

Lehrstuhl für Genetik der
Technischen Universität München

**Erzeugung transgener Maispflanzen zur Steuerung der Expression von
Genen des Sekundärmetabolismus**

Dipl.-Ing. agr. (Univ.) Regina Stefanek

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Die Dissertation wurde am 08.02.2006 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.05.2006 angenommen.

	Seite
Abkürzungen	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung von Mais	1
1.2 Abwehrstrategie der Maispflanze mit Hilfe sekundärer Inhaltsstoffe	2
1.3 DIMBOA-Biosyntheseweg und <i>Bx</i> -Genexpression	3
1.4 Tritrophe Interaktion	4
1.5 Erzeugung transgener Pflanzen zur Analyse der Reportergenkonstrukte	6
1.6 Ziel der Arbeit	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Chemikalien und Reagenzien	9
2.2 Plasmide und Vektoren	9
2.3 Verwendete Primer	10
2.4 Puffer und Medien	10
2.5 Verwendete Bakterienstämme	12
2.5.1 Anzucht und Transformation	12
2.5.2 Präparation von DNA	13
2.6 Analysenmethoden für DNA und RNA	13
2.6.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	13
2.6.2 Quantitative Bestimmung der Transkriptmenge mittels Light-cycler	13
2.6.2.1 Induktion der <i>Igl</i> -Aktivität durch Verwundung und Elicitorgabe	13
2.6.3 Southern-Blot-Hybridisierung	14
2.6.4 PCR-Verfahren	15
2.6.5 Sequenzierung	15
2.7 DNA-Klonierungstechniken	15
2.7.1 Reportergenkonstrukte für die stabile und transiente Transformation	16
2.7.1.1 <i>Bx</i> -Reportergenkonstrukte	16

2.7.1.2	<i>Igl</i> -Reportergenkonstrukte	17
2.7.1.3	Konstrukte für den Goldpartikelbeschuss	17
2.8	Transformation unreifer Maisembryonen mit <i>A. tumefaciens</i>	18
2.8.1	Anzucht der Spenderpflanzen	18
2.8.2	Isolierung unreifer Maisembryonen	20
2.8.3	Vorkultur, Anzucht und Inkubation mit <i>A. tumefaciens</i>	20
2.8.4	Aufzucht transgener Pflanzen	21
2.8.5	Nachweis des T-DNA-Transfers über die BASTA -Resistenz	21
2.9	Histochemische Analyse der Transgenen	21
2.9.1	Analyse der β -Glucuronidase-Expression	21
2.9.2	Benzoxazinon-Färbung mit Eisen(III)-Chlorid	22
2.10	Goldpartikelbeschuss als transientes Expressionssystem	22
2.10.1	Verwendetes Pflanzenmaterial	22
2.10.2	Goldpräparation und Beladen	22
2.10.3	Durchführung des Beschusses	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Etablierung der Transformation von Mais mit <i>A. tumefaciens</i>	24
3.1.1	Optimierung der transienten Expression	24
3.1.2	Etablierung der stabilen Transformation	27
3.1.2.1	Pflanzenqualität und Embryonengröße	27
3.1.2.2	Inkubation mit <i>A. tumefaciens</i> und Entfernung der Suspension	27
3.1.2.3	Bestimmung geeigneter Gewebekultur-Bedingungen	28
3.1.2.4	Selektion transgener Zellen und Gewinnung eines Klones	31
3.1.2.5	Regeneration transgener Pflanzen	32
3.1.3	Optimiertes Protokoll für die Maistransformation mit <i>A. tumefaciens</i>	33
3.2	Analyse der transgenen Pflanzen	36
3.2.1	Integrationsmuster und Kopienzahl der T-DNA	37
3.2.2	Analyse der Reporter-gen-Expression	38
3.2.2.1	<i>Bx</i> -Reporter-genkonstrukte	39
3.2.2.2	<i>Igl</i> -Reporter-genkonstrukte	47
3.2.2.2.1	Histologische Untersuchungen	48

3.2.2.2.2	Quantitative Bestimmung der Transkriptmenge	49
3.3	Goldpartikel-Beschuss als transientes Expressionssystem	51
3.3.1	Bestimmung des geeigneten Gewebes	52
3.3.2	Verwendung geeigneter Positiv-Kontrollen	52
3.3.3	Optimierung der Bedingungen des Beschusses	53
3.3.4	Intron-Konstrukte für den Beschuss	54
4	Diskussion	56
4.1	Etablierung der Transformation von Mais mittels <i>A. tumefaciens</i>	56
4.2	Charakterisierung der transgenen Pflanzen	61
4.3	Analyse der Reportergenkonstrukte	64
4.3.1	Analyse der <i>Bx1</i> - und <i>Bx2</i> -Reportergenkonstrukte	66
4.3.2	Untersuchung der <i>Igl</i> -Reportergenkonstrukte	69
5	Zusammenfassung	71
6	Literatur	73
7	Anhang	82
	Danksagung	

Abkürzungen

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Acetosyringon	3'5'Dimethoxy-4-Hydroxy-acetophenon 97 %
AS	Acetosyringon
<i>bar</i>	Phosphinotricin-Acetyltransferase-Gen; vermittelt Resistenz gegen L-Phosphinotricin
BASTA	formuliertes Herbizid mit dem Wirkstoff Phosphinothricin (Hoechst)
bidest. Wasser	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
cDNA	komplementäre DNA
DIBOA	2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N'-N'-Tetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GUS	β-Glucuronidase
<i>Gus</i>	β-Glucuronidasegen
IGL	Indolglycerinphosphatlyase
<i>Igl</i>	<i>Indolglycerinphosphatlyasegen</i>
IPTG	1-Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase(n)
LEA	Elicitor L-Linolenoyl-Gln für die Induktion von <i>Igl</i>
mM	millimolar
μM	mikromolar
MS-Salze	Murashige & Skoog-Salze
N ₆ -Salze	Chu (N ₆)-Salze, Mikro- und Makroelemente
NOS-Terminator	Terminator des Nopalinsynthasegens auf <i>A. tumefaciens</i>
OD _{550nm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm
PCR	polymerase chain reaction
ppm	parts per million
35S-Promotor	CAMV-(,Cauliflower Mosaic Virus')-35S-Promotor

psi	pounds per square inch, 1 psi entspricht 0,06893 bar
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
SEM	scanning electron microscopy
SSPE	Natrium-Phosphat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Glucuronsäure

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: DIMBOA-Biosyntheseweg und dessen Abzweigung vom Primärmetabolismus
- Abb. 2: Schematische Darstellung des T-DNA-Vektors pTF 102 (Iowa State University)
- Abb. 3: Einführung der EcoRI-Restriktionsschnittstellen mittels PCR in den *Bx1*-Promotor.
- Abb. 4: BASTA-Resistenztest bei Blättern
- Abb. 5: Transiente GUS-Expression bei unreifen Embryonen 5 Tage nach Infektion
- Abb. 6: Anteil transient transformierter Embryonen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration
- Abb. 7: Anteil transient transformierter Embryonen in Abhängigkeit von der Cystein-Konzentration
- Abb. 8: Anteil transient transformierter Embryonen in Abhängigkeit vom pH-Wert
- Abb. 9: pH-abhängiges Wachstum von *Agrobacterium tumefaciens*
- Abb. 10: Bildung von Typ II-Kallus in der Gewebekultur
- Abb. 11: Bildung somatischer Embryonen in der Gewebekultur
- Abb. 12: Regeneration transgener Pflanzen
- Abb. 13: Southern-Analyse transgener Pflanzen
- Abb. 14: Kopienzahlbestimmung
- Abb. 15: Vergleich verschiedener Färbelösungen nach Goldpartikelbeschuss von Mesokotylhälften
- Abb. 16: GUS- und FeCl₃-Färbung von *Bx1*/870 bp-Gewebe
- Abb. 17: GUS-Färbung reifer somatischer Embryonen von *Bx1*/1,3 kb (A), *Bx1*/1,8 kb (B)
- Abb. 18: GUS-Färbung in der T₁-Generation von *Bx1*/870 kb-Reporterpflanzen
- Abb. 19: GUS- und FeCl₃-Färbung in der T₁-Generation von *Bx1*/1,8 kb-Reporterpflanzen
- Abb. 20: Sequenzmotiv des *Bx2*-Gens und seine mutierte Form (Martin, 2003)
- Abb. 21: GUS- und FeCl₃-Färbung verschiedener Gewebekulturstadien
- Abb. 22: GUS-Färbung der Embryonen bzw. Kalli mit *Bx2*.box 0,6kb 0 Tage (A), 1 Tag (B), 8 Tage (C, D) und 32 Tage (E, F) nach Versuchsbeginn.
- Abb. 23: GUS-Färbung von Embryonen bzw. Keimlinge der T₁-Generation
- Abb. 24: GUS-Färbung der Koleoptilen in der T₁-Generation von *Bx2*.box 0,6 kb
- Abb. 25: *Igl*-Reportergerätenkonstrukte (Kortes, 2003)

- Abb. 26: GUS-Färbung von 10 Tage alten unverwundeten MID 3,7 kb-Keimlingen.
- Abb. 27: Quantitative RT-PCR mit TA 0,7 kb für die Gene *Igl* und *Gus* bei verschiedenen Behandlungen
- Abb. 28: Quantitative RT-PCR mit MID 3,7 kb für die Gene *Igl* und *Gus* bei verschiedenen Behandlungen
- Abb. 29: Quantitative RT-PCR mit zwei unabhängigen Linien 1 und 2 von no motive 0,36 kb für die Gene *Igl* und *Gus* bei verschiedenen Behandlungen
- Abb. 30: Quantitative RT-PCR zur Bestimmung des geeigneten Zielgewebes
- Abb. 31: Goldpartikelbeschuss von Mesokotylhälften mit Ubi-GUS bei verschiedenen Drücken

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Darstellung der verwendeten Plasmide
- Tab. 2: Darstellung der verwendeten Primer
- Tab. 3: Radioaktiv markierte Sonden für die Southern-Blot-Hybridisierung
- Tab. 4: Zusammenfassung der Versuche zur transienten Expression (Anhang)
- Tab. 5: Zusammenfassung der Versuche zur stabilen Transformation (Anhang)
- Tab. 6: Einfluss von Cefotaxim und Timentin auf die Kallusproliferation und die Kontrolle des *Agrobacterien*-Wachstums
- Tab. 7: Transformations- und Regenerationsraten (Anhang)
- Tab. 8: Eingesetzte Promotor-GUS-Konstrukte und Ergebnis der Transformationsversuche
- Tab. 9: Darstellung des Koleoptilenversuch mit *Bx2.box* 0,6 kb und *Bx2.mut* 0,6 kb (Anhang)
- Tab. 10: GUS-Färbung von 10 Tage alten Keimlingen 2, 5 und 24 Stunden nach Induktion durch Verwundung
- Tab. 11: Vergleich der GUS-Expression von Ubi-GUS und Ubi-GUS-Intron
- Tab. 12: Vergleich der GUS-Expression von P2.1T650-GUS und P2.1T650-GUS-Intron
- Tab. 13: Vergleich der GUS-Expression von P190T650-GUS und P190T650-GUS-Intron

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Mais

Mais (*Zea mays*) zählt heute zu den wichtigsten weltweit verbreiteten Kulturpflanzen. Insgesamt gibt es 75 000 genießbare Pflanzenarten, davon sind 7000 als Nahrung geeignet, 20 werden intensiv genutzt. An zweiter Stelle auf der Liste der wichtigsten Pflanzen der Welt steht Mais, übertroffen von Weizen (*Triticum aestivum*) und gefolgt von Soja (*Glycine max*), Reis (*Oryza sativa*) und Raps (*Brassica napus*) auf den Plätzen drei bis fünf (Kern, 2002). Bereits vor 5000 Jahren wurde Mais zunächst in Mittel- und Südamerika angebaut und kam erst nach der Entdeckung Amerikas nach Europa (Belitz et al., 2001). Die fünf wichtigsten Körnermaisangebiete der Welt sind USA, China, Europa, Brasilien und Mexiko, die weltweite Anbaufläche (zur Körnernutzung) betrug knapp 145 Mio. ha mit einer Produktion von 705 Mio. t im Jahr 2004 (agbios, GM Database, MON88017, Stand August 2005; DMK, Stand Oktober 2005).

Die zahlreichen Varietäten werden nach verschiedenen Gruppen unterschieden (Stärke-, Perl-, Zucker-, Stein-, Silo-Mais) (Meyers Taschenlexikon Biologie, 1994). Hauptsächlich entstehen daraus Stärke und Fermentationsprodukte, z. B. Alkohol, sowie Tierfutter, nur ein kleiner Anteil wird direkt verzehrt, während ein großer Anteil als raffinierte Produkte in die Nahrungsmittelproduktion gelangt. Industriell wird Mais zudem für Papier-, Farben-, Kosmetik- oder auch Antibiotikagewinnung genutzt (agbios, GM Database, MON88017, Stand August 2005).

Der Anbau von Mais wird hauptsächlich durch das Auftreten von Schädlingen erschwert. Durch Krankheiten (*Fusarium ssp.*, Erreger der Stengelfäule; *Ustilago maydis*, Erreger des Beulenbrandes) kommt es kaum zu hohen Ertragsverlusten, bedeutend dagegen ist der Schädlingsbefall (Blatter und Wolfe, 1995). Wichtige Schadinsekten sind der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*), Drahtwürmer (Larven von *Agriotes spp.*) (Blatter und Wolfe, 1995), sowie der „corn rootworm“ (*Diabrotica spp.*) (agbios, GM Database, MON88017, Stand August 2005). Die Maispflanze verwirklicht verschiedene Abwehrstrategien, um sich vor unterschiedlichen Schädlingen zu schützen.

1.2 Abwehrstrategie der Maispflanze mit Hilfe sekundärer Inhaltsstoffe

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind ebenso wie primäre Pflanzeninhaltsstoffe essentiell für die Pflanze. Während Primärmetaboliten von allen Pflanzen gleichermaßen gebildet werden und für den Grundstoffwechsel verantwortlich sind, werden unterschiedliche Sekundärmetaboliten abhängig von der Pflanzenspezies und nicht bei allen Pflanzen gebildet. Sekundärmetabolite haben große Bedeutung für die Kommunikation der Pflanze mit der Umwelt, z. B. über das Anlocken von Bestäubern durch Farbpigmente (Anthocyane, Carotinoide, Flavonoide) und Geschmacks-/Geruchsstoffe (Mono-, Sesquiterpene), durch Beeinflussung der Keimung sowie Wachstum und Entwicklung benachbarter Pflanzen (Allelopathie; Harborne, 1977) und durch chemische Abwehr von Mikroorganismen und Herbivoren (Richter, 1996). Die Abwehrstrategie der Pflanze kann direkt durch die Synthese toxischer Substanzen oder indirekt, z. B. durch Tritrophe Interaktion erfolgen, bei der die Pflanze als Reaktion auf einen Schädlingsbefall Feinde des Herbivoren (Insektoide oder Parasiten) durch Freisetzung flüchtiger Stoffe anlockt. Eine direkte Abwehr der Pflanze erfolgt entweder durch konstitutive Bildung von Phytoantizipinen unabhängig vom Auftreten eines Schädlings (Osborn, 1996), oder durch die Synthese von Phytoalexinen, die nach einer Schädigung als Folge der Induktion durch einen Elicitor gebildet werden (Richter, 1996). Bei Mais sind beide Abwehrstrategien bekannt, zum einen die direkte Abwehr durch die Bildung von Benzoxazinonen, zum anderen die indirekte Abwehr durch die Anlockung parasitierender Schlupfwespen durch flüchtige Duftstoffe.

Benzoxazinone gehören zu den Sekundärmetaboliten, die hauptsächlich in *Gramineen* (Niemeyer, 1988) wie Mais, Roggen und Weizen, aber auch einigen Dikotyledonen, wie in *Scrophulariaceae*, *Ranunculaceae* und *Acanthaceae*, auftreten und dort eine große Bedeutung für die generelle Pflanzenabwehr gegen Schädlinge und Pathogene haben (Sicker et al., 2000). Bereits 1960 wurde festgestellt, dass Benzoxazinone für die Resistenz von Roggen gegen pathogene Pilze verantwortlich sind (Virtanen und Hietala, 1960), mittlerweile konnte zudem ein antimikrobielles, algizides, insektizides und allelopathisches Potential der Benzoxazinone nachgewiesen werden (Sicker et al., 2000). Aufgrund der Autotoxie erfolgt eine Kompartimentierung der Benzoxazinone in der Zelle. Die wenig giftigen D-Glucoside sind in der Vakuole lokalisiert und werden erst bei Verletzung der Zellen, z. B. durch Insekten- oder Pathogenbefall, durch endogene β -Glucosidasen, die im Chloroplasten gefunden werden, in das toxische Aglucon

umgewandelt. Der Hauptvertreter der Benzoxazinone in Mais und Weizen ist DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on), in Roggen (*Secale cereale*) die biosynthetische Vorstufe DIBOA (2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on). In Mais und Weizen wurde eine Korrelation des Benzoxazinon-Gehaltes mit der Resistenz der Pflanze gegen Schädlinge festgestellt (Niemeyer, 1988). Bei Mais ist vor allem die Wirkung von DIMBOA gegen den Maiszünsler durch die Interaktion mit Enzymen des Verdauungstraktes der Larven (Sicker et al., 2000), und die Vermittlung der Resistenz gegen das Herbizid Atrazin (Niemeyer, 1988), gut untersucht.

1.3 DIMBOA-Biosyntheseweg und *Bx*-Genexpression

Die Biosynthese von DIMBOA in Mais ist mittlerweile fast vollständig aufgeklärt (Frey et al., 1997; von Rad et al., 2000; Frey et al., 2003). Diese beginnt mit der Umsetzung von Indol-3-Glycerinphosphat (IGP) zu freiem Indol durch ein zur α -Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA) homologes Enzym, BX1. Mit BX1 wird die Abzweigung des Sekundärmetabolismus vom Primärmetabolismus etabliert (Abb. 1). Die DIMBOA-Mutante *bx1bx1* (*benzoxazineless*) trägt eine Mutation im *Bx1*-Gen und bildet daher kein DIMBOA (Frey et al., 1997; Melanson et al., 1997). TSA und TSB (β -Untereinheit der Tryptophan-Synthase) katalysieren im Primärstoffwechsel die Umsetzung von IGP zu Tryptophan. TSA und BX1 weisen eine Aminosäureidentität von über 60 % und analoge Genstruktur auf. *Bx1* ist vermutlich durch Duplikation des TSA-Gens entstanden (Gierl und Frey, 2001). Die für die folgenden Schritte in der DIMBOA-Biosynthese verantwortlichen Enzyme BX2-BX5 gehören zu den Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen, sind membrangebunden, lokalisiert im Endoplasmatischen Retikulum und katalysieren die folgenden vier Hydroxylierungsschritte und eine Ringerweiterung zur Bildung von DIBOA. Dieses wird durch die Glucosyltransferasen BX8 und BX9 glycosyliert (von Rad et al., 2001), die nachfolgende Hydroxylierung an der C7-Position von DIBOA-Glc zu TRIBOA-Glc erfolgt durch die Dioxygenase BX6 (Frey, unveröffentlichte Ergebnisse). Im letzten Schritt katalysiert eine O-Methyltransferase, die bislang nicht identifiziert werden konnte, die Bildung von DIMBOA-Glc durch Methylierung von TRIBOA-Glc.

DIMBOA-Glucosid wird hauptsächlich im jungen Keimling gebildet und erreicht die höchste Konzentration in 2 Tage alten Keimlingen (Cambier et al., 2000). Bis Tag 10

sinkt die DIMBOA-Konzentration in den Zellen, während der Gesamtgehalt weiter ansteigt. Ab dann sinkt die absolute Menge durch Abbau oder Ausscheidung. Es wurde festgestellt, dass die DIMBOA-Konzentration im Spross immer höher ist, als in der Wurzel (Cambier et al., 2000). Diese Verteilung des Benzoxazinons korreliert mit der Expression der dazu verantwortlichen *Bx*-Gene. Anhand von *in situ*-Hybridisierungen und auf Proteinebene konnte eine transiente, keimlingsspezifische Expression der Gene *Bx1-Bx5* vor allem im Spross festgestellt werden, mit einer maximalen Transkriptmenge zwischen drei und sieben Tagen (Frey et al., 1995), dagegen werden *Bx8* und *Bx9* vor allem in der Wurzel exprimiert (von Rad et al., 2001). Quantitative RT-PCR-Analysen zeigen, dass die Gene *Bx1*, *Bx3*, *Bx8* und *Bx9* zudem starke Expression im Mesokotyl, in jungen Blättern und der Differenzierungszone der Wurzel aufweisen (Schmäzlin, 2003).

1.4 Tritrophe Interaktion

Die Bildung von freiem Indol aus Indol-3-Glycerinphosphat in Mais kann durch *BX1* und die Indolglycerinphosphatlyase (IGL) katalysiert werden. Das zu *Bx1* homologe *Igl*-Gen bewirkt die Freisetzung von flüchtigem Indol als direkte Reaktion auf Verwundung durch Herbivoren. *Igl* wird durch Verwundung und den Elicitor Volicitin (*N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-Glutamin) (Alborn et al., 1997), der sich im Speichel des Herbivoren „Beet armyworm“ (*Spodoptera exigua*) findet, induziert, die Reaktion ist die Synthese von Indol und Terpenoiden. Durch dieses Duftgemisch werden parasitierende Schlupfwespen (*Cortesia marginiventris*) angelockt, die den Herbivore durch Eiablage in die Raupen schädigen (Frey et al., 2000). Die Expression des *Igl*-Gens erreicht zwei Stunden nach Induktion durch Verwundung eine 10fache und durch Volicitingabe eine 50-60fache Steigerung der Transkriptmenge. Nach 8 Stunden sinkt die Expression wieder auf die Höhe der nicht-induzierten Kontrolle (Frey et al., 2000).

