreicht (Tanaka *et al.* 1998).

In der die Blütenfarbe betreffenden Co-Pigmentierung haben Flavonole ebenfalls eine Bedeutung, da sie an der Komplexbildung mit Anthocyanen beteiligt sind, die oft eine Verschiebung des Farbspektrums in Richtung blau bewirken. Damit stehen sich in diesem Fall zwei Effekte gegenüber, die nicht generell, sondern von Fall zu Fall betrachtet werden müssen. Denkbar ist eine Überexpression, die auf der einen Seite zu einer verstärkten Komplexierung führen, auf der anderen Seite aber durch Substratkonkurrenz den Anthocyangehalt reduzieren könnte. Alternativ dazu würde die Reprimierung der FLS zwar die Erhöhung des Anthocyangehaltes bewirken, aber die farbverstärkende Co-Pigmentierung nicht unterstützen. Interessant für die Erzeugung gelber Blütenfarben ist die Überexpression der FLS in Verbindung mit der Synthese von stabilen Chalkonen, die nicht von der Chalkonisomerase umgesetzt werden können (siehe 4.4.4).

4.5.2 Glutathion S-Transferase (GST)

Die ubiquitär vorkommenden Glutathion S-Transferasen gehören zu den am weitest verbreiteten und divergentesten Enzymen im Pflanzenreich. So waren 1996 bereits 38 verschiedene GSTs identifiziert, die zum Teil nur in einem ca. 15 AS-Motiv übereinstimmen (Alfenito *et al.* 1998). Droog *et al.* (1995) teilte die Gene aufgrund konservierter Bereiche und der Intron/Exon Struktur in 3 Klassen ein. Die GSTs spielen aufgrund der katalysierten Bindung von Glutathion an eine große Vielfalt von Substraten (z.B. Herbiziden) und durch Transport und Lagerung des Konjugates in die Vakuole eine Rolle bei der Detoxifizierung. Da Anthocyane toxisch auf die Zelle wirken können, werden sie von der GST als Substrat erkannt, glutathionisiert und über eine Glutathion-Pumpe (GS-X Pumpe) in die Vakuole transportiert. Das aus *Zea mays* isolierte Gen *Bz2* entspricht einer Typ III GST und führt bei fehlender Funktion zu einer Akkumulierung von Anthocyanen im Cytoplasma, die durch Oxidation dann eine bräunliche Färbung bewirken (Mars *et al.* 1995). Das in der letzten Phase der Anthocyan synthese bei Petunien aktive Gen *An9* zeigt hohe Homologien zu Typ I GST Genen. Wie *Bz2* ist auch *An9* in der Lage, Gewebe von Mutanten zu komplementieren und die Akkumulierung der Anthocyane in der Vakuole zu bewirken. Sequenzanalysen zeigen Homologien am N-Terminus, die auf die Erkennungsstelle von Glutathion hinweisen. Die gleiche Funktion bei sehr unterschiedlicher Struktur wird durch die Aktivität von *An9* in Mais

und *Bz2* in Petunien unterstrichen. Die Überexpression von GSTs in transgenen Pflanzen könnte zur Erhöhung des Anthocyangehaltes in der Vakuole und damit zu einer Farbvertiefung führen.

4.5.3 pH-Wert

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Blütenfarbe, besonders auf Blaufärbungen, ist seit längerem bekannt, wobei eine Erhöhung des pH-Wertes mit einer deutlicheren Ausprägung der Farbe blau verbunden ist. So beträgt beispielsweise der vakuolische pH-Wert in blau gefärbten Bereichen der Blütenblätter 7,7 während in roten Knospen von *Commelina communis* nur ein Wert von 5,8 gemessen wurde (Yoshida *et al.* 1995). Daher ist davon auszugehen, daß zur Kreation blauer Farbtöne eine Erhöhung des pH-Wertes in der Vakuole nötig ist. In Petunien sind sieben Loci bekannt (*ph1-ph7*), die bei einer vorhandenen Mutation zu einer Farbverschiebung in Richtung blau führen, wobei die Zusammensetzung der Anthocyane nicht verändert wird. Da das bereits isolierte Regulatorgen *an1* und *ph6* Allele eines Locus sind, kann man davon ausgehen, daß die bekannten pH-Loci zum Teil für regulatorische Sequenzen codieren. Ein weiterer Hinweis dafür ist der Effekt von *an2* und *an11* (Regulatorsequenzen der Anthocyansynthese) auf den pH-Wert, der bei Mutationen in den entsprechenden Sequenzen auftritt (Mol *et al.* 1998). Ein Indiz für die Bedeutung, der den vakuolischen pH-Wert betreffenden Regulation bei Erzeugung alternativer Blütenfarben ist die erfolgte Patentierung eines solchen Verfahrens bei *Ipomoea* (Patent-Nr. WO 0112560). Diese Tatsache unterstreicht den wirtschaftlichen Wert von Zierpflanzen mit für die jeweilige Art neu kreierte Blütenfarben, die oft nur durch molekularbiologische und gentechnische Verfahren zu erreichen sind.

4.5.4 Regulatorische Sequenzen

Man kann davon ausgehen, daß die grundlegenden Strukturgene der Flavonoid- und Anthocyansynthese (Abb. 4) bei den Angiospermern sehr ähnlich sind. Da dies besonders bei der Anthocyansynthese der Fall ist, resultieren Unterschiede in Zusammensetzung und Gehalt der Anthocyane einerseits aus Mutationen im Strukturgen oder dessen Nichtvorhandensein im Genom. Andererseits haben regulatorische Sequenzen einen großen Einfluß, der aufgrund seiner Komplexität und der zum Teil noch nicht erfolgten Klonierung der beteiligten Gene erst ansatzweise bekannt ist. Interessant sind dabei die Unterschiede der sogenannte "frühen"