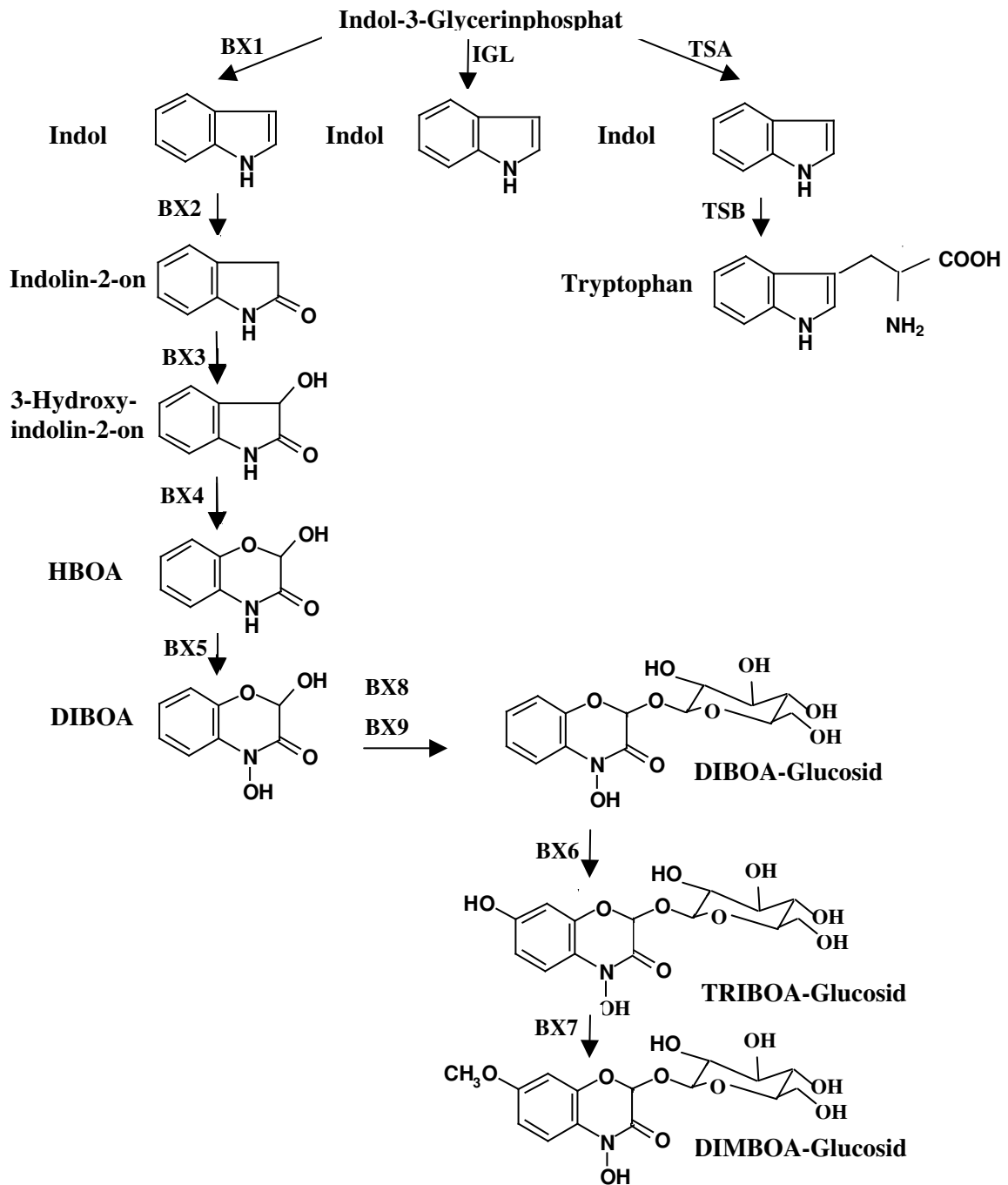


Abb. 1: DIMBOA-Biosyntheseweg und dessen Abzweigung vom Primärmetabolismus Dargestellt ist die Bildung von Indol für die DIMBOA- und Tryptophan-Biosynthese, sowie die Bildung flüchtigen Indols durch IGL
 BX1 ist ein zur α -Untereinheit der Tryptophansynthase homologes Enzym, BX2-BX5 sind Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, BX6 gehört zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, BX7 ist eine O-Methyltransferase und BX8 und BX9 sind UDP-Glucosyltransferasen

Die Genregulation bei der direkten Abwehr durch Bildung des Toxins DIMBOA und in der Tryptophen Interaktion, sind unterschiedlich, DIMBOA wird entwicklungspezifisch, flüchtiges Indol wird nach Induktion des *Igl*-Gens gebildet. Für das Verständnis des

Aufbaus und der Evolution der Sekundärstoffwechsel-Biosynthesewege ist die Kenntnis der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen entscheidend. Darüber hinaus liegen in den Regulationsmechanismen Möglichkeiten, diese Biosynthesen zu steuern. Das Wissen um die Regulation der Sekundärstoffwechselwege ist bei der DIMBOA-Biosynthese relevant, da eine effektive DIMBOA-Konzentration nur im jungen Keimling erreicht wird und dieser Schutz mit zunehmendem Alter der Pflanze verloren geht. Durch Steuerung der Biosynthese wäre es möglich, diesen endogenen Schutz zu verlängern. Im idealen Fall gibt es einen Hauptregulator, der alle Gene der DIMBOA-Biosynthese aktiviert, die transgene Expression dieses Gens würde zur Verlängerung der DIMBOA-Biosynthese führen. In der Anthocyanbiosynthese liegen solche „Mastergene“ der Regulation vor. Bei Mais werden die Anthocyanbiosynthesegene im Aleuron des Korns durch das Zusammenwirken des R2R3-MYB-Transkriptionsfaktors C1 mit dem bHLH-Protein R aktiviert, während die Biosynthese in der restlichen Pflanze durch das MYB-Protein P1 kontrolliert wird (Cone et al., 1986; Ludwig et al., 1989; Cone et al., 1993). In *Arabidopsis* wurde ein MYB-Transkriptionsfaktor der Phenylpropanoidbiosynthese identifiziert, dessen Überexpression zur Aktivierung des gesamten Stoffwechsels führte (Borevitz et al., 2000).

1.5 Erzeugung transgener Pflanzen zur Analyse der Reportergenkonstrukte

Die Genexpression ist eine Folge der Wechselwirkung von *trans*-aktivierenden Transkriptionsfaktoren mit spezifischen Bindestellen, sogenannten *cis*-Elementen im Promotorbereich der Gene. Diese *cis*-Elemente werden über ihre Funktion definiert, dies kann anhand der Promotoranalyse mit Reportergenkonstrukten durchgeführt werden. Werden Gene untersucht, die gewebespezifisch exprimiert werden, oder deren Expression induziert werden kann, ist es sinnvoll, diese Analyse mit stabil transgenen Pflanzen auszuführen, da hier beliebig vergleichbares Pflanzengewebe in unterschiedlichsten Entwicklungsstadien untersucht werden kann.

Zur Bestimmung von Promotorelementen der *Bx*-Gene und des *Igl*-Gens war es notwendig, stabil transgene Maispflanzen zu erzeugen. Dies stellt bislang kein Routineverfahren dar. Rhodes et al. (1988) gelang die erste dokumentierte Erzeugung transgener Maispflanzen aus Protoplasten, nach und nach wurden unterschiedliche Gene, die eine Resistenz der Pflanze gegenüber verschiedenen Schädlingen (Maiszünsler)

(Armstrong et al., 1995), Herbiziden (Phosphinothricin) oder Viren (maize chlorotic mottle virus) (Murry et al., 1993) vermittelten (Armstrong et al., 1998), übertragen. Zu Beginn der Maistransformation wurde die Regeneration transgener Pflanzen in der Gewebekultur etabliert, dazu wurden verschiedenen Gewebe verwendet. Erfolgreich war die Regeneration aus unreifen Embryonen über somatische Embryogenese. Transgene Maispflanzen konnten bislang mit verschiedenen Methoden erzeugt werden, darunter die biolistische Transformation mittels Partikelbeschuss (Sanford et al., 1987) und die *Agrobacterien*-vermittelte Transformation. Hiei et al. (1994) gelang erstmals die Erzeugung fertiler transgener Reispflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens* mit dem super-binären Vektorsystem, Ishida et al. (1996) konnten unreife Maisembryonen mit derselben Methode transformieren. Die *Agrobacterien*-vermittelte Transformation bei Monokotyledonen ist insofern schwierig, als diese nicht zum natürlichen Wirtsspektrum der Bakterien gehören. Dennoch wurden große Anstrengungen unternommen, diese Methode zu etablieren, da das Integrationsmuster der DNA einfacher ist, als bei der biolistischen Methode und damit eine zuverlässigere, stabile Genexpression erzielt werden kann. Dies konnte durch die Verwendung super-binärer Plasmide und super-virulenter Bakterienstämmen, welche zusätzliche Virulenz (*vir*)-Gene tragen, ermöglicht werden. Allerdings stellt die Transformation mittels *Agrobacterium* bislang noch kein Standardverfahren dar. Bei Frame et al. (2002) ist die Transformation unreifer Embryonen mit dem binären Vektorsystem (ohne zusätzliche *vir*-Gene) bei Mais beschrieben. Ausgehend von dem Protokoll dieser Arbeitsgruppe wurde die *Agrobacterien*-vermittelte Transformation mit dem binären Vektorsystem etabliert.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, die *Agrobacterien*-vermittelte Transformation unreifer Maisembryonen mit dem binären Vektorsystem für den Lehrstuhl zu etablieren. Transformiert werden sollten Reporter-GUS-Konstrukte mit Fragmenten des *Bx1*-, *Bx2*- und *Igl*-Promotors. Stabil transformierte Pflanzen sollten histochemisch, sowie mittels Southern-Blot und bezüglich der Genexpression mit quantitativer RT-PCR untersucht werden.

In Mais wurden zwei Transkriptionsfaktoren aus der Klasse der HD-Zip-Proteine (Homeodomain Leucine Zipper) *ZmHDZip1* und 2 identifiziert, die spezifisch an ein

Bx2.box-Motiv im Promotor des *Bx2*-Gen binden (Martin, 2003). Dieses *Bx2.box*-Motiv (Martin, 2003) sollte mit Reporter-genkonstrukten auf seine Funktion in der transgenen Maispflanze untersucht werden. Im *Igl*-Promotor sollten die regulatorischen Sequenzelemente identifiziert werden, die für die durch Verwundung des Gewebes und durch Elicitorgabe induzierte Genexpression verantwortlich sind.

Parallel zur Analyse stabil transgener Maispflanzen sollte ein System für eine transiente Untersuchung von *Bx*-Reporter-genkonstrukten in Mais optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad (USA), Fluka (Schweiz), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), MBI Fermentas (Litauen), Gibco/BRL (Eggenstein), Duchefa (Haarlem, Niederlande), New England Biolabs (USA), Invitrogen (Karlsruhe), VWR (Ismaning), FMC BioProducts (USA).

Hybond-N Nylonmembran und radioaktiv markierte Nukleotide (^{32}P α -dCTP, 3000Ci/mol) wurden von Amersham Bioscience (Freiburg) bezogen.

Die für die Gewebekultur benötigten Medien, Vitamine, Hormone, Antibiotika und weitere Zusatzstoffe wurden von Duchefa (Haarlem, Niederlande) bezogen. Acetosyringon stammt von Acros Organics (USA). Sterilfilter wurden von Millipore (Eschborn) bezogen.

Goldpartikel und Zubehör für die Partikelkanone wurden von Bio-RAD (USA) bezogen.

2.2 Plasmide und Vektoren

Tab. 1: Darstellung der verwendeten Plasmide

Plasmide	Resistenzmarker	Literaturnachweis
pBluescript KS+	Ampicillin	Stratagene, USA
pTF 102/ pTF 101	Spectinomycin	Plant Transformation Facility, Iowa State University
pUC19	Ampicillin	Yannisch-Perron et al., 1985

2.3 Verwendete Primer

Tab. 2: Darstellung der verwendeten Primer

Primername	Primersequenz
GUSQF	CGATCAGTTCGCCGATGCAGATA
GUSQR	ACAGTCTTGCGCGACATGCGTCA
Bx1/Bgl II Rev	TTGGGCGGGGTACCAGATCTCGCTTCTGTGC
Bx1/EcoRI FW1800	AGTCTTTGAACGAATTCTAGAGATCTAGTT
Bx1/EcoRI FW 1270	TTTCTTGGAATTCTTATATTTCCCTTCGA
Bx1/EcoRI FW 370	ATTAAAGAATTCTTCGTTCCAATTT
Bx2.mut.com.r	CAGACTCCAATTTTTTATGTGGCCGC
Bx2.EcoRI FW	AGATCTAATGAAAGAATTCCCCC
GusNco	GAGAGAGGATCCCCGGGTATCGACCAT
GusEco	GAGAGAGAATTCATTGTTTGCCTCCCT
GusModProm	CACCACGATGCCGTGCTCGTCCGCCAG TCGAGCATCTCCTCGGCGTAAGG
GusModTer	ATCGACGAGACCGCCGCGGTTCGGCTTCAAC CTCTCGTTGGGCATCGGCTTCGA
Intron5'	GACTGGGCGGACGAGCACGGCATCGTGGTG <u>GTAATATATGCTACTACGTAC</u>
Intron3'	GTTGAAGCCGACCGCGGCGGTCTCGTCGAT <u>CTGTAAAACCAAAGACACTGA</u>
M13(-20)	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 Rev	GGAAACAGCTATGACCATG

2.4 Puffer und Medien

1/2 MS-Medium (Goldbeschuss)

2,15 g/l MS-Mikro-/Makroelemente
1 ml/l MS-Vitamine
30 g/l Sucrose
pH 5,6

Osmotischer Puffer (Goldbeschuss)

91,09 g/l D-Sorbitol
0,15 g/l CaCl₂
1,95 g/l MES
100 g/l Sucrose
pH 5,6, sterilfiltrieren

X-Gluc-Lösung (für 10 ml)

5 ml	0,2 M NaPO ₄ (pH 7,0)
0,1 ml	50 mM Kalium-Ferricyanid (K ₃ [Fe(CN) ₆]) (pH 7,0)
0,1 ml	50 mM Kalium-Ferrocyanid (K ₄ [Fe(CN) ₆]) (pH 7,0)
0,01 ml	Triton X100
0,1 ml	DMSO
5,2 mg	X-Gluc
3 ml	bidest. H ₂ O

20 x SSPE

3 M	NaCl
0,2 M	EDTA
0,2 M	NaH ₂ PO ₄
pH 7,0	

Natriumphosphatpuffer

57,7 ml	1 M Na ₂ HPO ₄
42,3 ml	1 M NaH ₂ PO ₄
mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen	
ergibt 0,1 M NaPO ₄ , pH 7,0	

PEG-Lösung

3,75 ml	PEG 8000 (40 %ig)
2,00 ml	5 M NaCl
0,1 ml	0,5 M EDTA
mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen	

Medien für die stabile Transformation und Gewebekultur

Alle Medien werden doppelt konzentriert hergestellt, sterilfiltriert und doppelt konzentrierten, autoklavierten Verfestigungstoffen zugegeben. Zusatzstoffe wie 2,4-D, Silbernitrat und Acetosyringon werden aus sterilen Stammlösungen entnommen, Cystein und DTT werden stets frisch hergestellt und sterilfiltriert. Vitamin-Stammlösungen wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet.

Infektionslösung

4 g/l	Chu (N ₆)-Salze	Steril zugeben:
1 ml/l	Chu (N ₆)-Vitamine	1 ml/l Acetosyringon (100 mM Stammlös.)
0,75 ml/l	2,4-D (2 mg/ml Stammlösung)	
0,7 ml/l	L-Prolin	
68,4 g/l	Sucrose	
36 g/l	Glucose	
pH 5,2		

Kokultur-Medium (2fache Konzentration)

4 g/l	Chu (N ₆)-Salze	
2 ml	Chu (N ₆)-Vitamine	Steril zugeben pro 1 l Medium:
1,5 ml/l	2,4-D (2 mg/ml Stammlös.)	1 ml Silbernitrat (0,85 mg/l Stammlös.)
1,4 g/l	L-Prolin	1 ml Acetosyringon (100 mM Stammlös.)
60 g/l	Sucrose	750 mg/l Cystein free base (Endkonz.)
pH 5,8		1 mM DTT (Endkonz.)
Zugabe zu 0,8 % Gelrite		

Ruhe-/SI-Medium (2fache Konzentration)

8 g/l	Chu (N ₆)-Salze	Steril zugeben pro 1 l Medium:	
2 ml/l	Chu (N ₆)-Vitamine	500 µl Timentin (150 mg/ml Stammlös.)	} Ruhe-
1,5 ml/l	2,4-D	1 ml Silbernitrat (0,85 mg/l Stammlös.)	
1,4 g/l	L-Prolin		} SI-Med.
60 g/l	Sucrose	150 µl Bialaphos (10 mg/ml Stammlös.)	
pH 5,8			
Zugabe zu 0,6 % Gelrite (Ruhe-Medium) bzw. 1,6 % Phytoagar (SI-Medium)			

RI-Medium (2fache Konzentration)

8,6 g/l	MS-Salze	Steril zugeben pro 1 l Medium:
2 ml/l	MS-Vitamine	500 µl Timentin (150 mg/ml Stammlös.)
120 g/l	Sucrose	150 µl Bialaphos (10 mg/ml Stammlös.)
200 mg/l	Myo-Inositol	
pH 5,8		
Zugabe zu 0,5 % Gelrite		

RII-Medium (2fache Konzentration)

8,6 g/l	MS-Salze	Steril zugeben pro 1 l Medium:
2 ml/l	MS-Vitamine	500 µl Timentin (150 mg/ml Stammlös.)
60 g/l	Sucrose	
200 mg/l	Myo-Inositol	
pH 5,8		
Zugabe zu 0,5 % Gelrite		

Zusatzstoffe:

Acetosyringon:	200 mM in DMSO lösen, dann 1 : 1 mit bidest. H ₂ O verdünnen, bei -70 °C aufbewahren
2,4-D:	100 mM in 100% tech. Ethanol lösen, bei -20 °C aufbewahren

2.5 Verwendete Bakterienstämme**2.5.1 Anzucht und Transformation**

Für Klonierungen wurde der *E.coli*-Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987) verwendet. Die Anzucht und Transformation erfolgte wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben.

Elektrokompetente *Agrobacterien* wurden nach Walkerpeach und Velten (1994) hergestellt. Die Transformation von *A. tumefaciens* mit den Ti-Plasmid-Konstrukten erfolgte mittels Elektroporation mit dem Gene-Transfection-Pulser (Bio-Rad, USA) in 0,2 mm Küvetten bei 2,5 V, 400 Ω und 25 µF mit 1 µg DNA. Die Selektion wurde auf YEP-Medium mit 50 mg/l Kanamycin und 100 mg/l Spectinomycin durchgeführt.

2.5.2 Präparation von DNA

Plasmid-DNA wurde über alkalische Lyse aus Übernachtskultur von *E. coli* in dYT-Medium mit entsprechender Antibiotika-Selektion bei 37 °C nach Birnboim und Doly (1979) präpariert. Die DNA wurde im Mini-, Midi- und Maxi-Massstab präpariert. Plasmid-DNA wurde mit dem GFX[®] Gel Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA) und für den Partikelbeschuss mit Nucleobond AX-100-Säulen (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

A. tumefaciens wurden in YEB-Medium mit entsprechender Selektion bei 28 °C über 2 Tage angezogen. Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse gewonnen (Plant Transformation Workshop, Iowa State University, 2003).

2.6 Analysenmethoden für DNA und RNA

2.6.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA (ca. 1 µg) wurde mit dem NucleoSpin[®] RNA Plant-Kit (Machery-Nagel, Düren) aus Blattmaterial (ca. 100 mg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Das Umschreiben zu cDNA erfolgte mit dem Taqman Kit (Roche, Schweiz) ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

2.6.2 Quantitative Bestimmung der Transkriptmenge mittels Light-cycler

2.6.2.1 Induktion der *Igl*-Aktivität durch Verwundung und Elicitorgabe

Die Induktion von Maiskeimlingen erfolgte nach Frey et al. (2000) mit dem Elicitor Volicitin (*N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-Gln) bzw. LEA (L-Linolenoyl-Gln). Für die Induktion durch Verwundung eines Blattes wurde das zweite, voll entfaltete Blatt an einer Stelle mit einer Pinzette verletzt. Die Fixierung des Gewebes erfolgte nach 2, 5 und 24 h in einer Lösung von 50 mM Natriumphosphatpuffer und 1 % Formaldehyd, diese wurde ca. 1 min. mit dem Vakuumexsikkator infiltriert, das Gewebe anschließend 20 min. auf Eis inkubiert, 5 Mal mit 50 mM Natriumphosphatpuffer gewaschen und dann mit X-Gluc-Lösung infiltriert.

Für die quantitative Transkriptmengenbestimmung mit Hilfe der RT-PCR wurde der FastStart DNA Master SYBR Green Kit (Roche Molecular Biochemicals), wie bei Frey et al. (2003) beschrieben, verwendet. Die Analyse wurde mittels Light-cycler (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die spezifische Amplifikation des *Gus*-Gens erfolgte mit den Primern GUSQF und GUSQR und folgendem Amplifikationsprogramm: 94 °C, 15 sec.; 66 °C, 10 sec.; 72 °C, 22 sec.; 45 Zyklen. Dem PCR-Ansatz wurde 1 mM MgCl₂ zugegeben.

2.6.3 Southern-Blot-Hybridisierung

Blotting und Hybridisierung erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Es wurden 4 µg genomische DNA, isoliert aus jungen Blättern nach Dellaporta et al. (1983), mindestens 3 h mit 20 units Restriktionsenzym verdaut und über Nacht auf 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Der DNA-Transfer (Southern, 1975) wurde mittels Kapillartransfer auf HybondTM N+ Nylonmembranen mit 20 x SSPE nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die radioaktive Markierung der Sonden (Tab. 3) erfolgte durch Oligo-Markierung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und 32-P- α -dCTP.

Tab. 3: Radioaktiv markierte Sonden für die Southern-Blot-Hybridisierung

Sonde	Herstellung
GUS	BamH1-Hind III-Verdau von pTF 102
„backbone“	Not I-Verdau von pTF 102

Die mit den Sonden hybridisierenden Bindungsstellen sind in Abb. 2 dargestellt.

Für die Kopienzahlanalyse wurde DNA untransformierter B73-Pflanzen (Iowa State University) einbezogen, die mit XhoI/EcoR1 geschnittenem Ti-Plasmid versetzt wurde. Es wurde die DNA-Menge für 1, 5 und 10 Kopien zugemischt. Die DNA-Menge, die einer Kopie entspricht, wurde wie folgt berechnet:

Das Maisgenom besteht haploid aus 3×10^9 bp, die Größe der GUS-Sonde beträgt 2,2 kb (1 Kopie). Diese 1 Kopie ist damit zu einem Anteil von 7×10^{-7} im Genom enthalten. Die für den Southern-Blot eingesetzte DNA-Menge betrug 4 µg, somit macht diese 1 Kopie 2,8 pg am Gesamtgenom aus. Da die Transgenen auf WT-Pflanzen ausgekreuzt wurden, halbiert sich der Anteil auf 1,4 pg. Das 2,7 kb-Fragment macht ca. 1/6 des Plasmids aus, daher müssen für 1 Kopie 8,4 pg B73-DNA eingesetzt werden.

Mit Hilfe des Phospho-Imagers (Storm, Amersham Biosciences) wurde für diese definierte Kopienzahl eine Eichkurve erstellt. Für die transgenen Pflanzen wurde die Stärke des Hybridisierungssignals bestimmt und anhand der Eichkurve in die Kopienzahl umgerechnet.

2.6.4 PCR-Verfahren

PCR-Reaktionen wurden im Thermoblock UNO (Biometra, Göttingen) mit/ohne Heizdeckel und ohne/mit Glycerin unter Verwendung der Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Die angewandte Annealing-Temperatur wurde bezüglich der theoretischen Schmelztemperatur der verwendeten Primer berechnet.

2.6.5 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde die DNA über PEG-Fällung gereinigt und <1 µg für die Sequenzreaktion eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit dem ABI PRISM[®]BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) nach Angaben des Herstellers mit den in Tab. 6 angegebenen Primern M13 (-20) und M13 Rev durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit dem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA), die Auswertung wurde mit dem Programm Seqman (DNASTar, Lasergene) vorgenommen.

2.7 DNA-Klonierungstechniken

Allgemeine DNA-Klonierungstechniken wie Restriktionsverdau mit Endonukleasen, Ligation, T4-DNA-Polymerase- und Alkalische Phosphatase Behandlung und Agarosegel-Elektrophorese wurden nach standardisierten Protokollen (Sambrook et al., 1989) oder Angaben der Hersteller durchgeführt

2.7.1 Reporter-genkonstrukte für die stabile und transiente Transformation

Sämtliche Konstrukte für die stabile Transformation wurden in den T-DNA-Vektor pTF 102 bzw. pTF 101 kloniert (Abb. 2; Frame et al., 2002).

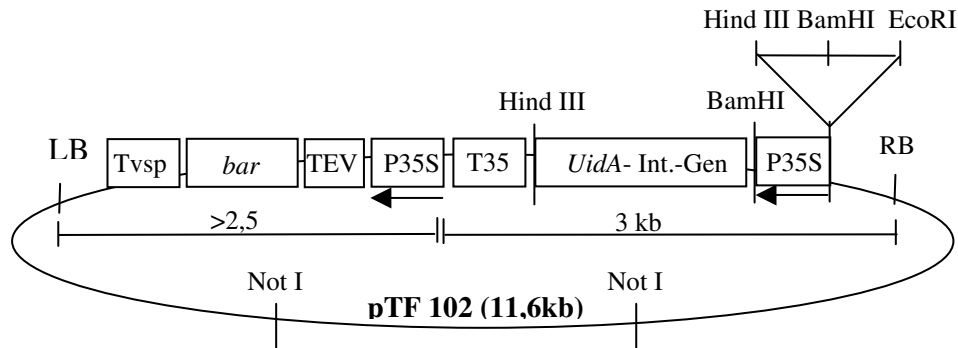


Abb. 2: Schematische Darstellung des T-DNA-Vektors pTF 102 (Iowa State University) LB: Left border; RB: Right border; *bar*: Phosphinothricin-Acetyltransferase-Gen; *UidA*-Int.-Gen: β-Glucuronidase mit Intron; P35S: CaMV-35S-Promotor; TEV: translationaler Enhancer des Tabakätzvirus; Tvsp: vegetativer Speicherprotein-Terminator aus Soja; T35S: CaMV-35S-Terminator; pTF 101 entspricht diesem Vektor ohne die Einheit Promotor-*Gus*-Gen- Terminator

2.7.1.1 Bx-Reporter-genkonstrukte

Ausgangspunkt für die Klonierung der *Bx1*-Konstrukte war das 3,2 kb große Fragment des *Bx1*-Gens. Die *Bx1*-Gensequenzen wurden über PCR erzeugt, in pBluescript KS+ kloniert und sequenziert. Sequenzfragmente ohne Sequenzfehler wurden als EcoRI/BglII-Fragmente (Abb. 3) anstelle des 35S-Promotors vor das *Gus*-Gen in den T-DNA-Vektor pTF 102 kloniert.

Die 870 bp-Sequenz wies für alle untersuchten Klone PCR-bedingte Basenaustausche auf. Durch Kombination des EcoRI/HindIII-Fragmentes von Klon Nr. 5 mit dem HindIII/BglII-Fragment von Klon Nr. 4 konnte ein fehlerfreies Fragment gewonnen werden.

Für das *Bx2*.box 0,8 kb-Konstrukt wurde das 0,8 kb-BamHI-Fragment (Martin, 2003) in den T-DNA-Vektor pTF 102 ligiert (Abb. 2). Das *Bx2*.box 0,6 kb-Konstrukt entstand durch Entfernen des 5'-upstream gelegenen 0,2 kb-Fragments über die EcoRI-Schnittstelle in der *Bx2*-Sequenz und eine EcoRI-Schnittstelle im Vektor. Das *Bx2*.box 0,6 kb-Konstrukt entstand durch Verdau des *Bx2*.box 0,8 kb-Konstrukts mit EcoRI und anschließender Religation in den Vektor. Zur Erstellung des *Bx2*.mut 0,6 kb-Konstruktes

wurde eine PCR auf das *Bx2.box.1000*-upstream-Fragment der genomischen *Bx2*-Promotorsequenz mit den Primern *Bx2.EcoRI Fw* und *Bx2.mut.com.r* durchgeführt, eine zweite PCR erfolgte auf der gleichen DNA mit dem entstandenen Fragment (600 bp) als Primer und *Bx22910BamRev* als Gegenprimer. Nach der Klonierung und Sequenzierung in *pBlueskript KS+* wurde in *pTF 102* über *EcoRI/BamH1* kloniert. Für das *Bx2.mut* 0,8 kb-Konstrukt wurde das *Bx2.mut* 0,6 kb-Konstrukt mit *EcoRI* geöffnet und ein 0,2 kb-Fragment aus *Bx2.box* 0,8 kb ligiert.

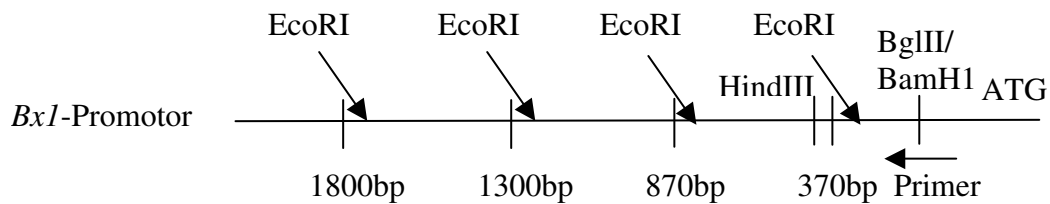


Abb. 3: Einführung der *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen mittels PCR in den *BX1*-Promotor. Über *EcoRI/BglIII* können die einzelnen Fragmente aus dem Promotor isoliert werden. Die verwendeten Primer sind in Tab. 6 angegeben.

2.7.1.2 *Igl*-Reportergenkonstrukte

Die bei Kortes (2003, S. 30) dargestellten Reportergenkonstrukte MID 3,7 kb, TA 0,7 kb, minimal 0,5 kb und no motive 0,36 kb wurden über Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten und über *EcoRI/HindIII* in den Vektor *pTF 102* (MID 3,7 kb, TA 0,7 kb) bzw. *pTF 101* (minimal 0,5 kb, no motive 0,36 kb) kloniert.

2.7.1.3 Konstrukte für den Goldpartikelbeschuss

Zur Klonierung des Ubi-GUS-Reportergenkonstruktes (6,2 kb) wurde das *Gus*-Gen (1,8 kb) aus dem Konstrukt Uni-GUS (Ohnhäuser, 2000) durch Restriktionsverdau mit *BamH1/KpnI* entfernt und in die Ubi-Kassette *pUBL.cas* ligiert. Die systematisch getesteten Konstrukte *p190T650* und *p2.1T650* sind bei Ohnhäuser (2000) beschrieben. Sämtliche Konstrukte für den Goldpartikelbeschuss wurden in das Plasmid *pUC 19* kloniert.

Da beim Beschuss der Mesokotyle nur beim Kontrollkonstrukt GUS-Expression auftrat, wurde das Intron, welches in den *Bx*-Gene *Bx2-Bx5* die gleiche Position hat (Frey et al., 1997), aus dem *Bx4*-Gen isoliert und als Enhancer in das *Gus*-Gen einkloniert.

Dazu wurden zunächst mittels PCR drei Fragmente hergestellt:

Mit Mis-Match-Primern wurde der GC-Gehalt der *Gus*-Sequenz um die Intron-Integrationsstelle (Pos. 1343 der *Gus*-Sequenz) unter Verwendung der Primer GusModProm und GusModTer modifiziert. Zusätzlich zu diesen Mis-Match-Primern wurde der Nco-Promotor-Primer (GusNco) und der EcoRI-Terminator-Primer (GusEco) verwendet, so dass der 5'- und der 3'-Teil des Gens amplifiziert wurde. Die Amplifikation von *Bx4* erfolgte mit den Primern Intron5' und Intron3', die diese Sequenz am 5'- und 3'-Ende je um 28 bp der 5'- und 3'-wärts der Integrationsstelle des Introns gelegenen *Gus*-Gensequenz verlängern. Es wurden je 25 Zyklen zur Amplifikation ausgeführt. Im folgenden Schritt wurde eine PCR mit dem 5'-Teil des Gens und mit dem verlängerten *Gus*-Intron-Fragment als Template/Primerpaar ausgeführt. Parallel wurde das 3'-Ende des *Gus*-Gens und des verlängerten *Gus*-Intron-Fragments amplifiziert. Im letzten Schritt wurden die auf diese Weise entstandenen 5'-*Gus*-Intronfragmente und 3'-*Gus*-Intronfragmente zusammen in die PCR eingesetzt (12 Zyklen). Das dabei entstehende Fragment wurde mit den NcoI-Promotor- und den EcoRI-Terminator-Primern nachamplifiziert (25 Zyklen) und das entstandene Fragment kloniert und sequenziert. Alle PCR-Ansätze wurden mit der Proof-Start-Taq-Polymerase ausgeführt. Ein PCR-bedingter nicht neutraler Basenaustausch im *Gus*-Gen wurde durch Klonierung von zwei wildtypischen Restriktionsfragmenten über die SspI-Schnittstelle beseitigt. Sämtliche verwendete Primer sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Für das Intron-Konstrukt P190T650-GUS-Intron wurde das GUS-Gen mit EcoRI/NcoI entfernt und das GUS-Gen mit Intron über EcoRI/NcoI inkloniert. Zur Erstellung von P2.1T650-GUS-Intron wurde das Promotorfragment von P190T650-GUS-Intron entfernt. Dazu wurde mit SacI verdaut, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet, anschließend mit NcoI geschnitten und nach alkalischer Phosphatasebehandlung das aus P2.1 (Ohnhäuser, 2000) über HincII/NcoI isolierte Promotorfragment inkloniert.

2.8 Transformation unreifer Maisembryonen mit *A. tumefaciens*

2.8.1 Anzucht der Spenderpflanzen

Bei der Maisanzucht gab es zu Beginn große Probleme, gesunde und kräftige Pflanzen zu erzielen. Es mussten Düngung, Wasserzufuhr und Lichtintensität angepasst werden, um die Hauptprobleme „whorl rot“ und „leaf burning“, zu starkes Streckungswachstum der

Pflanzen, sowie ein Befall mit Spinnmilben und Thripsen so weit als möglich einzudämmen und eine optimale Pflanzenqualität zu erzielen.

Samen der Hybridlinie „Hi-II“ (Iowa State University) wurden nach 1minütiger Sterilisation in 6 % Natriumhypochlorit und dreimaligem Waschen mit VE-Wasser für einen Tag in VE-Wasser gequollen und für weitere 2 Tage in Keimpapier bei 28 °C im Dunkeln angezogen, dann in Erde („Typ P“; Biesterfeld Scheibler Linssen GmbH & Co. KG, Hamburg) ausgelegt und mit Quarzsand bedeckt. Nach ca. 2 Wochen wurden sie in 121 Töpfe umgetopft. Eine zusätzliche Düngung mit Blaukorn erfolgte kurz vor dem Streckungswachstum und keinesfalls während der Pollenentwicklung. Der Gießrhythmus wurde so angepasst, dass Spenderpflanzen während der Pollen- und Kolbenentwicklung kontinuierlich mit Wasser versorgt wurden. Frisch umgetopfte und Jungpflanzen wurden händisch gegossen, um eine zu starke Wasserzufuhr bis zur Ausbildung eines kompletten Wurzelballens zu vermeiden. Eine relative Luftfeuchte von 60 % war optimal für die Pflanzenentwicklung und zur Vermeidung von Schädlingsbefall. Zur kontinuierlichen Aufrechterhaltung dieser Luftfeuchte, wurden wassergefüllte Wannen aufgestellt und die Tische mehrmals täglich mit Wasser besprüht. Zudem war eine hohe Luftfeuchte von mindestens 60 % Voraussetzung für eine erfolgreiche biologische Schädlingsbekämpfung mit Nützlingen. Gegen Spinnmilben und Thripse wurden verschiedene Raubmilbenarten (*Amblyseius bakeri* und *cucumeris*, *Phytoseiulus persimilis*) sowie Florfliegenlarven (*Chrysoperla carnea*) (Sautter & Stepper GmbH, Ammerbuch) eingesetzt, die in Zwei-Wochen-Abständen ausgebracht wurden. Dadurch wurde der Schädlingsbefall soweit eingedämmt, dass nur in seltenen akuten Fällen chemische Bekämpfungsmittel wie Lizetan[®] (Bayer CropScience GmbH, Langenfeld) ausgebracht werden mussten, gleichzeitig wurde die Pflanzenqualität nicht beeinträchtigt. Als optimal zeigte sich eine Temperatur von tagsüber 28 °C und nachts 21 °C. Die Anpassung der Lichtmenge erwies sich als bedeutendster Einflussfaktor auf die Pflanzenqualität. Optimal für die Anzucht von „Hi-II“ sind 230 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, die mit 400 W- und 1000 W-Lampen erzielt werden sollen (Maize Transformation Workshop, Iowa State University, 2003). Da nur 400 W- und 600 W- Lampen zur Verfügung standen, wurde durchschnittlich eine Lichtmenge von 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ erreicht. Obwohl Mais ganzjährig im Gewächshaus angebaut werden konnte, wurde eine optimale Qualität hauptsächlich in einem Zeitfenster von März bis Juni und September bis Oktober erzeugt. Von Juni bis August wurde der Anbau durch zu hohe Temperaturen und von Dezember bis Februar durch eine verringerte Lichtmenge

erschwert. Zur Gewinnung unreifer Embryonen wurden die Spenderpflanzen geselbstet und der Kolben bei einer Embryonengröße von 1,8-2,5 mm geerntet.

2.8.2 Isolierung unreifer Maisembryonen

Der geerntete Maiskolben wurde von den Hüllblättern befreit, auf eine Pinzette gespießt, 20 min. in 1,2 % Natriumhypochlorit unter häufigem Schwenken sterilisiert und anschließend dreimal 5 min. in sterilem VE-Wasser gewaschen. Die Maiskörner wurden einzeln vom Kolben entfernt und die Embryonen unter dem Binokular steril isoliert und in Eppendorf-Gefäßen mit steriler Infektionslösung gesammelt.

2.8.3 Vorkultur, Anzucht und Inkubation mit *A. tumefaciens*

Zur Maistransformation wurde der supervirulente *A. tumefaciens*-Stamm EHA 101 (Hood et al., 1986) verwendet. Die Vorkultur und Anzucht der Bakterien erfolgte wie in „3.1.3 Optimiertes Protokoll der Maistransformation mit *A. tumefaciens*“ beschrieben. Zur Inkubation wurden ca. 100 Embryonen in Eppendorf-Gefäßen mit Bakteriensuspension überschichtet, 20 Mal durch Invertieren durchmischt und 5 min. inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen entweder mitsamt der Suspension auf Kokultur-Medium geschüttet, die Suspension abpipettiert und mit sterilem Küchenkrepp abgetupft, oder sie wurden mit der Suspension auf steriles Filterpapier geschüttet und einzeln auf Kokultur-Medium überführt. Mit „Filterpapier“ wurde eine verbesserte Typ II- Kallusbildung in der Ruhe-Phase beobachtet und insgesamt durch zusätzliches Entfernen der *Agrobacterien*-Suspension eine erhöhte Anzahl an Linien („Filterpapier“: 6 Linien von 9 Versuchen (67 %); „Abtupfen“: 20 Linien von 35 Versuchen (57 %)). Die anschließende Gewebekultur mit den Methoden zur Ausbildung von Typ II-Kallus, Selektion transgenen Gewebes, sowie die Regeneration sind in „3.1.3 Optimiertes Protokoll für die Maistransformation mit *A. tumefaciens*“ erläutert.

Für die Regeneration wurden ausschließlich hohe Petrischalen verwendet, um eine bessere Belüftung zu gewährleisten. Diese wurden mit Nescofilm verschlossen, weil bei der Verwendung von Leucopore tape die reifenden somatischen Embryonen verkümmerten. Bei der Verwendung von Nescofilm musste entstehendes Kondenswasser am Deckel regelmäßig entfernt werden.

2.8.4 Aufzucht transgener Pflanzen

Transgene wurden nach Umtopfen in Erde zunächst in der Pflanzenkammer bei einer Lichtintensität von $300 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, $22 \text{ }^\circ\text{C}$ und 16 h Photoperiode kultiviert. Nach vollständiger Ausbildung des Wurzelballens wurden sie in 5 l Töpfe umgetopft und im Gewächshaus weiterkultiviert. Transgene wurden entweder geselbstet oder auf den WT „Hi-II“ ausgekreuzt. Pro Linie wurden 4-10 Keimlinge bewurzelt. Die Pflanzen werden als Geschwister- T_0 -Pflanzen bezeichnet. Jedem geernteten Kolben wurde eine Accession-Nummer (Ac.-Nr.) zugeschrieben.

2.8.5 Nachweis des T-DNA-Transfers über die BASTA-Resistenz

Voll entfaltete Blätter wurden in eine 0,2 %ige BASTA-Lösung (Herbizid BASTA[®] (Hoechst, Frankfurt), mit VE-Wasser verdünnt und 1 Tropfen Tween gemischt) getaucht und die Reaktion mit der einer Kontrolle (WT-Pflanzen „Hi-II“) verglichen (Abb. 4). Für Segregationsanalysen mit mehreren Pflanzen wurde die BASTA-Lösung auf die gesamte Pflanze aufgesprüht. Die Auswertung erfolgte in der Regel nach 5 Tagen Inkubation.



Abb. 4: BASTA-Resistenztest bei Blättern
Links: Blatt einer nicht-transgenen Pflanze; rechts: Blatt einer Transgenen
Die Blätter wurden bis zur Markierung in BASTA-Lösung getaucht.

2.9 Histochemische Analyse der Transgenen

2.9.1 Analyse der β -Glucuronidase-Expression

Die durch das *Gus*-Reportergen vermittelte β -Glucuronidase-Aktivität wurden nach Inkubation verschiedener Gewebe in X-Gluc-Lösung bestimmt. Dazu wurden die Gewebe mit der Lösung überschichtet, vakuuminfiltiert und über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Eventuell vorhandenes Chlorophyll wurde durch Inkubation in 70 % Ethanol entfernt. Die entstandene Blaufärbung wurde unter dem Binokular ausgewertet.