Gene (*pal*, *chs*, *chi*, *f3h*) zu den "späten" oder für die Anthocyansynthese zuständigen Gene (*dfr*, *ans*, *fgt*). So aktivieren z.B. die Gene *myb305* und *myb340* aus *Antirrhinum majus* die Promotoren von PAL, CHI und FHT, während CHS, DFR und ANS nicht betroffen werden. Die CHS spielt eine besonders Rolle, da sie als Schlüsselenzym des Syntheseweges wahrscheinlich einer eigenen Regulation unterliegt. Der nicht nachweisbare Einfluß von Regulatoren der Anthocyansynthese wie *an2* oder *jaf13* auf die CHS kann auch damit begründet werden, daß die von der CHS katalysierte Reaktion als Ausgangspunkt für die Synthese von Nebenprodukten angesehen werden kann, die unabhängig von der Anthocyansynthese sind. Ein weiteres Indiz für die unterschiedliche Regulation ist der Effekt von *an1*, *an2* und *an11* auf die Transkription der "späten" Gene in Petunien, der bei "frühen" Genen nicht beobachtet wird. AN2 agiert dabei als Transkriptionsfaktor, der im Zusammenspiel mit AN1 und AN11 auf die Anthocyansynthese wirkt und starke funktionelle Ähnlichkeit zur *c1/pl1* Genfamilie aus Mais besitzt, die auch der MYB Regulatoren-Klasse angehört (Quattrocchio *et al.* 1999). Die Regulatorgene *jaf 13* aus *Petunia* und *delila* aus *A.majus* zeigen funktionell und auf Sequenzebene Homologien zur *r1/b1* Genfamilie aus Mais, die der bHLH (basic helix-loop-helix) Regulatorgenklasse angehören (Quattrocchio *et al.* 1998). *An1* besitzt dagegen keine Homologien zu R1 und JAF13, beschreibt eine neue Familie von bHLH-Proteinen und ist in der Lage, die Expression der DFR in *Petunia* zu aktivieren (Spelt *et al.* 2000).

Da die beschriebenen Regulatoren oft nur in Verbindung wirken und zumeist mehrere Gene betreffen, ist es schwierig, spezielle Farbvarianten durch gentechnische Methoden zu erzeugen. Bislang sind nur Ansätze bekannt, die zur Synthese von Anthocyanen führen, oder deren Gehalt in der Blüte erhöhen. Eine Alternative bietet das durch den Locus *difF* codierte Cytochrome *b₅*, das die Aktivität der F3',5'H erhöht und somit einen höheren Gehalt an Delphinidderivaten in der Blüte bewirkt (de Vetten *et al.* 1999). Interessant ist dabei, daß andere Cyp 450-Enzyme mit ähnlicher Funktion wie beispielsweise die F3'H von dieser Regulation nicht betroffen sind. Außerdem bietet die nur in den Blüten vorkommende Expression von *difF* die Möglichkeit, gezielte Veränderungen der Anthocyanzusammensetzung zu erzeugen. Daneben wäre die Isolation von blütenspezifischen Promotorsequenzen bei der gezielten Ausprägung von Merkmalen in der Blüte sehr hilfreich.

4.6 Blütenarchitektur

Nach der Blütenfarbe stellt die Blütenstruktur den zweitwichtigsten Faktor bei der phänotypischen Beurteilung von Blüten dar. Während Vorkommen von Kelch- und Kronblättern und deren Anordnung zueinander wichtig sind, spielen Staub- und Fruchtblätter bezüglich des Phänotypes zumeist nur eine untergeordnete Rolle. Die nähere Untersuchung der Blütenentwicklung zeigte den Einfluß von MADS-Box-Faktoren, deren Rolle bei der Steuerung wichtiger Prozesse auch in Hefe und bei Tieren bekannt ist. Für die Regulation der Blütenentwicklung wurde das auf Untersuchungen an den Modellorganismen *A. thaliana* und *A. majus* basierende ABC-Modell vorgeschlagen. Dabei ist die Funktion von A für die Ausprägung von Kelchblättern und die Funktion von C für die Ausbildung von Fruchtblättern zuständig. Das Zusammenwirken von A und B führt zur Entwicklung von Kronblättern während B und C die Bildung von Staubblättern bewirken. Mutationen jeweils eines Faktors bilden durch das Fehlen von je 2 Blütenorganen eine abnorme Blütenstruktur. Die Identifizierung weiterer Gene (Im MADS-Box-Gene) revidiert das ABC-Modell und zeigt eine komplexere Steuerung der Blütenentwicklung (Gutierrez-Cortines und Davies 2000). Die Kenntnis der genauen Abläufe ermöglicht dann vielleicht durch gezielte gentechnische Eingriffe die Modifikation der Blütenstruktur und damit die Erzeugung neuer Phänotypen. Hilfreich sind dabei Erkenntnisse, die die Umwandlung von Blütenblättern in Laubblätter (Bowman *et al.* 1991) und, hier relevanter, von Laubblättern in Blütenblättern erklären (Pelaz *et al.* 2001).

5. Zusammenfassung

Da die Gentechnik und die Molekularbiologie für die moderne Pflanzenzüchtung in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen haben, besteht auch für die Züchtung von gartenbaulichen Nutzpflanzen ein Interesse am Einsatz dieser Methoden. Die erfolgreiche Veränderung der Blütenfarbe bei *Petunia hybrida* (Meyer *et al.* 1987) stellt den Anfang der Transformation von Zierpflanzen mit einem konkreten und wirtschaftlich relevanten Ziel dar. Die Ergebnisse dienen nicht nur der Grundlagenwissenschaft, sondern können auch von Gartenbaubetrieben für die wirtschaftliche Nutzung verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die grundlegenden Methoden und Techniken zur Transformation von verschiedenen Pflanzen (vor allem Zierpflanzen) am Lehrstuhl eingeführt. Als Transformationsmethoden wurden dabei das *Agrobacterium tumefaciens*-System, die Partikel-Kanone und die "floral dip" Methode eingesetzt. Ein Verfahren zur Klonierung von Binärvektoren und deren Übertragung in *A. tumefaciens* wurde etabliert, mit dessen Hilfe eine Reihe von am Lehrstuhl klonierten Genen in verschiedene Pflanzen übertragen wurde. Neben dem häufig zur Selektion verwendeten Kanamycin-NPTII System, wurde ein Binärvektor mit einer auf Hygromycin basierenden Selektion kloniert. Dieser Vektor kann für nicht auf Kanamycin selektierbare Pflanzen (z.B. *Pelargonium*) oder für die Zweittransformation einer bereits mit einem anderen Selektionsmarker transformierten Pflanze verwendet werden. Die erfolgreiche Hygromycin-Selektion bei *Pelargonium* wurde anhand der GUS-Expression nachgewiesen.