2.9.2 Benzoxazinon-Färbung mit Eisen(III)-Chlorid

Der Nachweis von DIBOA und DIMBOA in Maiskeimlingen erfolgte über Färbung mit Eisen(III)-Chlorid (FeCl_3) (Simcox und Weber 1985; Iwamura, 1996).

2.10 Goldpartikelbeschuss als transientes Expressionssystem

2.10.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

Es wurden die Maislinien LG 22.44 (Limagrain Nickerson, Frankreich) und B73 verwendet. Blattmaterial wurde von 7-8 Tage alten, ethylierten Maispflanzen abgeschnitten, die Blattunterseite von der Epidermis befreit („gestrippt“) und für 3 Stunden in Osmotischen Puffer gelegt. Für den Beschuss wurden die Blattstücke mit der Blattoberseite auf 1/2 MS-Medium gelegt und beschossen. Mesokotyle wurden von 4 Tage alten Keimlingen geerntet, halbiert, mit der Schnittfläche nach oben auf 1/2 MS-Medium gelegt und beschossen. Nach dem Beschuss wurden diese zum Schutz vor Austrocknung mit der Schnittfläche auf das Medium gelegt.

2.10.2 Goldpräparation und Beladen (nach Heiser, EG Bulletin 1688, Bio-Rad)

Goldpräparation für 12 Schuss bei 50 μl /Schuss:

Es werden 6 mg Gold in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eingewogen, 500 μl 70 % Ethanol zugegeben, 3-5 min. gevortext und anschließend 15 min. inkubiert. Nach 5 sec. Zentrifugieren wird der Überstand abgenommen. Zum Pellet wird 500 μl steriles VE-Wasser zugegeben, 1 min. gevortext, 1 min. inkubiert, 2 sec. zentrifugiert und dann der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Zum Schluss werden 100 μl steriles 50 %iges Glycerol zugegeben. Das Gold kann bei Raumtemperatur gelagert werden und sollte innerhalb von 2 Wochen verbraucht werden.

Beladen der Goldpartikel (für 6 Schuss):

Die Glycerol-Stammlösung wird 5 min. gevortext und dann ein Aliquot von 50 μl in eine Eppendorf-Gefäß entnommen. Unter beständigem Vortexen werden 5 μl DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 50 μl CaCl_2 (2,5 M) und 20 μl Spermidin (0,1 M) zugegeben und alles 2-3 min. gevortext. Nach 1min. Inkubation wird 2 sec. zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird erst mit 140 μl 70 %igem Ethanol, dann mit 140 μl 100 %igem Ethanol gewaschen, ohne das Pellet zu zerstören. Das gewaschene Pellet wird in 48 μl 100 %igem

Ethanol vorsichtig resuspendiert und 2-3 sec. langsam gevortext. Pro Schuss werden 6 μ l Suspension eingesetzt.

2.10.3 Durchführung des Beschusses

Der Beschuss erfolgt mit dem Biolistic[®] PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad, USA) gemäß dem Instruction Manual von Bio-Rad.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Transformation von Mais mit *A. tumefaciens*

Die Transformation von Mais mittels *A. tumefaciens* ermöglicht die Erzeugung fertiler transgener Pflanzen, welche übertragene Gene stabil exprimieren. Ein Vorteil dieser Methode ist die Übertragung weniger DNA-Kopien im Vergleich zum Goldbeschuss mit der Partikelkanone oder der Elektroporation (Spencer et al., 1992; Lupotto et al., 1998; Conti et al., 2003). Die Analyse kann sowohl in der T₀- als auch in den Folgegenerationen stattfinden (Frame et al., 2002).

3.1.1 Optimierung der transienten Expression

Voraussetzung für eine effiziente stabile Transformation ist eine gute transiente Expression (Frame et al., 2002). Diese wird 5-6 Tage nach der Infektion bestimmt (Abb. 5). Wichtige Kriterien für die transiente Expression sind die Zahl der transformierten Zellen und das transformierte Gewebe. Es hat sich gezeigt, dass der basale Bereich des Skutellums die höchste Potenz zur Bildung regenerationsfähigen Typ II-Kallus hat. Es muss also versucht werden, in diesem Bereich viele Transformationsereignisse zu erzielen, da hier die größte Wahrscheinlichkeit besteht, dass aus einem transienten Ereignis eine stabile Transformation entsteht. Das Muster und die Stärke der transienten Transformation wird mit Hilfe der GUS-Gen-Expression des Kontroll-Ti-Plasmids TF102 bestimmt (Frame et al., 2002).

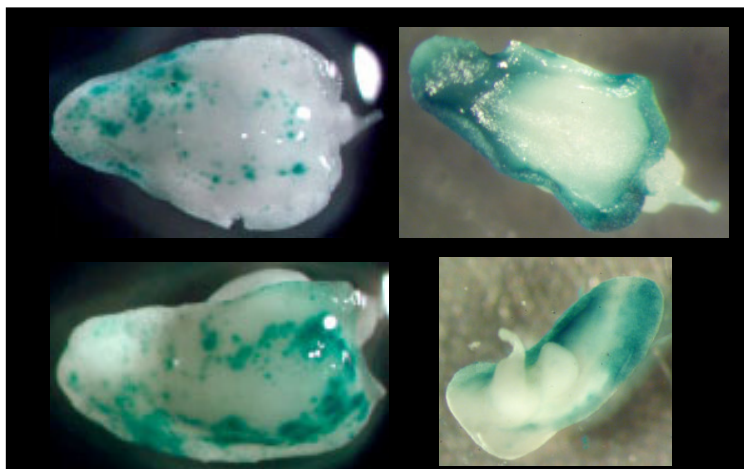


Abb. 5: Transiente GUS-Expression bei unreifen Embryonen 5 Tage nach Infektion

Faktoren, welche die transiente Expression beeinflussen sind die Cystein- und Salzkonzentration, der pH-Wert, der Zusatz von Acetosyringon, die *Agrobacterien*-Konzentration und -Aktivität, sowie zusätzliche antinekrotische Substanzen und die Kokultur-Temperatur. Sehr gute Expressionsraten (85-99 % Expression, davon 61-92 % im basalen Bereich des Skutellums; Versuche 58, 59, 66, 105, 107/2, 109, 139, 140, 143, 145, 149) wurden bei Einsatz einer Bakterienkonzentration von OD_{550nm} 0,3-0,6 und Embryonen einer Größe von 1,2-3,0 mm erzielt (Anhang Tab. 4).

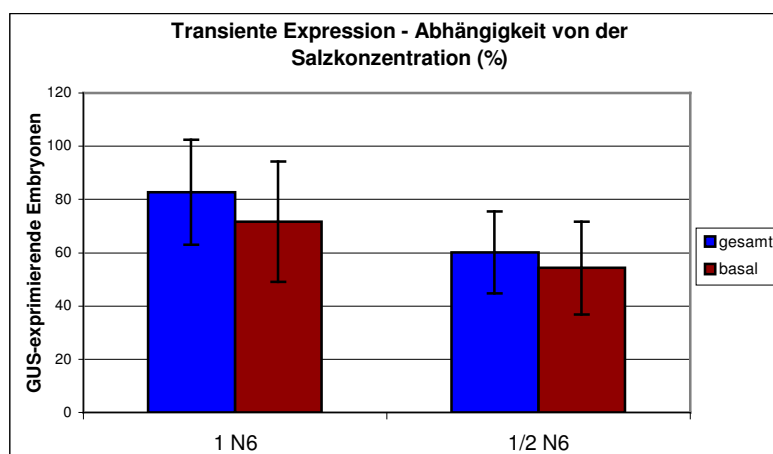


Abb. 6: Anteil transient transformierter Embryonen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

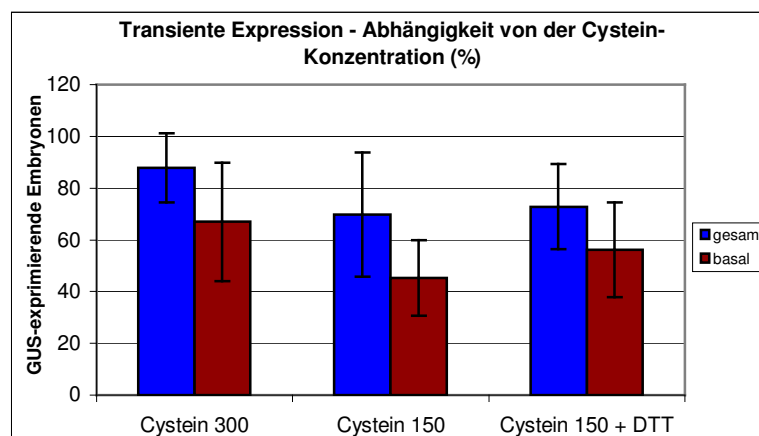


Abb. 7: Anteil transient transformierter Embryonen in Abhängigkeit von der Cystein-Konzentration

Die Temperatur während der Kokultur lag bei 21-28 °C und das Alter des Mediums bei 0-5 Tagen. Der pH-Wert des Mediums betrug 5,8 und es waren Cystein-Konzentrationen von 150 mg/l und 300 mg/l effizient. Der Zusatz von DTT hatte keinen Einfluss auf die Höhe der transienten Expression, ebenso wie der Salzgehalt des Mediums (Abb. 6). Wesentlich wurde der Transformationserfolg durch den pH-Wert des Mediums beeinflusst (Abb. 8).

Sowohl die gesamte Transformationsrate als auch der Anteil des transformierten basalen Skutellums lag bei pH 5,8 am höchsten. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei pH 5,8 die *Agrobacterien* die höchsten Wachstumsraten aufwiesen (Abb. 9), also am vitalsten waren.

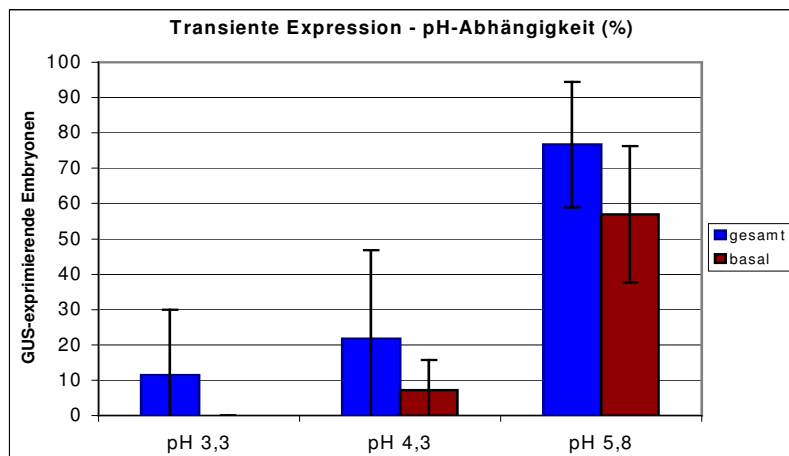


Abb. 8: Anteil transient transformierter Embryonen in Abhängigkeit vom pH-Wert

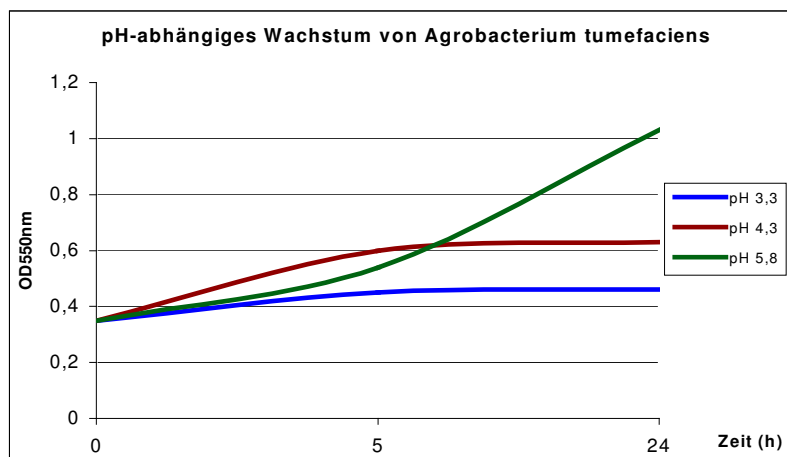


Abb. 9: pH-abhängiges Wachstum von *Agrobacterium tumefaciens*

Sowohl mit 150 mg/l Cystein als auch mit 300 mg/l Cystein im Kokultur-Medium wurden hohe transiente Raten erzielt. Auch die Zugabe von 1 mM DTT hatte für den transienten Ansatz nur geringe Auswirkungen (150 mg/l Cystein + DTT; Abb. 7). Für die stabile Transformation erwies sich der Einsatz einer geringen Cystein-Konzentration (150 mg/l) in Verbindung mit DTT (1 mM) als vorteilhaft.

3.1.2 Etablierung der stabilen Transformation

Ausgangspunkt für diese Versuche war das Protokoll von Frame et al. (2002) für die Transformation der Maislinie „Hi-II“ mit *Agrobacterium tumefaciens*. Es zeigte sich, dass mit dieser Vorschrift unter den gegebenen Bedingungen keine Produktion transgener Pflanzen möglich war und somit die Methode für die Bedingungen am Lehrstuhl neu etabliert werden mussten.

3.1.2.1 Pflanzenqualität und Embryonengröße

Die Qualität der Spenderpflanzen ist einer der entscheidenden Faktoren mit einem großen Einfluss auf die Effizienz der stabilen Transformation (Carvalho et al., 2004; Lu et al., 1983). Als Spenderpflanzen wurde die Hybrid-Linie „Hi-II“ ausgewählt, da sie sich aufgrund guter Wachstumseigenschaften und hervorragender Anpassung an Gewebekulturbedingungen sehr gut für die Transformation mit *Agrobacterium* eignet (Armstrong et al., 1991; Frame et al., 2002). Für die Optimierung der Anzuchtbedingungen im Gewächshaus stellten sich mehrere Faktoren als entscheidend heraus. Dazu gehören Luftfeuchte, Wasserbedarf, Düngung, Temperatur, Lichtmenge sowie Samenqualität. Die Anzuchtbedingungen werden in „2.8.1 Anzucht der Spenderpflanzen“ beschrieben.

Die Anzuchtbedingungen der Spenderpflanzen beeinflussen ganz erheblich die Qualität der zu transformierenden Embryonen (Carvalho et al., 2004). Ein Ausdruck dafür ist die Zeitdauer, welche die Embryonen ab dem Tag der Pollinierung benötigen, um die zur Transformation optimale Größe zu erreichen (Ishida et al., 1996). Diese Zeitspanne betrug im Sommer etwa 9 bis 10 Tage und im Winter 12 bis 14 Tage. Wurde diese deutlich überschritten (mehr als 15 Tage), führte dies zu einer verminderten Kallusbildung und Stagnation der Embryonen in der Gewebekultur. Die optimale Embryonengröße für die Transformation wird im Protokoll nach Frame et al. (2002) mit 1,5-2,0 mm angegeben. Es stellte sich im Verlauf der Versuche heraus, dass grundsätzlich eine Embryonengröße von 1,8-2,5 mm optimal war.

3.1.2.2 Inkubation mit *A. tumefaciens* und Entfernung der Suspension

Bei der Verwendung von *Agrobacterien* zur Transformation sind verschiedene Faktoren zu beachten (Vorkultur, Anzucht der Bakterien, Bakterienkonzentration, Entfernen überschüssiger Bakteriensuspension). Entscheidend für die Transformation ist die

Konzentration der eingesetzten Bakterien. Laut Frame et al. (2002) soll eine Konzentration von OD_{550nm} 0,35-0,45 verwendet werden. Als optimal erwies sich eine Konzentration von OD_{550nm} 0,2-0,3 und maximal bis 0,5 (siehe „3.1.1 Optimierung der transienten Expression“).

Ein weiterer entscheidender Einflussfaktor bei der *Agrobacterien*-vermittelten Transformation ist die Entfernung der Bakteriensuspension vom Medium nach der Inkubation der Embryonen. Verbleiben zu viele Bakterien an den Explantaten, kommt es zu Nekrosen. Dieses Problem wurde durch eine zusätzliche Entfernung der *Agrobacterien*-Suspension vermindert. Zum einen wurde die überschüssige Suspension nach dem Abpipettieren zusätzlich mit sterilem Küchenkrepp vom Medium abgetupft, zum anderen wurden die Embryonen nach der Inkubation mit der Suspension auf steriles Filterpapier geschüttet und dann einzeln auf das Medium überführt. Durch diese Maßnahmen wurde der Erfolg der Transformation gesteigert.

3.1.2.3 Bestimmung geeigneter Gewebekultur-Bedingungen

Als Antibiotikum zur Kontrolle der *Agrobacterien* wurde zunächst 250 mg/l Cefotaxim verwendet. Dieses Antibiotikum wird auch im Protokoll nach Frame et al. (2002) empfohlen. Bis Versuch 77 (Anhang Tab. 5) wurde ausschließlich mit Cefotaxim gearbeitet. Aufgrund mangelnder Erfolge wurde in den Versuchen 78-80 150 mg/l Timentin als alternatives Antibiotikum verwendet (Lupotto et al., 1998; Carvalho et al., 2004). Im Versuch 81 fand ein direkter Vergleich zwischen Cefotaxim und Timentin bei Subkultur auf Ruhe-Medium, auf Selektions-Medium I (SI-Medium) und auf Selektions-Medium II (SII-Medium) statt (Tab. 6).

Mit Cefotaxim bildeten im Vergleich zu Timentin sehr wenige Embryonen Kalli, die zudem nach einiger Zeit stark verbräunten. Außerdem wurde nach 4-6 Wochen ein Durchbrechen der *Agrobacterien* gefolgt von starkem Wachstum auf Medium mit Cefotaxim beobachtet. Bei Verwendung von Timentin erfolgte kein weiteres Bakterienwachstum auf dem Medium und die entstehenden Kalli waren heller, zeigten weniger Nekrosen und deutliches ausgeprägtes Wachstum.

Tab. 6: Einfluss von Cefotaxim und Timentin auf die Kallusproliferation und die Kontrolle des *Agrobacterien*-Wachstums

Kulturbedingungen	Cefotaxim	Timentin
Ruhe-Medium (4 Wochen)	Kalli gelb, z. T. nekrotisch, beginnendes <i>Agrobacterien</i> -Wachstum	Kalli weiß-gelb, wenige Nekrosen, kein <i>Agrobacterien</i> -Wachstum
SI-Medium (1 Wo. Ruhe-, 3 Wo. SI-Medium)	Kalli gelb-braun, nekrotisch, <i>Agrobacterien</i> -Wachstum	Kalli gelb, z. T. nekrotisch, kein <i>Agrobacterien</i> -Wachstum
SII-Medium (1 Wo. Ruhe-, 2 Wo. SI-, 1 Wo. SII-Medium)	Kalli gelb-braun, z. T. starke Nekrosen, starkes <i>Agrobacterien</i> -Wachstum	Kalli gelb bis gelb-braun, nekrotisch, kein <i>Agrobacterien</i> -Wachstum

Unreife infizierte Embryonen wurden nach der Kokultur wie angegeben auf die verschiedenen Medien umgesetzt. Die Bonitierung erfolgte 4 Wochen nach Transformation.

Aufgrund der in diesem Versuch deutlich erkennbaren Vorteile von Timentin in der Gewebekultur im Vergleich zu Cefotaxim wurde die Verwendung von Timentin ab Versuch 82 beibehalten.

Wie bereits in „3.1.1 Optimierung der transienten Expression“ erwähnt, hat der pH-Wert großen Einfluss auf die transiente Expression. Auch bei der stabilen Transformation spielt er eine große Rolle während der Kokultur, da ein tiefer pH-Wert das *Agrobacterien*-Wachstum bzw. deren Aktivität hemmt. Aufgrund der sehr guten transienten Expression bei wiederholter Verwendung von pH 5,8 unter veränderten Kulturbedingungen (Versuch 105) wurde auch in der stabilen Transformation der pH-Wert auf 5,8 erhöht. Zusammen mit Veränderung anderer Faktoren wie zusätzlicher Entfernung der *Agrobacterien*-Suspension nach der Inkubation und Verwendung einer Bakterienkonzentration bis maximal OD_{550nm} 0,5 wurde das Wachstum der *Agrobacterien* auf dem Medium weitestgehend vermieden und die Entwicklung transgener Kalli gefördert.

Neben Cystein können auch Ascorbinsäure und DTT als antinekrotische bzw. antioxidativ wirksame Substanzen dem Kokultur-Medium zugegeben werden, um die Abwehrreaktion des Gewebes auf die Infektion mit *A. tumefaciens* abzuschwächen. In der Gewebekultur wurde eine deutliche Verringerung der Nekrosenbildung beobachtet. Die Verwendung von DTT hatte einen eindeutig positiven Einfluss auf die stabile Transformation. Ab Versuch 110 wurde dem Medium 1 mM DTT zugegeben. In einer Versuchsreihe (Versuche 110 bis 141) wurden bei 17 Versuchen insgesamt 50 Linien isoliert, die Transformationsrate lag

dabei im Durchschnitt bei 1,0 %. In der anschließenden Versuchsreihe (Versuche 142 bis 157) wurden insgesamt 32 Linien isoliert (Transformationsrate 2,2 %). Zur Erhöhung der Transformationsrate in der zweiten Versuchsreihe trug die zusätzliche Entfernung der Bakteriensuspension bei. Die deutliche Steigerung der Transformationsrate zum Ende der Versuchsreihe ist aber das Ergebnis veränderter Selektion und Gewebekulturtechniken (siehe „3.1.2.4 Selektion transgener Zellen und Gewinnung eines Klonen“ und „3.1.2.5 Regeneration transgener Pflanzen“).