Mit einer modifizierten Form der "leaf disc"-Transformation wurden *Petunia*, *Osteospermum* und *Pelargonium* transformiert. Die "floral-dip"-Methode wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* verwendet. Auf Selektionsmedium regenerierte Pflanzen wurden mittels PCR auf Integration der T-DNA überprüft und *in vitro* vermehrt. Die mit einem FHT Antisense-Konstrukt transformierten *Petunia*-Pflanzen zeigten im Enzymtest eine deutlich reduzierte Enzymaktivität, so daß von einer erfolgreichen Hemmung der FHT durch den Antisense-Ansatz auszugehen ist.

Die Petalen einer genetisch definierten, weißblühenden Linie von *Matthiola incana* wurden als Testsystem für die transiente Genexpression (Anthocyanbildung) in Blütenblättern mittels Partikel-Kanone eingeführt. Mit der gleichen Methode und einem ANS-Konstrukt beschossene Petalen von *Zantedeschia* zeigten ein deutlich rote Färbung im Bereich der aufgetroffenen Partikel. Es ist davon auszugehen, daß durch die Gen-Expression der vermutete Block in der Anthocyan-Synthese behoben wird und es zur Bildung von Pelargonidin-Derivaten kommt.

5.1 Summary

Molecular biology and genetic engineering have become increasingly important for modern plant breeding during the last years. This is why these methods are also very interesting for the breeding of ornamental plants. The successful transformation of the flower color of a *Petunia hybrida* mutant in 1987 (Meyer *et al.*) initiated the manipulation of ornamental plants for specifically economic reasons. The results are not only important for basic research but are also economically viable for ornamental breeders.

This study introduces the basic methods and techniques for the transformation of all kinds of plants (above all ornamental plants). The *Agrobacterium tumefaciens*-system, the particle gun and the "floral dip"-technique were the methods used to transform plants. At our department we established a method to clone binary vectors and to transform them into *A. tumefaciens*. The so-established *A. tumefaciens* helped us to transform genes, that we had cloned in our department, into different kinds of plants. Besides the Kanamycin-NPT II system, which is often used for selection, a binary vector was cloned with a selection based on hygromycin. This vector can be used for plants (e.g. pelargonium) that are selectable but cannot be selected on the basis of kanamycin or for the second transformation of plants already transformed with another selection marker. Successful gene delivery to pelargonium hypocotyls and expression of the foreign genes was demonstrated by histochemical GUS-staining.

A modified form of the "leaf disc" method was used to transform petunia, osteospermum and pelargonium. The 'floral-dip' method was applied to transform *Arabidopsis thaliana*. With the help of PCR-analysis, plants regenerated under selection conditions were surveyed to find out whether a T-DNA integration has taken place. These plants were then multiplied in vitro. Enzyme tests with petunia plants that had been transformed with a FHT antisense-construct showed a much reduced enzyme activity. This is why it is most likely that FHT is successfully stopped by the function of the antisense construct.

By means of a particle gun the petals of genetic defined white flowering mutant of *Matthiola incana* were introduced as a test-system for the foreign gene expression concerning anthocyan biosynthesis. Petals of zantedeschia bombarded through the same method with a ANS construct showed a clearly red colouring in the areas where the particles had hit. It is most likely that the possible block in the anthocyan synthesis is removed through the gene expression and that therefore perlargonidin derivatives are created.

6. Literaturverzeichnis

- Al-Atabee JS und Power JB** (1987) Plant regeneration from protoplasts of *Dimorphothecha* and *Rudbeckia*. Plant Cell Reports 6:414-416
- Al-Atabee JS und Power JB** (1990) Control of vitrification and *in vitro* flowering of plantlets regenerated from callus of *Dimorphothecha aurantica* (Compositae) Journal of Plant Physiology 136: 705-709
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V** (1998) Functional complementation of anthocyan sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-Transferases. Plant Cell 10: 1135-1149
- An G, Watson BD, Stachel S, Gordon MP Nester EW** (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. EMBO J 4: 277-288
- Arumuganthan K, and Earle ED** (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Rep. 9 (3), 208-218
- Bakke K und Gjerde H** (1998) Transformation of Poinsetta (*Euphorbia pulcherrima* Willd. & Klotzsch) MSc. Thesis, Agriculture University of Norway
- Banta LM, Bohne J, Lovejoy SD, Dostal K** (1998) Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. J. Bacteriol. 180, 6597-6606
- Barghchi M, Turgut K, Griffiths N, Draper J** (1991) Transformation of *Arabidopsis thaliana* by *A. tumefaciens*. In vitro Cell Bev. Biol. 27, 3.150
- Bartley GE, Scolnik PA** (1995) Plant carotenoids: Pigments for Photo-protection, visual attraction and human health. Plant Cell 7, 1027-1038
- Bechthold N, Ellis J, Pelletier G** (1993) *In planta* *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316, 1194-1199
- Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R** (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197
- Berthome R, Tepfer M, Hanteville S, Renou JP, Albouy J** (1998) Evaluation of strategies to obtain virus-resistant pelargonium plants. Symp. Eucarpia, 27-31 Juli, Angers
- Bevan M** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acid Res. 12, 8711-8721
- Boase MR, Bradley JM, Borst NK** (1998) An improved method for transformation of regal pelargonium (*Pelargonium X domesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science 139: 59-69

- Boase MR, Deroles SC, Winefield CS, Butcher SM, Borst NK, Butler RC** (1996) Genetic transformation of regal pelargonium (*Pelargonium X domesticum* "Dubonnet") by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 121:47-61
- Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A** (1998) Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften* 37, 147-163
- Bouzar H, Jones JB, Hodge NC** (1993) Differential characterisation of *Agrobacterium* species using carbon-source utilisation patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology* 83, 733-739
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM** (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1-20
- Bradley JM, Deroles SC, Boase MR, Bloor S, Swinny E, Davies KM** (1999) Variation in the ability of the maize *Lc* regulatory gene to upregulate flavonoid biosynthesis in heterologous systems. *Plant Science* 140:37-48
- Brandt**: *Transgene Pflanzen*, 1995, Birkhäuser Verlag, Basel
- Brouillard R und Dangles O** (1993) Flavonoids and flower colour. *The Flavonoids: Advances in Research since 1986* (harborne JB), London: Chapman & Hall, 565-587
- Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA, Mason JG** (1999) Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*. *Plant Journal* 19(4): 441-451
- Caboche M** (1990) Liposome-mediated transfer of nucleic acids in plant protoplasts. *Physiol. Plant* 79: 173-176
- Castelli WP, Doyle JT, Gordon T** (1977) Alcohol and blood lipids. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Lancet*: 153-55
- Chamberlain DA, Brettel RIS, Last DI, Wirtzenz B, McElroy D, Doferus R, Dennis ES** (1994) The use of the EMU promoter with antibiotic and herbicide resistance genes for the selection of transgenic wheat callus and rice plants. *Aust J Plant Physiol* 21: 95-112
- Cheng J; Bolyard MG, Saxena RC; Sticklen MB** (1992) Production of insect resistant potato by genetic transformation with a delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* *Plant Science* 81: 83-91
- Chowrira GM, Akella V, Lurquin PF** (1995) Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems *in planta*. *Molecular Biotechnology*, Vol 3:17-23
- Christou P, Platt SG, Ackerman MC** (1986) Opine synthesis in wild-type plant tissue. *Plant Physiol.* 82: 218-221

- Citrovsky V, Guralnick B, Simon MN, Wall JS** (1997) The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single stranded DNA complexes involved in nuclear import. J. Mol. Biol. 271, 718-727
- Citrovsky V, Warnick D, Zambryski PC** (1994) Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 and VirE2 proteins in maize and tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci USA 91, 3210-3214
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 16(6):735-743
- Cocking E C** (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187, 962-963
- Collen AMC, de Jong I, Jarl CI** (1997) Regeneration and transformation of the legume *Galgegae orientalis* L. (goat's rue) Lund Universität Schweden, pers. Mitteilung
- Dale EC, Ow DW** (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. Proc. Natl. Acad. Sci. 23: 10558-10562
- Davies KM, Bloor SJ, Spiller GB, Deroles SC** (1998) Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*. Plant Journal 13(2): 259-266
- De Cleene M, De Ley J** (1976) The host range of crown gall. Bot. Rev. 42(4): 389-466
- De Kathen A, Jacobsen HJ** (1995) Cell competence for *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in *Pisum sativum* L. Transgen. Res. 4, 184-191
- De la Pena A, Lörz H, Schell J** (1987) Transgenic rye plants obtained by injection DNA into young floral tillers. Nature 325: 274-276
- De Vetten, ter Horst J, van Schaik HP, de Boer A, Mol JNM, Koes R** (1999) A cytochrome b₅ is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colours. PNAS 96: 778-783
- Dekeyser R, Claes B, Marichal M, van Montagu M, Caplan A** (1989) Evaluation of selectable markers for rice transformation Plant Physiol 90: 217-223
- Deroles SC, Gardner RC** (1988a) Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Mol. Biol. 11: 355-364
- Deroles SC, Gardner RC** (1988b) Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Mol. Biol. 11:365-377
- Dillen W, Engler G, Van Montagu M, Angenon G** (1995) Electroporation-mediated DNA delivery to seedlings tissues of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). Plant Cell Reports 15:119-124

- Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helsinki DR** (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria-contruction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351
- Dixon RA, Blyden ER, Robbins MP, van Tunen AJ, Mol JN** (1988) Comparative biochemistry of chalcone isomerases. *Phytochemistry* 27: 2801-2808
- Dooner HK, Robbins TP, Jorgensen RA** (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review of Genetics* 25, 173-1991
- Douglas CJ, Halperin W, Nester EW** (1982) *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. *J. Bacteriol.* 152 1265-1275
- Droog FNJ, Hooykaas PJJ, Van der Zaal BJ** (1982) 2,4 Dichlororophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type III tobacco glutathione S-transferases. *Plant Physiology* 107: 1139-1146
- Dunbar KB, Stephens CT** (1989) Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium x domesticum*) from primary callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 13-21
- Eckermann S, Schröder G, Schmidt J, Strack D, Edrada RA, Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, Kilpeläinen I, Proksch P, Teeri TH, Schröder J** (1998) New pathways to polyketides in plants. *Nature* 396: 387-390
- Eder C** (2001) Klonierung und Charakterisierung der Flavonoid 3'-Hydroxylase und der Flavonoid 3',5'-Hydroxylase
- Elomaa P** (1996) Genetic Modification of flavonoid pathway in ornamental plants. Academic Dissertation, Institut of Biotechnology, University of Helsinki, Finland
- Elomaa P, Helarriutta Y, Griesbach RJ, Kotilainen M, Seppänen P, Teeri TH** (1995) Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Mol. Gen. Genet.* 248: 649-656
- Escudero J, Neuhaus G, Hohn B** (1995) Intracellular *Agrobacterium* can transfer DNA to the cell nucleus of the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 230-234
- Estruch JJ, Parets-Soler T, Schmüllung T, Spena A** (1991) Cytosolic localisation in transgenic plants of the *rolC* peptide from *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol. Biol.* 17: 547-550
- Fiedler S, Wirth R** (1988) Transformation of Bacteria with Plasmid-DNA by Electroporation. *Analytical Biochemistry* 170: 38-44
- Finer JJ, Vain P, Jones MW, McCullen M** (1993) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* 11, 323-328
- Forkmann G und Dangelmayr B** (1980) Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus*. *Biochem. Genet.* 18: 519-527