Verschiedene Verfestigungsstoffe im Medium stellen den Explantaten unterschiedlich viel Wasser, Nährstoffe und Antibiotika zur Verfügung. Da in den aufeinanderfolgenden Phasen der Gewebekultur diese Faktoren unterschiedlich große Bedeutung haben, wurden die Verfestigungsstoffe in der Kokultur, der Ruhe-Phase und der Selektion variiert. Im Verlauf der Versuche hat sich die Verwendung von Gelrite im Kokultur- und Ruhe-Medium als günstig erwiesen, in den Selektions-Phasen trug sie jedoch zu einem gesteigerten Bakterienwachstum bei. Aus diesem Grund wurde in der SI- und SII-Phase Phytoagar verwendet (ab Versuch 78). In den Regenerations-Phasen wurde durchgehend Gelrite (nach Protokoll von Frame et al., 2002) verwendet.

Die Regulation des Wasserhaushaltes war in der Gewebekultur, besonders während der Kokultur, wichtig. Optimale Bedingungen wurden durch Verwendung von Leucopore tape, z. T. im Wechsel mit Nescofilm, geschaffen (siehe „3.1.3 Optimiertes Protokoll für die Maistransformation mit *A. tumefaciens*“).

Die Temperatur während der Kokultur-Phase beeinflusst den T-DNA-Transfer von *A. tumefaciens* in die Pflanzenzelle (Akula et al., 2001). Zunächst wurde die Kokultur bei 18 °C oder 24 °C durchgeführt. Akula et al. (2001) berichten, dass die höchste Effizienz der T-DNA-Übertragung bei 20-22 °C auftritt. Ab Versuch 56 erfolgte eine Absenkung der Temperatur auf 21 °C während der Kokultur und wurde bei allen folgenden Versuchen beibehalten. Dieser Wert liegt damit im unteren Bereich der bei Frame et al. (2002) genannten Temperatur von 20-23 °C.

3.1.2.4 Selektion transgener Zellen und Gewinnung eines Klonen

Der Bialaphos-Konzentration zur Selektion transgener Kalli wird in der Gewebekultur eine große Bedeutung beigemessen (Gordon-Kamm et al., 1990; Spencer et al., 1990). Es stellte

sich im Verlauf der Versuche heraus, dass die Schwierigkeit darin bestand, die Konzentration so anzupassen, dass keine nicht-transgenen Zellen überleben, aber transformierte Zellen nicht zu stark geschädigt werden. Nach Frame et al. (2002) werden die transformierten Embryonen nach der Kokultur zur Kallusbildung auf Ruhe-Medium umgesetzt. Nach 4-7 Tagen bzw. wenn beginnende Typ II-Kallusbildung an der Skutellumbasis auftritt (Frame et al., 2000), erfolgt eine zweiwöchige Selektionsphase auf SI-Medium mit 1,5 mg/l Bialaphos und anschließend mehrere zweiwöchige SII-Subkulturschritte mit 3,0 mg/l Bialaphos. Nach der dritten bis vierten Subkultur auf SII-Medium entsteht aus dem chimären, präembryogenen Typ II-Kallus ein weißer, schnell wachsender Kallus, der sich deutlich vom umgebenden, stagnierenden, nekrotischen Gewebe abhebt. Dieses proliferierende Gewebe begründet einen transgenen Klon und wird ab einer Größe von ca. 1 cm im Durchmesser und mit deutlich ausgebildeten, unreifen somatischen Embryonen (Frame et al., 2000) isoliert. Diese späte und direkte Isolierung des regenerationsfähigen Gewebes erwies sich jedoch in allen Versuchen als nachteilig, da die entstandenen Typ II-Kalli und putativen Klone bereits vor Erreichen von 1 cm im Durchmesser verbräunten und abstarben, wenn sie nicht vom umgebenden Gewebe getrennt wurden (Versuche 1-108).

Aus diesem Grund wurde der entstandene präembryogene Typ II-Kallus zunächst ab der ersten Subkultur in der SII-Phase isoliert (Versuche 110-141). Später erfolgte eine Isolierung bereits nach der SI-Phase, wenn das Gewebe nach der Transformation großer Embryonen (bis 3,0 mm) durch phenolische Komponenten des rasch verbräunenden, restlichen Gewebes geschädigt wurde. In den Versuchen 142-157 wurden sämtliche Klone nach dieser Methode isoliert und die Transformationsrate lag dabei wesentlich höher (2,2 %), als bei den vorherigen Versuchen (1,0 % bei Versuchen 110-141).

Der isolierte Typ II-Kallus wurde auf SI-Medium mit 1,5 mg/l Bialaphos über 3-8 Subkulturschritte bis zur Entstehung eines schnell wachsenden Klons mit Ansätzen unreifer somatischer Embryonen kultiviert. Diese geringere Selektion wurde gewählt, da es sich um kleine, gut zugängliche Kalli handelte und die Selektion ausreichend war, um nicht-transformierte Zellen in ihrer Entwicklung zu hemmen (>99 % der regenerierten Pflanzen sind laut BASTA-Test transgen). Wenn der entstehende Klon deutlich ausgeprägtes Wachstum, eine Größe von ca. 0,5 cm und weiße Farbe zeigte, wurde er vom übrigen Gewebe getrennt und in eine separate Petrischale auf SI-Medium mit 1,5 mg/l Bialaphos

gesetzt. Bei einer Größe von mehreren Zentimetern und den Ansätzen unreifer Embryonen (nach ca. 2 Subkulturschritten) erfolgte eine Regeneration der entstandenen Linie.

Es wurde festgestellt, dass es essentiell war, nach dieser Isolierung proliferierenden Gewebes dieses in den zwei folgenden Subkulturschritten schnell und vollständig von abgestorbenen, nekrotischen Zellen zu befreien. Andernfalls führten freigesetzte phenolische Komponenten zu einer Vergiftung der transgenen Zellen und damit zu deren Absterben. Die frühe Isolierung des präembryogenen Typ II-Kallus und dessen Säuberung während der Subkultur, trugen wesentlich zur Erhöhung der Transformations-Effizienz bei.

3.1.2.5 Regeneration transgener Pflanzen

Die Regeneration von Pflanzen aus entstandenen Linien erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde der von nekrotischen Bereichen gesäuberte, schnell wachsende mehrere Zentimeter große Klon mit Ansätzen unreifer somatischer Embryonen geteilt und auf hormonfreiem Regenerations-Medium I (RI-Medium) kultiviert. Das bis hierher dem Medium hinzugefügte Phytohormon Auxin ist nur in der Initialphase der somatischen Embryogenese notwendig und hemmt später die Bildung der somatischen Embryonen (Frame et al., 2000). Es musste darauf geachtet werden, den Klon auch während der Regeneration kontinuierlich zu teilen. Bei zu später Teilung kam es zum Absterben ganzer Gewebebereiche an der Oberfläche, die nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt wurden. Sehr wichtig in dieser Phase war auch hier die ständige Säuberung des Gewebes von abgestorbenen Zellen.

Während der RI-Phase auf Medium mit hohem Zuckergehalt erfolgt eine Selektion mit 0-3 mg/l Bialaphos (Frame et al., 2000). Nach Optimierung der Gewebekulturbedingungen erwies sich eine Selektion mit 1,5 mg/l Bialaphos als optimal. Es entwickelten sich bei fast allen Klonen somatische Embryonen und es traten nur vereinzelt Nekrosen auf. Beim späteren BASTA-Test waren fast alle Pflanzen (>99 %) transgen.

Frühestens nach zwei Wochen bildeten sich in dieser Phase reife somatische Embryonen, die nach Erreichen einer bestimmten Struktur, Farbe und Größe (Abb. 11) einzeln auf Regenerations-Medium II (RII-Medium) überführt wurden. In der RII-Phase bildeten die entstehenden Keimlinge Wurzeln aus und wurden dann in Magentaboxen überführt. Nach

ausreichender Wurzelbildung wurden sie in Erde getopft und in der Pflanzenkammer angezogen.

Wie in der Kokultur-Phase kommt der Luftfeuchte während der Regeneration eine große Bedeutung zu (Frame et al., 2000). Die Verwendung hoher Petrischalen und Nescofilm erwiesen sich als optimal. Das Hauptproblem bei der Regeneration war wiederum die vollständige Säuberung des Materials von nekrotischem Gewebe und der richtige Zeitpunkt des Transfers eines Klons auf Regenerationsmedium, da sich dieser nicht weiter entwickelte, wenn er noch nicht in ausreichendem Maße Ansätze unreifer somatischer Embryonen ausgebildet hatte.

3.1.3 Optimiertes Protokoll für die Maistransformation mit *A. tumefaciens*

Für die Transformation werden Embryonen der Maislinie „Hi-II“ in einer Größe von 1,8-2,5 mm, maximal bis 3,0 mm, etwa 9-10 Tage (Sommer) bzw. 12-14 Tage (Winter) nach der Pollinierung der Maispflanze steril isoliert.

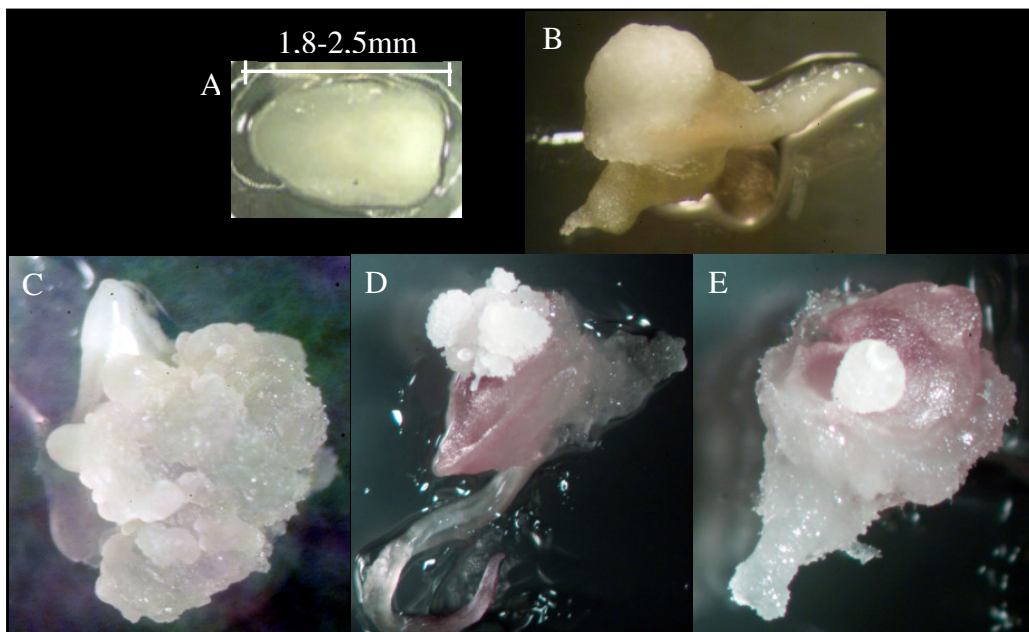


Abb. 10: Bildung von Typ II-Kallus in der Gewebekultur
A: unreifer Embryo; B: Kallusbildung am Embryo in Ruhe-Phase
C: optimale Struktur und Farbe des Typ II-Kallus für Isolierung
D und E: zu alter Typ II-Kallus, bildet zu früh somatische Embryonen
bzw. geht in Kugelstruktur über

Die *Agrobacterien* werden bei 21 °C über 2-5 Tage vorkultiviert und anschließend für die Infektion in Infektionslösung suspendiert (2 volle Loops auf 10 ml Lösung) und bei 23-24 °C und 75-90 rpm mehrere Stunden inkubiert. Die für die Infektion verwendete Bakterienkonzentration beträgt OD_{550nm} 0,2-0,5. Nach der Inkubation der Embryonen in der Bakteriensuspension (5 min.) wird die überschüssige Suspension durch „Abtupfen“ oder „Filterpapier“ entfernt. Die Kokultur wird auf Kokultur-Medium mit pH 5,8, 150 mg/l Cystein, 1 mM DTT und Gelrite durchgeführt und die Petrischalen mit Leucopore tape verschlossen. Die Temperatur während der 2-3tägigen Kokultur im Dunkeln beträgt 21 °C (Abb. 10).

Die Ruhe-Phase erfolgt auf Ruhe-Medium mit Gelrite und Timentin als Antibiotikum, die Petrischalen werden für 2 Tage mit Leucopore tape verschlossen, danach wird wieder mit Nescofilm abgeschlossen. Die Dauer der Ruhe-Phase wird an die Größe bzw. Qualität der Embryonen angepasst, bis Abschluss der Kallusbildung 7-14 Tage. Inkubiert wird bei 28 °C im Dunkeln (Abb. 10).

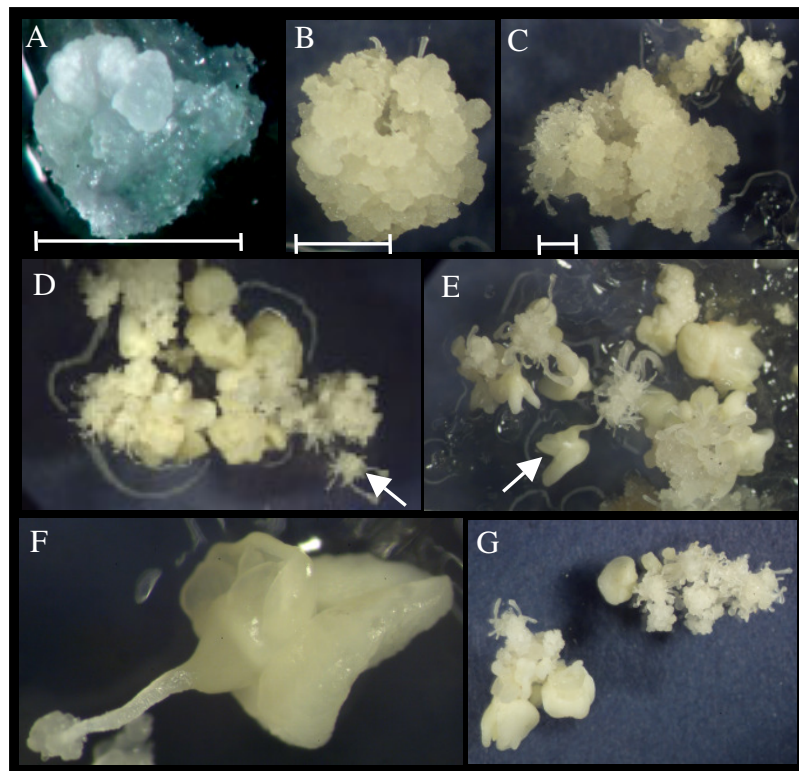


Abb. 11: Bildung somatischer Embryonen in der Gewebekultur
 A: Typ II-Kallus direkt nach Isolierung (Balken sind je 0,5 cm lang)
 B: Entwicklung eines Klons mit Ansätzen unreifer somatischer Embryonen
 C: Wachstum des Klons mit unreifen somatischen Embryonen
 D, E und G: unreife und reife somatische Embryonen, Pfeile deuten auf unreife (D) und reife (E) somatische Embryonen
 F: reifer somatischer Embryo, in dieser Phase 0,2-0,5 cm groß

Zur Selektion werden die Kalli anschließend auf SI-Medium mit 1,5 mg/l Bialaphos und Phytoagar überführt und bei 28 °C im Dunkeln kultiviert. Entstehende Typ II-Kalli werden bereits sehr früh (nach 1-2 Wochen Selektion) vom übrigen Gewebe isoliert (Abb. 10, 11). Der isolierte Typ II-Kallus wird so lange auf SI-Medium mit 1,5 mg/l Bialaphos subkultiviert und dabei regelmäßig von nekrotischen Gewebe gesäubert, bis sich ein unter Selektion schnell wachsender Kallus (Klon) entwickelt (3-8 Subkulturschritte). Ein entstehender Klon ist in erster Linie an seiner weißen Farbe zu erkennen. Er verbräunt nicht und zeigt starkes Wachstum. Wenn dieser Klon nach etwa zwei Subkulturschritten Ansätze unreifer somatischer Embryonen zeigt, erfolgt die Regeneration der entstandenen Linie (Abb. 11).

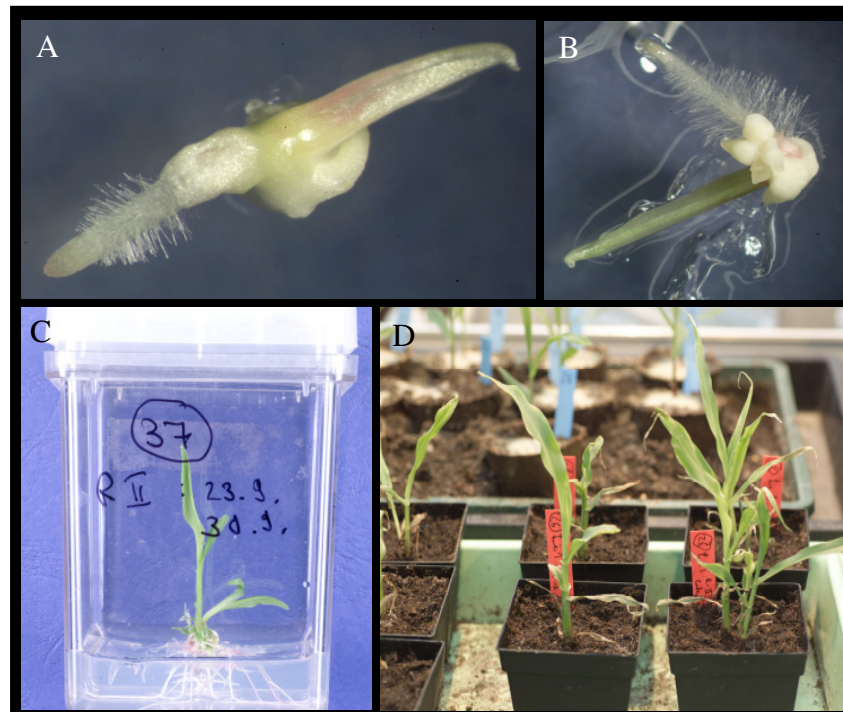


Abb. 12: Regeneration transgener Pflanzen
 A und B: transgene Keimlinge auf RII-Medium
 C: transgener Keimling in Magentabox
 D: transgene Pflanzen im Gewächshaus

Zur Regeneration werden kleine Stücke des Kallus auf hormonfreiem RI-Medium in hohen Petrischalen mit hohem Zuckergehalt, 1,5 mg/l Bialaphos und Gelrite verteilt und bei 25 °C kultiviert. Der Kallus muss regelmäßig geteilt und von nekrotischem Gewebe gesäubert werden. Aus den unreifen somatischen Embryonen entwickeln sich frühestens nach zwei Wochen reife somatische Embryonen. Diese werden nach Erreichen einer bestimmten Struktur (harte Oberfläche, mit Furchung in der Mitte), Farbe (glasig-weiß bis rosa oder grünlich) und Größe (0,2-0,5 mm) einzeln auf RII-Medium gesetzt (Abb. 11). Die RII-

Phase erfolgt ebenfalls in hohen Petrischalen bei Licht ($80 \mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$), $22 \text{ }^\circ\text{C}$ und 16 h Photoperiode. Nach Wurzelbildung der entstehenden Keimlinge werden diese in Magentaboxen auf RII-Medium umgesetzt und bis zur ausreichenden Bewurzelung kultiviert (Abb. 12). Anschließend werden sie in Erde überführt und zunächst in der Pflanzenkammer ($300 \mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$, $22 \text{ }^\circ\text{C}$, 16 h Photoperiode) und später im Gewächshaus angezogen.

In Tab. 7 (Anhang) ist eine Zusammenfassung aller Versuche mit erzielten Transformations- und Regenerationsraten dargestellt.

3.2 Analyse der transgenen Pflanzen

Mittels stabiler Transformation wurden insgesamt 56 transgene Pflanzenlinien aus 157 Experimenten regeneriert. Es wurden *Bx1*-, *Bx2*- und *Igl*-Promotorkonstrukte transformiert (Tab. 8).

Tab. 8: Eingesetzte Promotor-GUS-Konstrukte und Ergebnis der Transformationsversuche

Promotorsequenz	Isolierung transgener Klone	transgene Pflanzen im Gewächshaus: Zahl der Linien
<i>Bx1</i> /370bp	+	0
<i>Bx1</i> /870bp	+	6
<i>Bx1</i> /1,3kb	+	7
<i>Bx1</i> /1,8kb	+	3
<i>Bx2</i> .box 0,6kb	+	3
<i>Bx2</i> .mut 0,6kb	+	6
<i>Bx2</i> .box 0,8kb	+	4
<i>Bx2</i> .mut 0,8kb	-	0
<i>Igl</i> -MID 3,7kb	+	1
<i>Igl</i> -TA 0,7kb	+	1
<i>Igl</i> -minimal 0,5kb	+	8
<i>Igl</i> -no motive 0,36kb	+	11

3.2.1 Integrationsmuster und Kopienzahl der T-DNA

Mittels Southern-Analyse wurde die Komplexität der T-DNA in den transgenen Maispflanzen untersucht (Abb. 13). Für die Southern-Blot-Hybridisierung wurde DNA verschiedener transgener Maispflanzen mit Restriktionsenzymen verdaut und mit der GUS-Sonde (siehe Material und Methoden) hybridisiert. Die genomische DNA wurde mit BamHI bzw. EcoRI (*Bx1*-Promotor) zur Ermittlung der Kopienzahl geschnitten, diese Enzyme schneiden nur einmal in der T-DNA. Mit BamHI/HindIII bzw. HindIII (*Bx1*-Promotor) wurde zur Überprüfung der korrekten Integration des Reportergens geschnitten, für die *Bx*-Konstrukte wurde in diesem Fall ein Fragment von 2,3 kb und für die *Igl*-Konstrukte von 2,7 kb erwartet.