- Forkmann G und Heller W** (1999) Biosynthesis of Flavonoids. In: Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol.1 (U. Sankawa) 713-748, Elsevier, Amsterdam
- Forkmann G und Ruhnau B** (1987) Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. Z. Natirforschung 42c: 1146-1148
- Fraley RT, Rogers S, Horsch R, Flick J, Sanders PR, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CC, Fry JS, Gallupi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL** (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803-4807
- Gartland KMA, Davey MR** (1995) *Agrobacterium* Protokolls, Methods in Molecular Biology Vol.44, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Gautam VK, Mittal A, Nanda K, Gupta SC** (1983) *In vitro* regeneration of plantlets from somatic explants of *Matthiola incana*. Plant Science 29:25-32
- Giovanni A, Mascarello C, Allavena A** (1999) Effects of *rol* genes on flowering in *Osteospermum ecklonis*. Flowering Newsletter 28, 49-53
- Giovanni A, Zottini M, Morreale G, Spena A, Allavena A** (1999) Ornamental traits modification by *rol* genes in *Osteospermum ecklonis* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 35:70-75
- Godwin ID, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ** (1992) *In vitro* approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. Aust.J. Bot. 40, 751-763
- Goto T und Kondo T** (1991) Struktur und molekulare Stapelung von Anthocyanen - Variation der Blütenfarbe. Angew. Chem. 103, 17-33
- Green AES** (1983) The penetration of ultraviolet radiation to the ground. Physiologia Plantarum 58, 351-359
- Griesbach RJ** (1994) An improved method for transforming plants through electrophoresis. Plant Science 102:81-89
- Grimsley N, Hohn T, Davies JW, Hohn B** (1987) *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. Nature 325: 177-179
- Guralnick B, Thomsen G, Citrovsky V** (1996) Transport of DNA into the nuclei of *Xenopus* oocytes by a modified VirE2-Protein of *Agrobacterium* Plant Cell 8, 363-373
- Gutierrez-Cortines ME und Davies B** (2000) Beyond the ABCs: ternary complex formation in the control of floral organ identity. Trends in plant science 5(11): 471-476
- Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT** (1998) The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. Plant Mol. Biol. 37: 287-296
- Handa T, Sugimura T, Kato E, Kamanda H, Takaynagi K** (1994) Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* with *rol* genes. Acta Hort. 392: 209-218

- Hanke V, Norelli J, Aldwinkle HS, Hiller I, Klotzsche G, Winkler K, Egerer J, Richter K** (2000) Transformation in apple for increased disease resistance. *Acta Hort.* 538: 611-616
- Hansen G, Chilton MD** (1996) "Agrolistic" transformation of plant cells: Integration of T-Strands generated *in planta*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14978-14983
- Hansen G, Chilton MD** (1999) Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. in *Current Topics in Microbiology and Immunology Vol. 240 Plant Biotechnology: New Products and Applications*
- Hanson B, Engler D, Moy Y, Newman B, Ralston E, Gutterson N** (1999) A simple method to enrich *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant Journal* 19 (6) 727-734
- Hassenpflug R** (1995) Anthocyanbiosynthese bei *Pelargonium-Zonale-Hybriden*. Diplomarbeit, TU-München-Weihenstephan
- Hegi G** (1986) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band IV,1*, Hrsg: Schultze Motel W., 3. Auflage 1986, Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg, pp 121-123 und 159-164
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42(6): 819-832
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaa PJJ, Schilperoort RA** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180
- Höfte H, Whiteley HR** (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53 (2): 242-255
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M, Schell J** (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163:181-187
- Holt JS, Powles SB, Holtum AM** (1993) Mechanisms and agronomic aspect of herbicide resistance. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 203-229
- Holton TA, Brugliera F, Tanaka Y** (1993) Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant Journal* 4: 1003-1010
- Horn W** (1996) *Zierpflanzenbau* Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231
- Huits HSM, Gerats AGM, Kreike MM, Mol JNM, Koes RE** (1994) Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *Plant J.* 6: 295-310

- Hutchinson JF, Kaul V, Maheswaran G, Moran JR, Graham MW, Richards D** (1992) Genetic improvement of floricultural crops using biotechnology. *Aust. J. Bot.* 40:765-787
- Jefferson R A** (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405
- Jerzy M und Lubomski M** (1991) Adventitious shoot formation on ex vitro derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. *Scientia Hort.* 47:115-124
- Joersbo M, Brunstedt J** (1990) Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Reports* 9: 207-210
- Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petersen SG, Brunstedt J, Okkels FT** (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.* 4: 111-117
- Johnson ET, Yi H, Shin B, Oh BJ, Cheong H, Choi G** (1999) Cymbidium hybrida dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins. *Plant Journal* 19(1): 81-85
- Kaltenbach M, Schröder G, Schmelzer E, Lutz V, Schröder J** (1999) Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants. *Plant Journal* 19(2): 183-193
- Kiyokawa S, Kikuchi Y, Kamada H** (1996) Genetic transformation of *Begonia tuberhybrida* by *Ri rol* genes. *Plant Cell Rep.* 15: 606-609
- Klein, TM, Wolf, ED, Wu, R, Sanford, JC** (1987): High-velocity microprojectile for delivering nucleic acids into living cells *Nature* 327: 70-73
- Köhn C** (1994) Transformation von zwei Arten der *Brassicaceae* mittels *Agrobacterium tumefaciens*: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Ökotypen Ze0 und Tsu0) und *Matthiola incana* (L.) R.Br. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, FU Berlin
- Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, 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
- Koornneef M, Luiten W, de Vlaming P, Schramm AW** (1982) A gene controlling flavonoid-3'-hydroxylation in *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* 19, 113-115
- Koukol J und Conn EE** (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236: 2692
- KrishnaRaj S, Bi YM, Saxena PK** (1997) Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp. "Frensham"). *Planta* 281: 434-440

- Kuhn B, Forkmann G, Seyffert W** (1978) Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in *Callistephus chinensis*. *Planta* 138: 199-203
- Larkin PJ, Taylor BH, Gersmann M, Brettel RIS** (1990) Direct gene transfer to protoplasts (*Nicotiana tabaccum*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Medicago sativa*, *Triticum monococcum*) *AUS J Plant Physiol* 17: 291-302
- Lebedev VG and Dolgov SV** (2000) Effect of a selective agent and a plant intron on the effectiveness of transformation and expression of heterologous genes in the pear (*Pyrus communis* L.) *Genetika* 36 (6):792-798
- Leshem B und Sachs T** (1985) Vitrified *Dianthus teratomata in vitro* due to growth factor imbalance. *Ann. Bot.* 56: 613-617
- Leweke B und Forkmann G** (1982) Genetically controlled anthocyanin synthesis in cell cultures of *Matthiola incana*. *Plant Cell Reports* 1:98-100
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL** (1993) *Arabidopsis* Flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5, 171-179
- Linn F** (1990) Molekulargenetische Untersuchungen zur Variabilität in der Genexpression transgener Petunienpflanzen. Doktorarbeit, Universität Köln
- Lloyd AM, Barnason AR, Rogers SG, Byrne MC, Fraley RT Horsch RB** (1986) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*, *Science* 234:464-466
- Loake GJ, Ashby AM, Shaw CH** (1988) Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1427-1432
- Markham KR, Tanner GJ, Caasi-Lit M, Whitecross MI, Nayudi M, Mitchell KA** (1998) Possible protective role for 3',4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. *Phytochemistry* 49, 1913-1919
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V** (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375: 397-400
- Martens S** (2000) Genetische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Flavonbiosynthese bei *Gerbera* Hybriden. Dissertation, TU-München-Weihenstephan
- Matthysee AG, McMahan S** (1998) Root colonisation by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD* and *attR* mutants. *Environ. Microbiol.* 64, 2341-2345
- Matthysee AG, Yarnall HA, Young N** (1996) Requirement of genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens* *J. Bacteriol.* 178, 5302-5308

- Maximova SN, Dandekar AM, Gultinan MJ** (1998) Investigation of *Agrobacterium* mediated transformation of apple using green fluorescent protein: High transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Mol. Biol.* 37, 549-559
- McBride KE und Summerfelt KR** (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 14: 269-276
- Mensuali-Sodi A, Brea M, Panizza M, Serra G, Tognoni F** (1994) *In vitro* regeneration of shoots in *Matthiola incana* L. from seedlings explants of different age. *Gartenbauwissenschaft* 59(2): 77-80
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H** (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with maize gene. *Nature* 330, 677-678
- Michael T und Spena A** (1995) The plant oncogenes *rolA*, B and C from *Agrobacterium rhizogenes*. *Methods in Molecular Biology*, Vol.44: *Agrobacterium Protocols*, 207-222
- Mitchell KA, Markham KR, Boase MR** (1997) Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* flowers. *Phytochemistry* 47(3) 355-361
- Mol J, Grotewold E, Koes R** (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3(6):212-217
- Mozo T, Hooykaas PJJ** (1991) Factors affecting the rate of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Nicotiana glauca* plant cells. *Plant Mol. Biol.* 16 (6): 917-918
- Mysore KS, Kumar CTR, Gelvin SB** (2000) *Arabidopsis* ecotypes and mutants that are recalcitrant to *Agrobacterium* root transformation are susceptible to germ-line transformation. *Plant J.* 21, 9-16
- Mysore KS, Nam J, Gelvin SB** (2000) An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97, 948-953
- Nam J, Matthyse AG, Gelvin SB** (1997) Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell* 9. 317-333
- Napoli CA, Lemieux C, Jorgensen RA** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* 2: 279-289
- Neuhaus JM, Spangenberg G, Mittelsten-Scheid O, Schweiger HG** (1987) Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection. *Theor Appl Genetics* 75: 30-36
- Olsson LC, Veit M, Weissenböck G, Bornman JF** (1998) Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49, 1021-1028
- Ophel K, Kerr A** (1990) *J. Syst. Bacteriol.* 40, 236-241

- Orlikowska T und Nowak E** (1997) Factors affecting transformation of gerbera. *Acta Hort.* 447:619-621
- Oud JSN, Schneiders H, Krol AJ, Grinsven MQJM** (1995) Breeding of transgenic orange *Petunia hybrida* varieties. *Euphytica* 85: 403-409
- Pelaz S, Tapia-Lopez R, Alvarez-Buylla ER, Yanofsky MF** (2001) Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Current Biology* 11(3) 182-184
- Pellegrineschi A, Damon JP, Valtorta N, Paillard N, Tepfer D** (1994) Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Bio/Technology* 12:64-68
- Penningsfeld F, Forchthammer L** (1980) *Gerbera*, Eugen Ulmer, Stuttgart
- Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA** (1990) Insect resistant cotton plants. *Biotechnology* 8 (10): 938-943
- Pierik RLM, Jansen JLM, Maasdam A, Binnendijk CM** (1975) Optimalization of *Gerbera* plantlet production from excised capitulum explants. *Scientia Hort.* 3: 351-357
- Potrykus I** (1991) Gene Transfer to Plants: Assessment of published approaches and results. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 205-225
- Quattrocchio F, Wing JF, van der Woude K, Mol JNM, Koes R** (1998) Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant Journal* 13(4): 475-488
- Quattrocchio F, Wing JF, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol JNM, Koes R** (1999) Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower colour. *Plant Cell* 11: 1433-1444
- Que Q, Wang HY, Jorgensen RA** (1998) Distinct patterns of pigment suppression are produced by allelic sense and antisense chalcone synthase transgenes in *petunia* flowers. *Plant Journal* 13(3): 401-409
- Qureshi JA, Saxena PK** (1992) Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) varieties. *Plant Cell Reports* 11: 443-448
- Rabaglio M, Stancanelli G, Allavena A** (1995) Manipolazione *in vitro* Della Dimorfoteca (*Osteospermum* SPP.). *Italus Hortus* Vol.2, Nr.3:56-59
- Renaud S, de Lorgeril M** (1992) Vine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339: 1523–1526
- Renou JP, Mary I, Narcy JP, Hanteville S, Florack D, Diolez A** (1998) Evaluation of the protection against *Xanthomonas* in transgenic pelargoniums containing a chimaeric cecropin gene. *Symp. Eucarpia*, 27-31 Juli, Angers