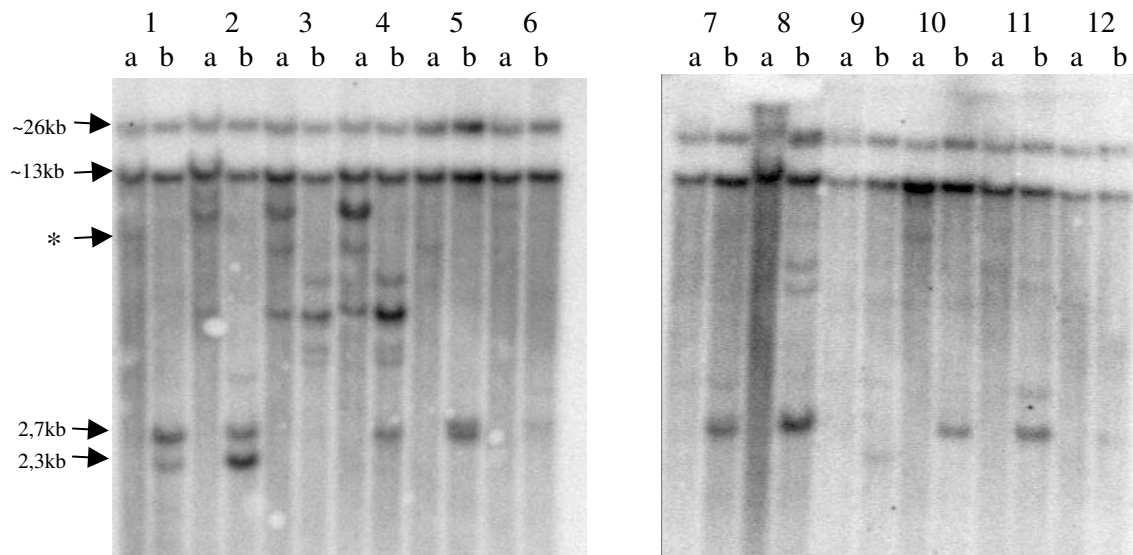


Abb. 13: Southern-Analyse transgener Pflanzen
Schneiden mit Restriktionsenzymen mit einer Erkennungsstelle im Ti-Plasmid soll die Bestimmung der T-DNA-Kopien erlauben (Spuren a), in den Spuren b wurde die DNA so geschnitten, dass das Reportergen eine Bande ergibt.
Spuren 1 und 2: *Bx2*.box 0,6kb; Spuren 3 und 4: *Bx1/1*,3kb; Spuren 5 bis 8: *Igl*-no motive 0,5kb; Spur 9: *Bx2*.mut 0,6kb; Spuren 10 bis 12: *Igl*-minimal 0,36kb
Die Hybridisierung erfolgte mit der GUS-Sonde. Mit * ist ein Hybridisierungssignal markiert, das eventuell die flankierende Sequenz der T-DNA-Integration darstellt.

Bei sämtlichen *Igl*-Konstrukten (Spuren 5-8, 10-12) trat die erwartete Bandengröße von 2,7 kb auf. Davon lässt sich auf einen korrekten Transfer des Reportergens in das Pflanzengenom schließen. *Bx2*.box 0,6 kb und *Bx1/1*,3 kb (Spuren 1-4) zeigten jeweils neben der erwarteten Bandengröße weitere Signale, was auf einen unvollständigen Verdau der DNA hinweist. Auffällig ist das Auftreten der ~13 kb- und ~26 kb-Banden. Dies kann durch den Einbau von „backbone“-DNA ins Pflanzengenom erklärt werden, die mit Plasmid-Verunreinigungen in der radioaktiven Sonde hybridisiert. Diese Vermutung wurde

durch Hybridisierung mit Plasmid-Sequenzen bestätigt (Ergebnis nicht dargestellt). Das ~13 kb-Fragment entspricht der Plasmidgröße, die ~26 kb-Bande wird bei Integration tandemartig angeordneter Plasmide erwartet. Die Stärke des „backbone“-Signals kann, relativ zu den ebenfalls erwarteten, flankierenden Sequenzen, durch Integration mehrerer Kopien des Plasmids erklärt werden. Die Bestimmung der T-DNA-Kopienzahl war in diesem Fall über das Zählen der aufleuchtenden Banden nach Schneiden mit Restriktionsenzymen in der Southern-Analyse nicht möglich, da die Ti-Plasmid-Integrationen Fragmente identischer Größe ergeben.

Zur Bestimmung der Kopienzahl wurde die genomische DNA verschiedener Transgener daher mit einer „backbone“-Sonde und der GUS-Sonde einer quantitativen Southern-Analyse unterworfen (Abb. 14). In die Analyse wurde DNA untransformierter B73-Pflanzen einbezogen, die mit XhoI/EcoR1 geschnittenem Ti-Plasmid versetzt wurde. Das Ti-Plasmid wurde in Mengen zugegeben, die 1, 5 und 10 genomischen Kopien entsprechen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Phospho-Imager (siehe Material und Methoden) und ergab eine Kopienzahl von 2 bis 18 Kopien für die „backbone“-Sonde und 1 bis 30 Kopien für die GUS-Sonde.

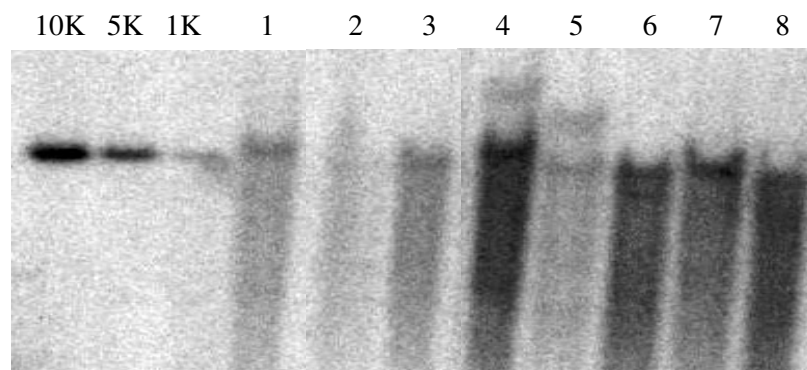


Abb. 14: Kopienzahlbestimmung
Zusatz der DNA-Menge, die 10, 5, 1 Kopie(n) entspricht (10K, 5K, 1K)
Spur 1: *Bx2.box* 0,6kb; Spur 2: *Igl-MID* 3,7kb;
Spuren 3 bis 5: *Igl-minimal* 0,5kb; Spuren 6 bis 8: *Igl-no motive* 0,36kb
Die Hybridisierung erfolgte mit der „backbone“-Sonde.

3.2.2 Analyse der Reporter-gen-Expression

In allen Konstrukten wurde β -Glucuronidase als Reporter-gen mit dem zu analysierenden Promotorbereich gekoppelt. Die GUS-Expression verschiedener Gewebe wurde nach Inkubation in X-Gluc-Lösung bestimmt. Pflanzliche Gewebe zeigen häufig eine

unspezifische Umsetzung des Substrats X-Gluc, was zu einer hellblauen Färbung ganzer Gewebebereiche führt.

Um dieses Problem zu beheben, wurden der X-Gluc-Lösung Ferri- und Ferrocyanden zugesetzt, durch welche die unspezifische Blaufärbung reduziert wird (Santi et al., 2003). Um die optimale Konzentration zu bestimmen, wurde transgenes und transient transformiertes Gewebe unter Zusatz von 0, 0,5 mM und 5 mM Ferri- und Ferrocyanden mit X-Gluc-Lösung inkubiert (Abb. 15). Das Verhältnis von Signal zu Hintergrundfärbung war bei einer Konzentration von 0,5 mM Ferri- und Ferrocyanden am besten.

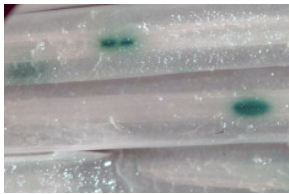
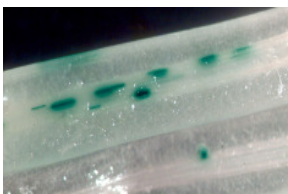
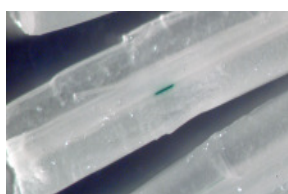
	X-Gluc-Lösung ohne Ferri- und Ferrocyande	X-Gluc-Lösung mit 0,5 mM Ferri- und Ferrocyande	X-Gluc-Lösung mit 5 mM Ferri- und Ferrocyande
Bl att			

Abb. 15: Vergleich verschiedener Färbelösungen nach Goldpartikelbeschuss von Mesokotylhälften

3.2.2.1 *Bx*-Reportergenkonstrukte

Um *cis*-Elemente im Promotorbereich des *Bx1*-Gens zu identifizieren, wurden Deletions-Reportergenkonstrukte mit 870 bp-, 1,3 kb- und 1,8 kb-Fragmenten des *Bx1*-Promotors stabil in Mais transformiert. Mittels GUS-Färbung wurde die Expression der verschiedenen Promotorbereiche getestet. Je nach Lage der *cis*-Elemente im Promotor kann eine lokal und quantitativ unterschiedliche GUS-Expression bei verschiedenen Deletionskonstrukten erwartet werden, je nachdem, welche gewebespezifisch oder generell wirksamen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sich in diesem Bereich befinden.

Ausgangspunkt für die Klonierung der *Bx1*-Konstrukte war der 3,2 kb große Promotor des *Bx1*-Gens. Die *Bx1*-Gensequenzen wurden über PCR erzeugt, in pBluescript KS+ kloniert und sequenziert. DNA-Fragmente ohne Sequenzfehler wurden als EcoR1/BglII-Fragmente in den T-DNA-Vektor pTF 102 kloniert (siehe Material und Methoden).

Bereits in der Gewebekultur wurde für die *Bx1*-Promotorkonstrukte die *Gus*-Genexpression untersucht. Die Analyse wurde mit undifferenzierten Kalli, unreifen und reifen somatischen Embryonen, sowie Sprossen jeweils einer Linie durchgeführt. Zusätzlich erfolgte mit Geweben des gleichen Entwicklungsstadiums eine Färbung mit Eisen(III)-Chlorid (FeCl_3) zum Nachweis von DIMBOA.

Gefärbt wurden jeweils 1-3 Gewebeprobe. Bei der FeCl_3 -Färbung zeigte sich, dass mit Differenzierung des Gewebes zu somatischen Embryonen bzw. zum Spross Färbung auftritt (Abb. 16), also in diesen Geweben die endogenen *Bx*-Gene exprimiert werden. Bei keinem der getesteten Reportergenkonstrukte konnte jedoch unabhängig vom Entwicklungsstadium, GUS-Expression nachgewiesen werden (Abb. 16, 17).

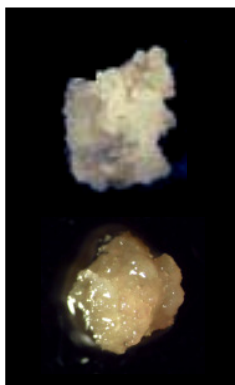
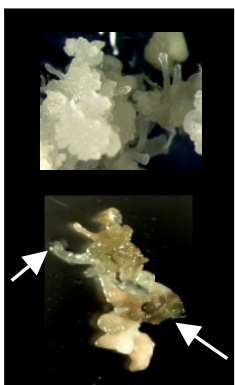
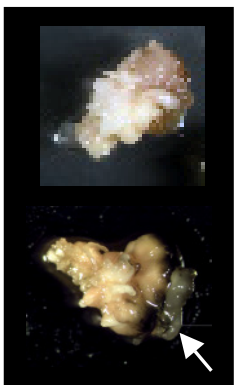
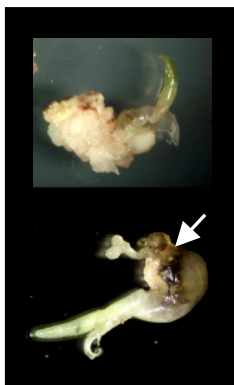
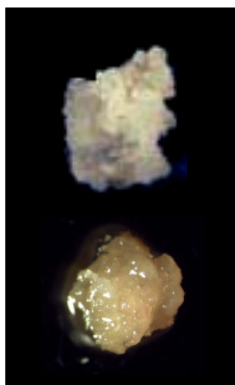
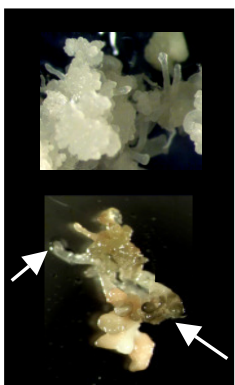
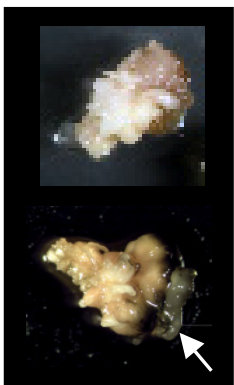
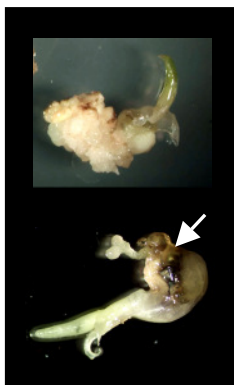
	Undifferenzierter Kallus	Unreife somat. Embryonen	Reife somat. Embryonen	Sprosse
GUS-Färbung				
FeCl_3-Färbung				

Abb. 16: GUS- und FeCl_3 -Färbung von *Bx1/870* bp-Geweben
Pfeile deuten auf Gewebebereiche, die FeCl_3 -Färbung zeigen.

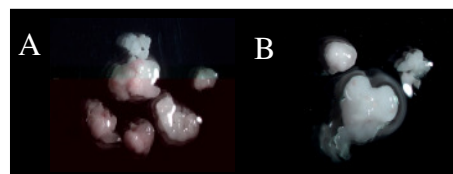


Abb. 17: GUS-Färbung reifer somatischer Embryonen von *Bx1/1,3* kb (A), *Bx1/1,8* kb (B)

Die Expression der *Bx1*-Konstrukte wurden histochemisch systematisch in der Folgegeneration analysiert. Dazu wurde mit *Bx1/870* bp- und *Bx1/1,8* kb-Pflanzen an verschiedenen Tagen nach der Keimung parallel GUS-Expression mittels X-Gluc-Inkubation und *Bx*-Genaktivität mittels DIMBOA-Nachweis durch FeCl_3 -Färbung bei jeweils einer transgenen Linie bestimmt.

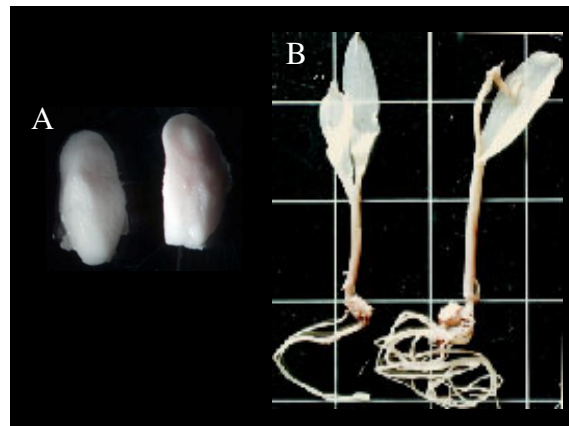


Abb. 18: GUS-Färbung in der T₁-Generation von *Bx1/870 kb*-Reporterpflanzen Färbung 2 Tage (A) und 7 Tage (B) nach der Keimung

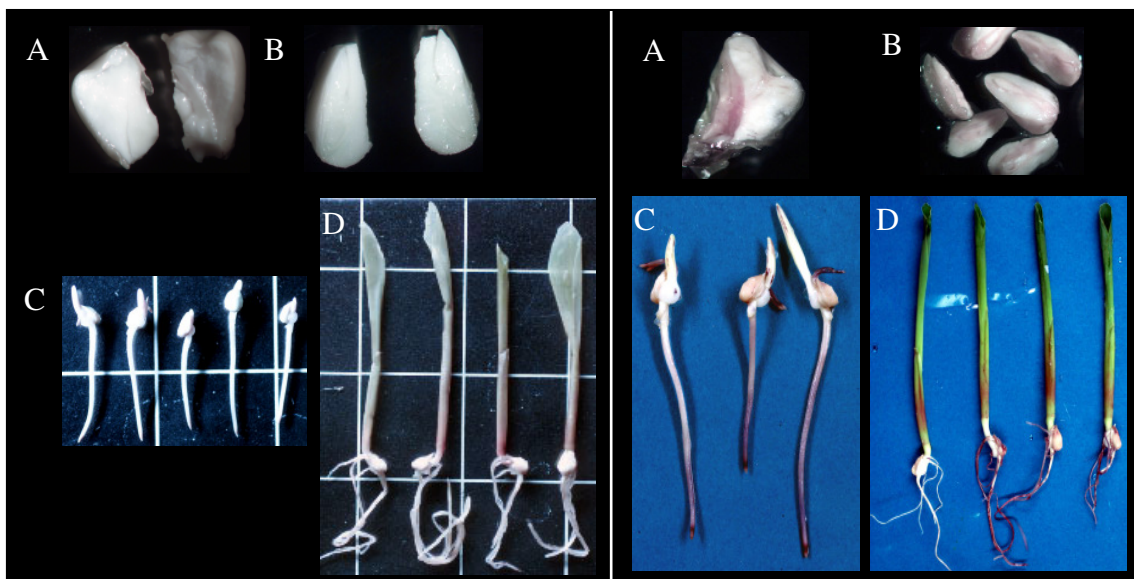


Abb. 19: GUS- und FeCl₃-Färbung in der T₁-Generation von *Bx1/1,8 kb*-Reporterpflanzen. GUS- (linke Hälfte) und FeCl₃-Färbung (rechte Hälfte) 0 Tage (A), 1 Tag (B), 3 Tage (C) und 7 Tage (D) nach der Keimung; Benzoxazinone lassen sich erst ab Tag 3 erkennen.

Bei beiden Konstrukten trat in der T₁-Generation in keinem getesteten Stadium (0-7 Tage nach der Keimung) GUS-Expression auf (Abb. 18, 19). Die FeCl₃-Färbung verschiedener Stadien bei *Bx1/1,8 kb* zeigte DIMBOA-Expression ab dem Zeitpunkt der Differenzierung von Spross und Wurzel (3 Tage nach Keimung) (Abb. 19).

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass keine der getesteten Sequenzen eine Genexpression vermittelt, welche der Expression der endogenen *Bx*-Gene entsprechen würde. Da dieses Ergebnis jeweils nur auf der Analyse einer Linie beruht, könnte dies auf negative Positionseffekte zurückzuführen sein. Daher müssen für eine endgültige Aussage weitere unabhängige, transgene Linien untersucht werden. T₀-Pflanzen für diese Konstrukte befinden sich zur Zeit im Gewächshaus.

Die *Bx2*-Promotorkonstrukte für die stabile Transformation basieren auf den *Bx2.box*- und *Bx2.mut*-Reporterengenkonstrukten von Martin (2003). Es wurde in transienten Expressionsstudien mit Maisprotoplasten gezeigt, dass die Genprodukte zweier HD-Zip-Transkriptionsfaktoren der Klasse I von Mais (*ZmHD-Zip1* und 2) spezifisch an das konservierte Sequenzmotiv TAATT (*Bx2.box*-Motiv) im 5'-Bereich des *Bx2*-Promotor binden und dadurch als Aktivatoren der Transkription fungieren (Martin, 2003). Wurde das Sequenzmotiv zu TTTTT mutiert (*Bx2.mut*-Motiv), konnte keine Aktivierung beobachtet werden.

<i>Bx2.box</i> -Motiv	CAGACTCCAA TAATTA ATGTGGCCGC
<i>Bx2.mut</i> -Motiv	CAGACTCCAA TTTTT ATGTGGCCGC

Abb. 20: Sequenzmotiv des *Bx2*-Gens und seine mutierte Form (Martin, 2003)

Für die stabile Transformation wurden jeweils zwei Promotorkonstrukte *Bx2.box* und *Bx2.mut* 0,6 kb- und 0,8 kb-5'-upstream-Sequenzen in den Vektor pTF 102 kloniert. *Bx2.mut* wurde durch PCR-basierende Mutagenese erzeugt (siehe Material und Methoden) und trägt das mutierte Motiv (Abb. 20) im gleichen Sequenzkontext, wie das 0,6 kb- bzw. 0,8 kb-*Bx2*-Wildtyp-Fragment.

Die Analyse der *Bx2*-Reporterengenkonstrukte erfolgte wie für die *Bx1*-Konstrukte beschrieben. Untersucht wurde je eine Linie für das *Bx2.box* 0,6 kb- (94 Li. 1) und das *Bx2.mut* 0,6 kb-Konstrukt (V14 Li. 14) (Abb. 21).

Beim undifferenzierten Kallus trat bei beiden Konstrukten weder GUS- noch FeCl₃-Färbung auf. Mit Differenzierung zu unreifen und reifen somatischen Embryonen wurde sowohl bei *Bx2.box* 0,6 kb als auch bei *Bx2.mut* 0,6 kb FeCl₃-Färbung beobachtet, aber nur bei *Bx2.box* 0,6 kb trat auch GUS-Färbung auf. Hier lag also eine gewebe- bzw. entwicklungsspezifische Expression vor, die erst bei Differenzierung des Gewebes parallel zur endogenen *Bx*-Genaktivität auftrat. In Sprossen zeigte sich bei beiden Konstrukten FeCl₃-Färbung. Hier war bei *Bx2.box* 0,6 kb starke GUS-Expression zu erkennen, bei *Bx2.mut* 0,6 kb war in diesem Entwicklungsstadium eine leichte Blaufärbung zu sehen.