- Reuhs BL, Kim JS, Matthysee AG** (1997) Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and Arabidopsis wound sites is correlated with the presence of cell-associated, acidic polysaccharide. *J.Bacteriol.* 179, 5372-5379
- Reuther** (1983) Propagation of disease-free *Pelargonium* cultivars by tissue culture. *Acta Horticulturae* 131, 311-318
- Reynoird JP** (1996) Controle de la regeneration a partir d'explants foliaires de *Gerbera*. These de doctorat de l'Univerite de Paris
- Ritala A, Aspegren K, Kurten U, Salmenkallio-Martilla M, Mannonen L, Hannus R, Kauppinen V, Teeri TH, Enari TM** (1994) Fertile transgenic barley to particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol Biol* 24(2): 317-325
- Robichon MP, Renou JP, Jalouzot** (1995) Genetic transformation of *Pelargonium X hortorum*. *Plant Cell Reports* 15: 63-67
- Robinson R** (1936) Formation of Anthocyanins in plants. *Nature* 137: 172
- Rossi L, Hohn B, Tinland B** (1993) The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plant. *Mol. Gen. Genet.* 239(3): 345-353
- Ruf J-C** Ist das French Paradox ein weltweites Paradoxon? Vortrag auf dem internationalen Weinsymposium, Frankfurt 1996
- Ryan KG, Markham KR, Bloor SJ, Dradley JM, Mitchell KA, Fordan BR** (1998) UVB radiation induced increase in quercetin:kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. *Photochem. Photobiol.* 68, 323-330
- Salm van der TPM, Hanisch ten Cate CH, Dons HJM** (1996) Prospects for applications of *rol* genes for crop improvement. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 207-228
- Sangwan RS, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan-Norreel B** (1992) Characterisation of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 188, 439-456
- Schneider J, Kaffarnik H, Steinmetz A** (1996) Alcohol, lipid metabolism and coronary heart disease. *Herz* 21: 217-26
- Schoenbohm C, Martens S, Eder C, Forkmann G, Weisshaar B** (2000) Identification of the *Arabidopsis thaliana* Flavonoid 3'-Hydroxylase Gene and Functional Expression of the Encoded P450 Enzyme. *Biol.Chem.* 381: 749-753
- Schröder J und Schröder G** (1990) Stilbene and Chalcone Synthases: Related Enzymes with key functions in plant-specific pathways. *Z.für Naturforschung* 45c:1-8
- Shibata D, Liu Yao-Guang** (2000) *Agrobacterium*-mediated plant transformation with large DNA fragments. *Trends Plant Sci.* 5 (8) 354-357

- Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM, Goodman HM** (1995) Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant Journal* 8 (5) 659-671
- Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Oknaka Y, Kiyokawa S, Kikuchi Y** (1999) Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3',5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plant. *FEBS Letters* 461(3): 241-245
- Siemens J und Sacristan MD** (1995) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Matthiola incana* (L.) R. Br. *Plant Cell Reports* 14:446-449
- Simonetti P, Brusamolino A, Pellegrini N, Viani P, Clemente G, Roggi C, Cestaro B** Evaluation of the effect of alcohol consumption on erythrocyte lipids and vitamins in a healthy population. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 517-22
- Smith EF, Townsend CO** (1907) *Science* 25, 671-673
- Smith RH, Hood EE** (1995) *Agrobacterium tumefaciens* Transformation of Monocotyledons *Crop Science* 35(2) 301-309
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JNM, Koes R** (2000) *Anthocyanin1* of *Petunia* encodes a basic Helix-Loop-Helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* 12: 1619-1931
- Sriskandarajah S, Goodwin PB, Speirs J** (1994) Genetic transformation of the apple scion cultivar "Delicious" via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 317-329
- Stachel SE, Messens E, van Montagu M, Zambryski P** (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318, 624-629
- Steinbiß HH** (1995) *Transgene Pflanzen, Reihe: Labor im Focus, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford*
- Stotz G** (1983) *Enzymologie und Genetik der Oxidationsreaktionen in der Flavonoid-Biosynthese höherer Pflanzen. Doktorarbeit, Universität Tübingen*
- Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T** (1998) Metabolic engineering to modify flower colour. *Plant Cell Physiology* 39(11): 119-1226
- Teusch M, Forkmann G, Seyffert W** (1986) Genetic control of UDP-glucose: anthocyanin 5-o-glucosyltransferase from flowers of *Matthiola incana*. *Planta* 168, 586-591
- Tinland B, Hohn B, Puchta H** (1994) *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 8000-8004

- Trick HN, Finer JJ** (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports* 17 (6/7): 482-488
- Tyrach A** (1994) Untersuchungen zur Genetik von Blütenpigmenten bei *Gerbera*. Dissertation, TU-München-Weihenstephan
- Vaira AM, Berio T, Acotto GP, Vecchiati M, Allavena A** (2000) Evaluation of resistance in *Osteospermum ecklonis* (DC.) Norl. plants transgenic for the *N* protein gene of tomato spotted wilt virus. *Plant Cell Reports* 19: 983-988
- Valvekens D, Van Montagu M, Van Lijsebettens M** (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explant using kanamycin selection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85:5536-5540
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK** (1992) Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology* 10: 667-674
- Villemont E, Dubois F, Sangwan RS, Vasseur G, Bourgeois Y** (1997) Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* 201, 160-172
- Villemont E, Dubois F, Sangwan RS, Vasseur G, Bourgeois Y, Sangwan-Norreel BS** (1997) Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: Evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* 201: 160-172
- Waldron C, Murphy EB, Boberts JL, Gustafson GD, Armour SL, Malcolm SK** (1985) Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation studies. *Plant Mol. Biol.* 5, 103-108
- Walters DA; Vetsch CS, Poots DE, Lundquist RC** (1992) Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol Biol* 18 (2): 189-200
- Welle R and Griesebach H** (1988) Isolation of a novel NADPH-dependent reductase which coacts with chalcone synthase in the biosynthesis of 6'-deoxychalcone. *FEBS-Letters* 236(1):221-225
- Winefield C, Lewis D, Arathoon S, Deroles S** (1999) Alteration of *Petunia* plant from through the introduction of the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Molecular Breeding* 5: 543-551
- Yao JL, Cohen D, Atkinson R, Richardson K, Morris B** (1995) Regeneration of transgenic plants from commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Reports* 14: 407-412
- Yoshida K, Kondo T, Okaki T, Katou K** (1995) Cause of blue petal colour. *Nature* 373, 291

Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemanns L, Van Montagu M, Schell J (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2. 2143-2150

Zambryski P (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-Plant cell DNA transfer story *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 465-490

Zuker A, Ahroni A, Tzfira T, Ovadis M, Itzhaki H, Scovel G, Shklarman E, Ben-Meier H, Vainstain A (1998) A highly efficient procedure for generating carnation plants with novel traits. *EUCARPIA 19th Intern. Symposium in Angers (France)*

7. Anhang

7.1 Nährmedien

LB-Medium (Luria Broth)

10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
mit dH₂O auf 1l auffüllen
pH 7,5

YEB-Medium:

1 g Hefeextrakt
5 g Pepton
0,5 g MgSO₄
5 g Beefextrakt
5 g Zucker
mit dH₂O auf 1l auffüllen
pH 7,2

7.2 Puffer

TE-Puffer

10 mM Tris-HCL pH 8,0
1 mM EDTA pH 8, 0

TBE-Puffer

10,8 g Tris
5,5 g Borsäure
0,75 g EDTA
mit dH₂O auf 1l auffüllen
pH 8,0

2 x CTAB-Puffer

2 % CTAB
1 % PVP
20 mM EDTA
1,4 M NaCl
100 mM Tris-HCL, pH 7,5

7.3 Händlerverzeichnis

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Zefa Laborservice (München)	http://www.zefa-laborservice.de/
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	http://www.sial.com/
Fluka (Neu-Ulm)	http://www.fluka.de/
Merck (Darmstadt)	http://www.merck.de/
Roth (Karlsruhe)	http://www.carl-roth.de/
Biorad (USA)	http://www.bio-rad.com/
Biozym (USA)	http://www.biozym.com/
Duchefa (Niederlande)	http://www.duchefa.com/
Qiagen (Hilden)	http://www.qiagen.com/
Schleicher & Schüll (Dassel)	http://www.s-und-s.de/

Enzyme wurden soweit nicht anders beschrieben von folgenden Firmen bezogen:

MBI Fermentas (Litauen)	http://www.fermentas.com/
Promega (Mannheim)	http://www.promega.com/
Boehringer (Mannheim)	http://biochem.boehringer-mannheim.com/
Boehringer (Ingelheim)	http://www.boehringer-ingelheim.com/
Gibco/BRL (USA)	http://www.lifetech.com/
Invitrogen (Niederlande)	http://www.invitrogen.com/
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	http://www.apbiotech.com/
New England Biolabs (USA)	http://www.neb.com/
Stratagene (USA)	http://www.stratagene.com/
Roche (Schweiz)	http://www.roche.com/

Reaktionssysteme und Kits wurden soweit nicht anders beschreiben von folgenden Firmen bezogen:

Clontech (USA)	http://www.clontech.com/
Invitrogen (Niederlande)	http://www.invitrogen.com/

Qiagen (Hilden)	http://www.qiagen.com/
MBI Fermentas (Litauen)	http://www.fermentas.com/
Boehringer (Mannheim)	http://biochem.boehringer-mannheim.com/
Biorad (München)	http://www.bio-rad.com/
Gibco/BRL (USA)	http://www.lifetech.com/
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	http://www.apbiotech.com/

Samen der verwendeten *Pelargonium*-Sorten wurden von folgenden Händlern bezogen:

Bruno Nebelung Pflanzenzüchtung	Freckenhorster Str.32 48351 Everswinkel Tel: 02582/6700
---------------------------------	---

Walz	Solitudestr. 99 D-70499 Stuttgart Tel: 0711/86009-0 http://www.walz-samen.de
------	--

S+G (Novartis)	Alte Reeser Str. 95 D-47533 Kleve Tel.: 02811/9940 www.novartis-seeds.de
----------------	--

LEBENS LAUF

Name	Dirk Börstling
Anschrift	Rabenweg 14 85356 Freising Tel.: 08161-885170
Geburtsdatum	19.02.1969
Geburtsort	Walsrode
Familienstand	ledig
Schul Ausbildung	Grundschule Ahlden 1975-1979 Orientierungsstufe Hodenhagen 1979-1981 Gymnasium Walsrode 1981-1988, Abitur
Wehrdienst	07/1988-09/1989, Lüneburg
Berufstätigkeit	10/1989-10/1990
Hochschulstudium	Technische Universität Braunschweig Biologie 11/1990-10/1996
Abschluß	Diplom Biologe
Promotion	11/1996-04/2001 am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der TU- München-Weihenstephan
Berufstätigkeit	seit 01.05.2001 Bayrische Landesbank in München

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. G. Forkmann für die Bereitstellung des interessanten Themas, der ständigen Diskussionsbereitschaft und der intensiven Betreuung und Motivation bedanken.

Bei Prof. Dr. G. Müller-Starck möchte ich mich für den Prüfungsausschußvorsitz und bei Prof. Dr. G. Wenzel für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Dem Team Dürnast gilt mein Dank für die Betreuung der Pflanzen im Gewächshaus (Herr Dinkel), der Hilfe bei den Fotoarbeiten (Ina Tittel) und der Lösung von EDV-Problemen (Florian Steinbacher).

Herzlich sei an dieser Stelle den Sekretärinnen Frau Deragisch und Frau Look für die Hilfe bei den verwaltungstechnischen Aufgaben und dem angenehmen Klima am Lehrstuhl gedankt.

Ein besonderer Dank gilt Dr.Thilo Fischer und Christian Seitz für angeregte Diskussionen und die gute Stimmung im Labor und vor allem Christian Eder für die gemeinsame Zeit am LZW, die sich nicht nur auf die Aufgaben im Labor beschränkte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin Daniela für die Geduld und Unterstützung während der Zeit bedanken.