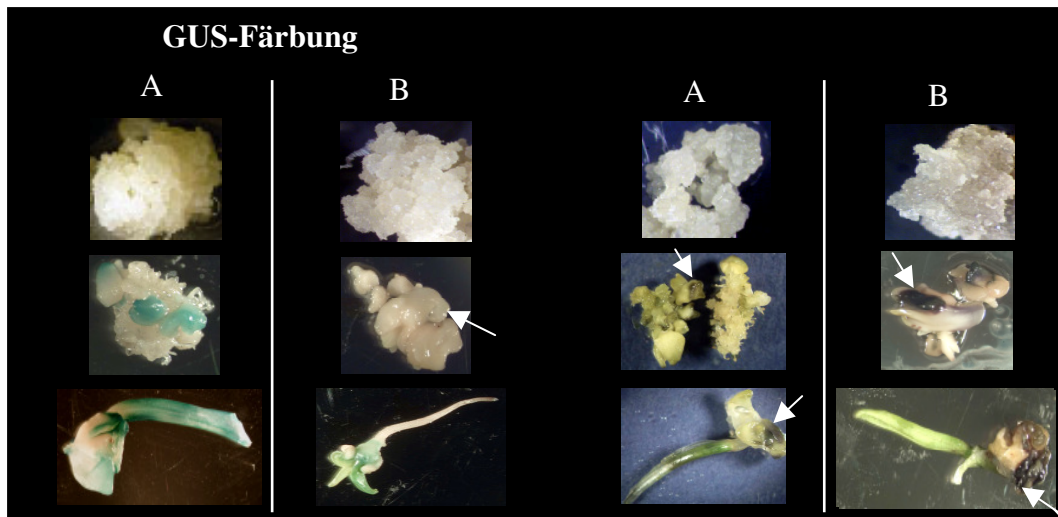


Abb. 21: GUS- und FeCl_3 -Färbung verschiedener Gewebekulturstadien
 Obere Reihe: undifferenzierter Kallus; mittlere Reihe: unreife und reife
 (Pfeil links, GUS-Färbung) somatische Embryonen; untere Reihe: Sprosse;
 Pfeile rechts (FeCl_3 -Färbung) zeigen auf Gewebebereiche mit FeCl_3 -Färbung
 Gefärbt wurde Gewebe von *Bx2.box* 0,6 kb (A) und *Bx2.mut* 0,6 kb (B).

Um zu untersuchen, ob das *Bx2.box* 0,6 kb-Reporterergenkonstrukt in der Tat eine Expression in frühen Differenzierungsstadien in der Zellkultur vermittelt, wurden systematisch unreife Embryonen der T_1 -Generation in der Gewebekultur analysiert. Dazu wurden unreife Embryonen geselbsteter und ausgekreuzter *Bx2.box* 0,6 kb- (94 Li. 1) und *Bx2.mut* 0,6 kb-Pflanzen (V 15 Li. 1) ca. 12-14 Tage nach der Pollinierung steril isoliert und auf Selektionsmedium mit 3 mg/l Bialaphos kultiviert. Nach 20-40 Tagen wurde die Segregation anhand der Embryonengröße und -entwicklung bestimmt. Embryonen, die keinen Kallus oder Kallus mit weniger als 0,5 cm im Durchmesser bildeten und in ihrer Entwicklung stagnierten, wurden als „nicht transgen“ gewertet. Dagegen wurden alle Embryonen, die sehr viel und stark wachsenden Kallus mit mehr als 0,5 cm im Durchmesser bildeten, als „transgen“ bewertet und weiter untersucht. Die Analyse erfolgte mit unreifen Embryonen sowie undifferenzierten und differenzierten Kalli.

Zur Untersuchung von *Bx2.box* 0,6 kb wurden 194 unreife Embryonen geselbster Transgener auf Selektionsmedium ausgelegt. Die Segregation anhand der Kalligröße bzw. -entwicklung betrug 3 : 1 (140 transgene Kalli : 54 nicht transgene Kalli). Unreife Embryonen zeigten bereits 1 Tag nach Versuchsbeginn GUS-Expression am Sprossansatz (1 von 10 Embryonen; Abb. 22). Wurden aber Embryonen mit beginnender Kallusbildung gefärbt (Tag 8), war bei 7 von 10 Embryonen im Kallus, im Skutellumbereich und im gebildeten Spross starke Blaufärbung zu beobachten. Nach 32 Tagen hatte sich an den Explantaten

undifferenzierter Typ II-Kallus gebildet, der zu diesem Zeitpunkt den Hauptteil der Zellmasse darstellte. Wie in den vorherigen Untersuchungen in der Gewebekultur zeigte dieser Kallus keine oder nur geringe GUS-Aktivität. Auch an der ursprünglichen Sprossanlage war keine Blaufärbung nachweisbar.

Für die Analyse von *Bx2.mut* 0,6 kb wurden 112 unreife Embryonen einer mit Wildtyp gekreuzten Transgenen auf Selektionsmedium ausgelegt, es ergab sich die erwartete Spaltung von 1 : 1 (55 transgene Kalli : 57 nicht transgene Kalli). Kein Entwicklungsstadium (unreife Embryonen, undifferenzierte und differenzierte Kalli) zeigte GUS-Expression.

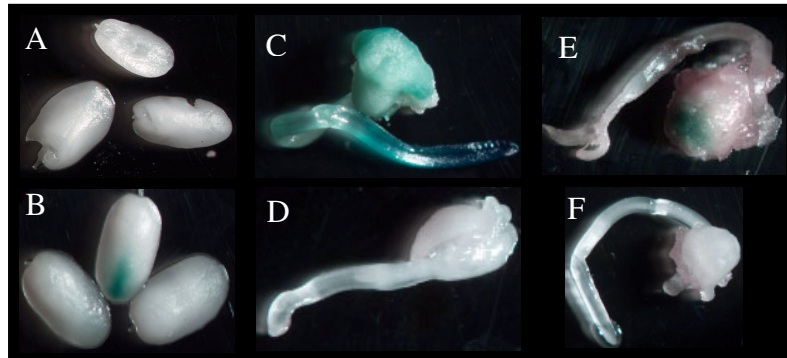


Abb. 22: GUS-Färbung der Embryonen bzw. Kalli mit *Bx2.box* 0,6kb 0 Tage (A), 1 Tag (B), 8 Tage (C, D) und 32 Tage (E, F) nach Versuchsbeginn. In D und F handelt es sich wahrscheinlich um nicht transgenes Gewebe.

Anhand der Gewebekulturversuche in der T_0 - und T_1 -Generation kann dem 0,6 kb *Bx2*-Promotorfragment eine Rolle in der sehr frühen entwicklungspezifischen Genexpression zugeschrieben werden. Das *Bx2.box* 0,6 kb- und *Bx2.mut* 0,6 kb-Konstrukt zeigten klare Expressionsunterschiede in den untersuchten Linien während der Differenzierung somatischer Embryonen, im sich entwickelnden Spross konnte ein Unterschied in der Intensität der GUS-Expression festgestellt werden. Die Expression war stärker bei *Bx2.box* 0,6 kb und schwächer bei *Bx2.mut* 0,6 kb.

Im folgenden wurde in der T_1 -Generation die Expression in der Keimlingsentwicklung untersucht. Dazu wurden je 10 Embryonen bzw. Keimlinge der Linien *Bx2.box* 0,6 kb- (94 Li. 1) und *Bx2.mut* 0,6 kb-Pflanzen (V8 Li. 2) 0, 1, 3 und 7 Tage nach der Keimung GUSgefärbt (Abb. 23). Für die Färbung vor der Keimung (Tag 0) wurden trockene Körner geteilt und mit X-Gluc-Lösung infiltriert. Bei beiden Linien wurden zwei Geschwister- T_0 -

Pflanzen je mit „Hi-II“ gekreuzt und die entstehenden T₁-Pflanzen (Ac. 43 und 60 für 94 Li. 1 und Ac. 105 und 106 für V8 Li. 2) untersucht.

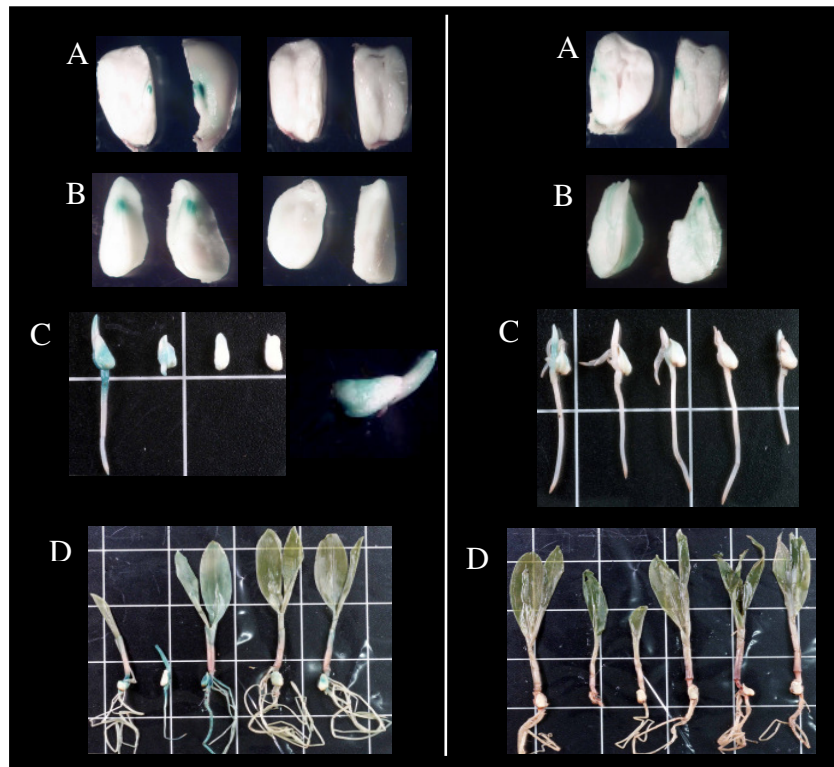


Abb. 23: GUS-Färbung von Embryonen bzw. Keimlinge der T₁-Generation *Bx2.box* 0,6kb (linke Hälfte, 94 Li. 1) und *Bx2.mut* 0,6kb (rechte Hälfte; V8 Li. 2, Ac. 105) gefärbt 0 Tage (A), 1 Tag (B), 3 Tage (C) und 7 Tage (D) nach der Keimung

Bei beiden Geschwisterpflanzen des *Bx2.box* 0,6 kb-Konstruktes und bei einer Geschwisterpflanze des *Bx2.mut* 0,6 kb-Konstruktes (Ac. 105) trat starke, lokal begrenzte GUS-Expression 0 und 1 Tag nach der Keimung an der Koleoptile auf. Die Färbung an Tag 3 und 7 war diffus und es zeigte sich kein einheitliches Expressionsmuster bei verschiedenen Pflanzen. Dies könnte auf eine unspezifische Umsetzung des Substrats in den älteren Pflanzen beruhen. Bei der zweiten Geschwisterpflanze des *Bx2.mut* 0,6 kb-Konstruktes konnte zu keinem Zeitpunkt GUS-Färbung beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine gewebespezifische Expression der *Bx2.box* 0,6 kb- und *Bx2.mut* 0,6 kb-Reportergenkonstrukte in der Koleoptile hin, die sich bei älteren Pflanzen in ihrer Stärke unterscheidet.

Mit histologischen Analysen von *Bx2.box* 0,6 kb- und *Bx2.mut* 0,6 kb-Pflanzen wurde die Transgenexpression in Koleoptilen näher untersucht. Es wurden 5 Tage alte Koleoptilen von je zwei unabhängigen Linien des *Bx2.box* 0,6 kb- (94 Li.1 und 94 Li.2) und

Bx2.mut 0,6 kb-Konstruktes (V14 Li. 14 und V8 Li. 2 mit Ac. 105 und 106) isoliert und in X-Gluc-Lösung inkubiert. Die Restpflanzen wurden nach 10 Tagen einem BASTA-Resistenztest unterzogen.

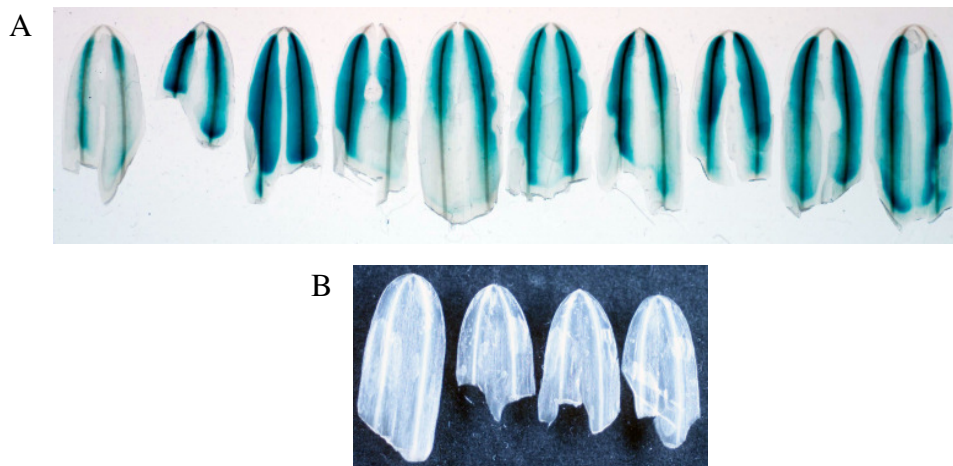


Abb. 24: GUS-Färbung der Koleoptilen in der T₁-Generation von *Bx2.box* 0,6 kb transgene Pflanzen (A) und nicht transgenen Geschwisterpflanzen (B)

Es zeigte sich, dass bei beiden unabhängigen Linien von *Bx2.box* 0,6 kb GUS-Expression auftrat (Abb. 24), sowie bei einer von zwei Linien *Bx2.mut* 0,6 kb (V14 Li. 14). Bei allen untersuchten Pflanzen färbten sich nur diejenigen Koleoptilen, die von einer BASTA-resistenten, also transgenen Pflanze stammten. Alle Koleoptilen, die keine Färbung zeigten, stammten von Nicht-BASTA-resistenten Pflanzen. Die erzielten Spaltungsverhältnisse entsprechen annähernd alle der erwarteten Segregation von 1 : 1 (Anhang Tab. 9).

In allen Analysen ergab sich für die beiden untersuchten Linien des *Bx2.box* 0,6 kb-Konstruktes (94 Li. 1 und 94 Li. 2) ein klares Expressionsmuster. Bereits in frühen Stadien ist die stärkste Expression in der Koleoptile bzw. Koleoptilenanlage zu erkennen. In diesem Gewebe ist die Expression begrenzt auf die beiden Hauptleitbündel und die sie umgebenden Bereiche. In anderen Geweben, z. B. der Wurzel, war bei einzelnen Pflanzen geringe GUS-Aktivität nachweisbar. Für *Bx2.mut* 0,6 kb-Konstrukte ist das Bild uneinheitlich. Zwar stimmte das Expressionsmuster prinzipiell mit dem des *Bx2.box* 0,6 kb-Reportergens überein, aber die Expression ist nicht in jeder Pflanze gewährleistet: eine Linie zeigt keinerlei GUS-Expression (V15 Li. 1), bei V8 Li. 2 verhalten sich die Nachkommen zweier Geschwisterpflanzen (Ac. 105 und 106) unterschiedlich. Ac. 106 zeigte in keinem analysierten Stadium GUS-Aktivität, während sich Ac. 105 wie die *Bx2.box* 0,6 kb-Konstrukte verhält. Alle untersuchten Pflanzen

melden in Bezug auf das Resistenzgen. Die variable Ausprägung des Reportergens lässt sich somit nicht einfach auf ein „Silencing“ des Transgenlocus zurückführen. Es könnte also sein, dass das intakte *Bx2.box*-Motiv notwendig ist für eine stabile Interaktion von Transkriptionsfaktoren in der Koleoptile. Allerdings ist dieses Motiv nicht notwendig für die Bindung dieser Faktoren, da das spezifische Expressionsmuster unabhängig von der *Bx2.box*-Motivsequenz entsteht. Dieses Ergebnis muss durch die Untersuchung weiterer Transgener bestätigt werden. Weisen diese das gleiche Muster der Reporterexpression auf, so kann von einer Lokalisation der dafür verantwortlichen *cis*-Elemente innerhalb des 0,6 kb-Promotorfragmentes ausgegangen werden.

3.2.2.2 *Igl*-Reportergenkonstrukte

Ziel der Analysen war, Sequenzelemente des *Igl*-Gens zu identifizieren, welche die durch Verwundung oder die Elicitoren Volicitin (*N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-Glutamin) oder LEA (*N*-Linolenoyl-L-Glutamin) induzierte Genexpression vermitteln (Frey et al., 2000, 2003). Dies wurde anhand von Reportergenkonstrukten in stabil transformierten Pflanzen untersucht.

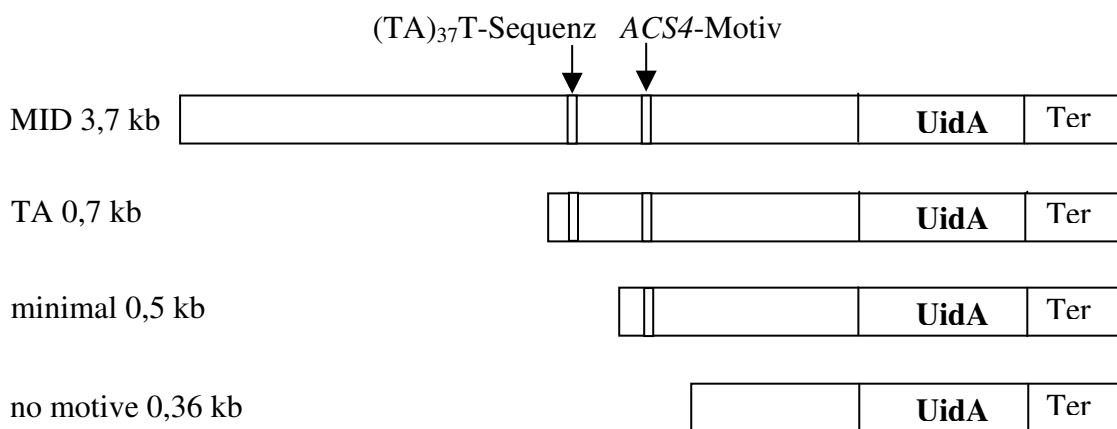


Abb. 25: *Igl*-Reportergenkonstrukte (Kortes, 2003)

Bei -459 bp findet sich eine 37fache Wiederholung des TA-Dinukleotids und bei -237 bp ein 26 bp-Motiv, das auch im Promotor des *ACS4*-Gens (auxininduziertes *ACC-Synthase*-Gen) von *Arabidopsis* gefunden wird.

Die β -Glucuronidase ist ein äußerst stabiles Protein und der histologische Nachweis sehr sensitiv, aber nicht quantitativ. Die Induktion von *Igl* durch Verwundung oder Volicitin ist schnell und transient. Ausgehend von geringen Transkriptmengen wird 60-120 min. nach Induktion die maximale Transkription des *Igl*-Gens festgestellt. Diese Dynamik und auch die Unterschiede der Induktionsstärke können deshalb allein durch histologische Analysen nicht bestimmt werden. Deshalb wurden die transgenen Pflanzen zusätzlich mittels

quantitativer PCR untersucht. Transformiert wurden die Konstrukte MID 3,7 kb, TA 0,7 kb, minimal 0,5 kb und no motive 0,36 kb (Kortes, 2003) (Abb. 25). Transgene Pflanzen der Reporterkonstrukte MID 3,7 kb, TA 0,7 kb und no motive 0,36 kb konnten untersucht werden.

3.2.2.2.1 Histologische Untersuchungen

Die histologische Analyse der GUS-Expression wurde mit 10 Tage alten TA- und MID-Pflanzen der T₁-Generation durchgeführt. Diese Pflanzen waren Nachkommen der Kreuzung der Primärtransformanten mit der *bx1bx1*-Mutatenlinie. Zwei Stunden nach Induktion durch Verwundung und Volicitin-Inkubation (siehe Material und Methoden) wurden die induzierten Keimlinge sowie intakte Kontrollpflanzen mit X-Gluc-Lösung infiltriert.

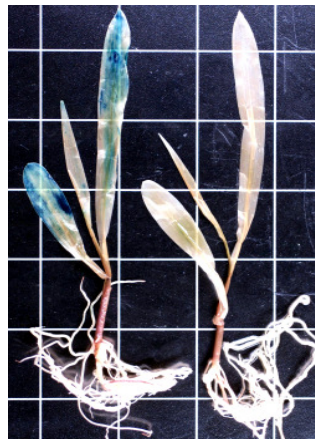


Abb. 26: GUS-Färbung von 10 Tage alten unverwundeten MID 3,7 kb-Keimlingen. links: transgene Pflanze, rechts: nicht transgene Pflanze

Bereits bei den Kontrollpflanzen trat bei beiden Konstrukten Hintergrundfärbung auf (Abb. 26). Bei MID 3,7 kb kam es durch Verwundung und durch Volicitin-Inkubation zu einer Steigerung der GUS-Färbung, während bei TA 0,7 kb zwar eine erhöhte Färbung durch Verwundung zu beobachten war, aber keine weitere Steigerung durch Volicitin-Inkubation (Ergebnis nicht dargestellt).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden TA 0,7 kb- und MID 3,7 kb-Pflanzen steril angezogen, an einem Blatt verwundet (siehe Material und Methoden), 2, 5 und 24 Stunden nach Verwundung mit Formaldehyd fixiert und in X-Gluc-Lösung infiltriert. Parallel wurden unverwundete Pflanzen untersucht. Es wurde keine Selektion transgener Pflanzen vorgenommen, daher wurde eine Segregation von 1 : 1 (transgen : nicht transgen bzw.

GUS-Aktivität : keine GUS-Aktivität) erwartet. Die abweichenden Spaltungsverhältnisse (Tab. 10) können durch den geringen Probenumfang erklärt werden, oder durch unspezifische X-Gluc-Umsetzung, da in diesem Versuch keine Ferri- und Ferrocyanide zugesetzt wurden (siehe „3.2.2 Analyse der Reporter-gen-Expression“). Die Färbung trat vor allem am Ort der Verwundung auf, doch war auch im übrigen Gewebe, selbst nach Fixierung, GUS-Expression zu beobachten.

Insgesamt zeigte sich bei den histologischen Untersuchungen starke basale Aktivität, die durch Verwundung und Volicitingabe nur wenig erhöht wurde.

Tab. 10: GUS-Färbung von 10 Tage alten Keimlingen 2, 5 und 24 Stunden nach Induktion durch Verwundung

Reporterkonstrukte	Anzahl gefärbter und ungefärbter Keimlinge nach unterschiedlichen Inkubationszeiten			
	unverwundet	2 Stunden	5 Stunden	24 Stunden
TA 0,7 kb	1 : 1	4 : 1	4 : 2	5 : 1
MID 3,7 kb	1 : 1	3 : 3	2 : 2	6 : 0

3.2.2.2.2 Quantitative Bestimmung der Transkriptmenge

Um die bei der histologischen Untersuchung auftretenden Probleme zu umgehen, wurden die *Igl*-Promotorkonstrukte mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Hierbei wurde die Expression des endogenen *Igl*-Gens mit dem des Reportergens verglichen. Dazu wurde die quantitative RT-PCR für das *Gus*-Gen etabliert (siehe Material und Methoden). *Igl*-Transkripte wurden quantifiziert wie bei Frey et al. (2003) beschrieben. Die Pflanzen wurden unter Standardbedingungen 8 Tage angezogen, dem BASTA-Test unterworfen und resistente Pflanzen nach 10 Tagen untersucht. Transgene TA 0,7 kb-, MID 3,7 kb- und no motive 0,36 kb-Pflanzen wurden 2 h nach Verwundung und Elicitor-Inkubation (Volicitin/LEA) geerntet, anschließend RNA isoliert und daraus cDNA gewonnen. Die RT-PCR wurde für das *Igl*- und *Gus*-Gen durchgeführt und gegen die cytosolische Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

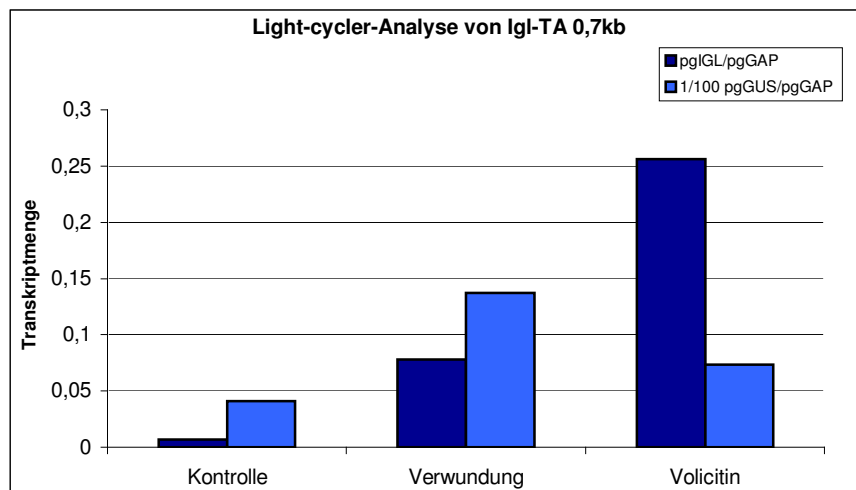


Abb. 27: Quantitative RT-PCR mit TA 0,7 kb für die Gene *Igl* und *Gus* bei verschiedenen Behandlungen

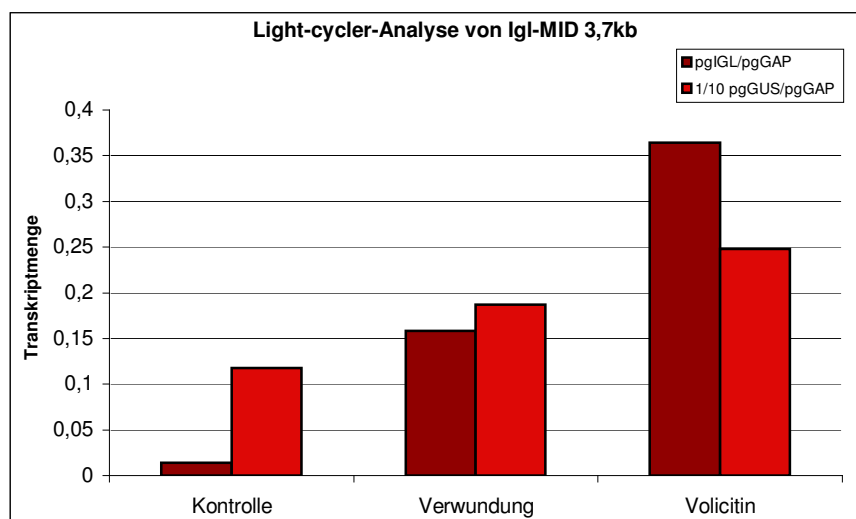


Abb. 28: Quantitative RT-PCR mit MID 3,7 kb für die Gene *Igl* und *Gus* bei verschiedenen Behandlungen

Bei allen Versuchen war der Grundwert des *Gus*-Transkripts im Bereich des *Gapdh*-Gens und damit mindestens 10fach höher als der des *Igl*-Gens. Bei TA 0,7 kb- und MID 0,37 kb-Pflanzen trat eine etwa 10fache Steigerung der Transkriptmenge des *Igl*-Gens durch Verwundung und eine etwa 40fache (TA 0,7 kb-Reporterkonstrukt) bzw. 25fache (MID 0,37 kb-Reporterkonstrukt) Steigerung durch Volicitin im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Transkriptmenge des *Gus*-Gens stieg bei MID 3,7 kb durch Verwundung und Volicitin an, während bei TA 0,7 kb zwar eine Erhöhung der Transkriptmenge durch Verwundung, nicht aber durch Volicitingabe beobachtet werden konnte (Abb. 27, 28). Dies lässt darauf schließen, dass bei beiden Konstrukten ein Sequenzelement vorkommt, das auf Verwundung reagiert, aber nur bei MID 3,7 kb ein zusätzliches Element auftritt, das auf eine Induktion mit Volicitin reagiert.

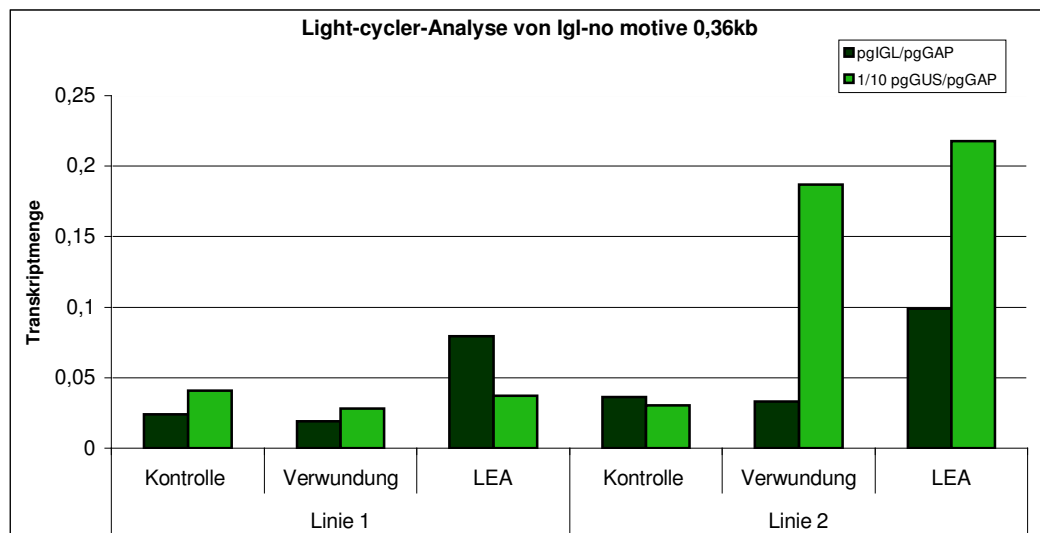


Abb. 29: Quantitative RT-PCR mit zwei unabhängigen Linien 1 und 2 von no motive 0,36 kb für die Gene *Igl* und *Gus* bei verschiedenen Behandlungen

Für das no motive 0,36 kb-Konstrukt wurden zwei unabhängige Linien gewonnen, die T₀-Pflanzen mit „Hi-II“ gekreuzt und die Nachkommen analysiert. In diesen Pflanzen läuft die Induktion von *Igl* durch Verwundung und Elicitorgabe weniger effizient ab, als bei Kreuzungen mit der *bx1bx1*-Mutante. Die *Igl*-Transkriptmenge erhöhte sich bei Verwundung und Elicitorgabe (LEA) auf weniger als das 3fache. Das Transgen *Gus* verhielt sich in den beiden Linien unterschiedlich. Während bei Linie 1 keine Veränderung der *Gus*-Transkriptmenge auftrat, führte bei Linie 2 Verwundung und Elicitorgabe zur rund 4fachen Erhöhung (Abb. 29). Es bleibt zu klären, ob diese für die beiden Linien unterschiedliche Antwort der Transgenexpression durch Induktion auf Positionseffekte zurückzuführen ist. Dies ist, wie auch die Verifizierung der Ergebnisse mit den größeren Promotorkonstrukten durch die Analyse weiterer, unabhängiger Pflanzenlinien möglich.

3.3 Goldpartikel-Beschuss als transientes Expressionssystem

Die transiente Untersuchung verschiedener Konstrukte mittels Goldpartikel-Beschuss hat gegenüber der stabilen Transformation den Vorteil, dass Ergebnisse bereits nach kurzer Zeit erzielt werden können. Dieses System sollte für die Analyse der Expression der *Bx*-Gene geeignet sein. Der Nachteil besteht darin, dass aufgrund der Verwundung des Gewebes zur Vorbereitung des Beschusses und durch den Partikelbeschuss selbst keine durch Verwundung induzierbaren Gene, wie z. B. *Igl*, analysiert werden können.

3.3.1 Bestimmung des geeigneten Gewebes

Ergebnisse von *in situ*-Hybridisierungen zeigen, dass die *Bx*-Gene nicht in der Epidermis exprimiert werden (Frey et al., 1995). Da die DNA mittels Goldpartikelbeschuss nur ein bis zwei Zellschichten tief ins Gewebe eingeschleust wird, bestand die Notwendigkeit der Bestimmung eines geeigneten Zielgewebes. Deshalb wurden zwei Gewebetypen, Blätter und Mesokotyle untersucht. Für beide wurde durch quantitative RT-PCR die Höhe der Expression der endogenen *Bx*-Gene bestimmt. Verwendet wurde die Maislinie LG 22.44 (Limagrain, Nickerson).

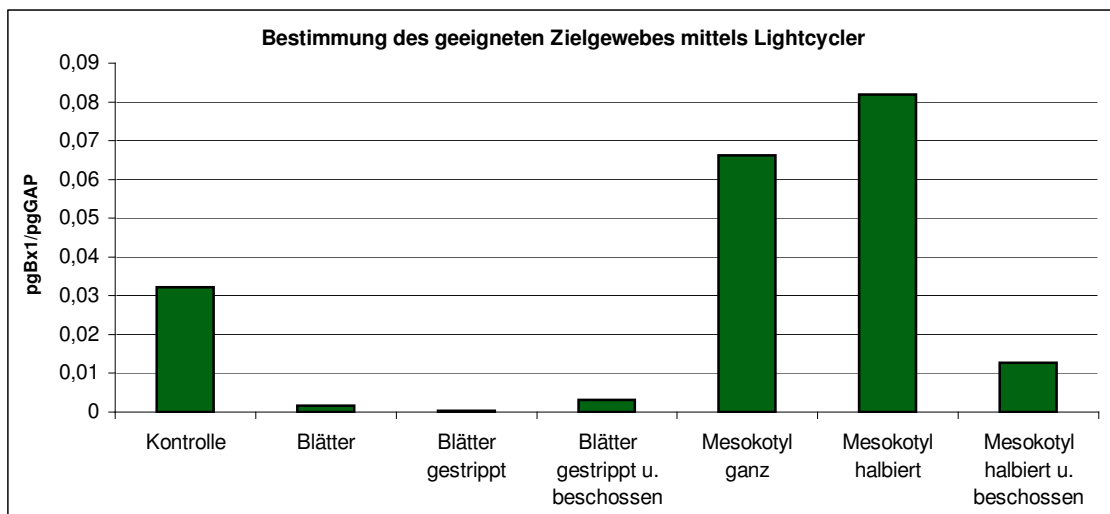


Abb. 30: Quantitative RT-PCR zur Bestimmung des geeigneten Zielgewebes
Als Kontrolle wurden 4 Tage alte Keimlinge verwendet. Die Analyse nach Beschuss erfolgte 3 h nach Präparation der Explantate.

Beim Beschuss „gestrippter“, d. h. von der Epidermis befreiter Blätter, trat keine Expression der *Bx*-Gene auf. Die Analyse der Expression der endogenen *Bx*-Gene (*Bx1* und *Bx2*) mittels quantitativer RT-PCR zeigte, dass die Expression im Mesokotyl selbst nach Verwundung durch Halbieren und Beschuss höher ist als in den Blättern (Abb. 30). Daher wurden für alle nachfolgenden Versuche ausschließlich Mesokotylhälften verwendet.

3.3.2 Verwendung geeigneter Positiv-Kontrollen

Zur Überprüfung der Methode war es notwendig, geeignete Positiv-Kontrollen zu finden, die im verwendeten Gewebe exprimiert werden. Der meist zur Kontrolle verwendete 35S-Promotor ist im Mesokotyl nicht aktiv (Ergebnis nicht dargestellt). Zur Kontrolle des Beschusses von Mesokotylhälften wurde ein Konstrukt mit Ubiquitin-Promotor, GUS-Gen und NOS-Terminator (Ubi-GUS, 6,2 kb; siehe Material und Methoden) erstellt. Für dieses

Kontrollkonstrukt wurden die Bedingungen des Beschusses optimiert. Beste Ergebnisse wurden bei einem Druck von 1300 psi (Abb. 31) und einer Goldpartikelgröße von 1,0-1,6 μm erzielt.

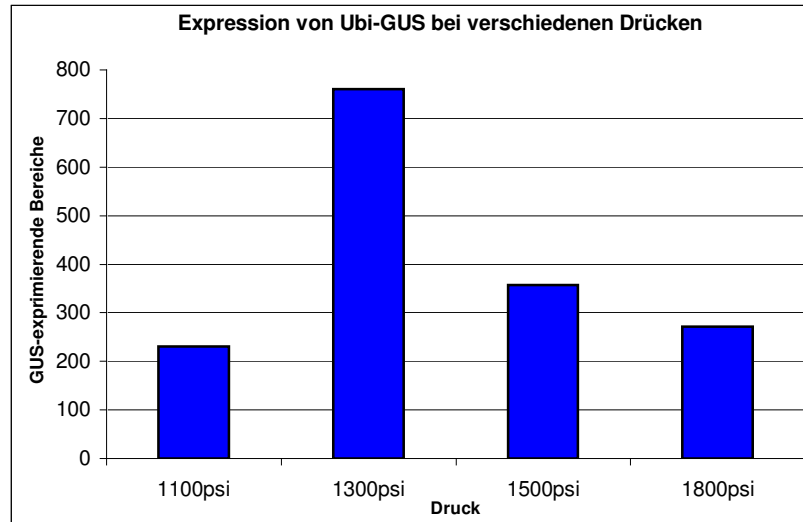


Abb. 31: Goldpartikelbeschuss von Mesokotylhälften mit Ubi-GUS bei verschiedenen Drücken

Es zeigte sich, dass mit Ubi-GUS beim Beschuss von Mesokotylhälften eine konstant hohe GUS-Expression erzielt werden konnte. Aus diesem Grund wurde Ubi-GUS als Kontrollkonstrukt für alle weiteren Versuche verwendet.

3.3.3 Optimierung der Bedingungen des Beschusses

Es zeigte sich, dass die Menge der zur Beladung der Goldpartikel verwendeten DNA wenig Einfluss auf das Ergebnis hatte, 5 μg DNA und 10 μg ergaben gleiche Expressionsraten. Als optimal erwies sich ein Abstand von 8 cm zwischen Explantat und Macrocarrier. Die Expression von Ubi-GUS in Mesokotylhälften war bei einem Druck von 1300 psi am höchsten (Abb. 31), aber auch bei Drücken von 1100-1800 psi traten jeweils Werte vom mehr als 100 GUS-exprimierende Bereiche pro Versuch auf. Die GUS-Expression war bei einem Goldpartikeldurchmesser von 1,6 μm bei allen Drücken am höchsten, doch wurde das Pflanzengewebe dadurch zu stark geschädigt, so dass bei den weiteren Versuchen 1,0 μm Goldpartikel verwendet wurden.

3.3.4 Intron-Konstrukte für den Beschuss

Systematisch wurden im transienten Ansatz *Bx4*-Konstrukte, die neben 5'-upstream- auch 3'-downstream-Sequenzen enthalten (Ohnhäuser, 2000) untersucht. Da bei diesen Konstrukten keine GUS-Expression auftrat, wurde zusätzlich in diesen Promotor/Terminator-Konstrukten das Intron des *Bx4*-Gens integriert (siehe Material und Methoden). Das korrekte „Splicing“ dieses Introns wurde dadurch überprüft, dass es in das *Gus*-Gen im Ubi-GUS-Reporter eingebaut wurde (Tab. 11).

Tab. 11: Vergleich der GUS-Expression von Ubi-GUS und Ubi-GUS-Intron

GUS-exprimierende Bereiche		
Reporterkonstrukt	Ubi-GUS	Ubi-GUS-Intron
1100psi	9	202
1300psi	165	229
1500psi	113	253
gesamt	287	684

Mit Intron kam es beim Kontrollkonstrukt zu einer deutlichen Steigerung der Expression. Daher wurde im folgenden die Expression bei zwei weiteren *Bx4*-Konstrukten P2.1T650 und P190T650 (Ohnhäuser, 2000) mit und ohne Intron getestet (Tab. 12, 13). Bei beiden Konstrukten trat Expression auf, die aber weit unter dem Ergebnis des Ubi-Promotors lag und nicht mit der Intron-Sequenz oder dem Umfang der 5'-upstream-Sequenz korreliert war.

Tab. 12: Vergleich der GUS-Expression von P2.1T650-GUS und P2.1T650-GUS-Intron

Reporter-konstrukte	P2.1T650-GUS	P2.1T650-GUS-Intron	Ubi-GUS-Intron
1100psi	0	0	44
1300psi	0	2	238
1500psi	0	19	350

Tab. 13: Vergleich der GUS-Expression von P190T650-GUS und P190T650-GUS-Intron

Reporter-konstrukte	P190T650-GUS	P190T650-GUS-Intron	Ubi-GUS-Intron
1100psi	5	6	194
1300psi	0	0	437
1500psi	0	0	282

Die durch den Ubi-Promotor vermittelte Expression wird in der Größenordnung der GAPDH-Genexpression erwartet. Aufgrund der Transkriptmenge der endogenen Gene ist mit dem untersuchten Material zu erwarten, dass die Transgenexpression etwa bei 1-10 % der des Ubi-Promotorkonstruktes liegt (siehe Abb. 30). Daraus ergibt sich, dass Aussagen über Promotorelemente erst nach großen Beschusserien möglich sind. Alternativ könnte durch Verwendung jüngeren Gewebes 2 Tage nach Keimung bzw. Mesokotyllängen von 0,5-1,0 cm eine bessere Expression erwartet werden. Für diese jungen Keimlinge wird eine *Bx1*-Transkriptmenge von bis zu 1 µg/µg GAPDH-Transkript bestimmt (Jeff Brotherton, unveröffentlicht).

4 Diskussion

4.1 Etablierung der Transformation von Mais mittels *A. tumefaciens*

Mit Hilfe der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von Mais können stabil transgene Pflanzen erzeugt werden. Ein Protokoll für die schwierige Transformation mit dem binären System ist bei Frame et al. (2002) dargestellt. Die *Agrobacterien*-vermittelte Maistransformation mit dem binären System wurde im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Genetik, ausgehend vom oben genannten Protokoll (Frame et al., 2002), etabliert.

Im Verlauf der Versuche zeigte sich, dass die Anzuchtbedingungen der Spenderpflanzen für die Entwicklung der Embryonen in der Gewebekultur und die Kallusbildung große Bedeutung hatten. Insbesondere die Lichtmenge erwies sich als limitierender Faktor für die Pflanzenqualität. Bei Mais führen suboptimale Kulturbedingungen zu einer verringerten Transformationsrate (Frame et al., 2000) und auch bei Sorghum ist bekannt, dass es bei Wasserstress und suboptimalen Temperaturverhältnissen während der Anzucht zu einem verringerten Wachstum der Embryonen und häufigem Absterben nach der Kokultur-Phase kommt (Carvalho et al., 2004).

Transformiert wurden laut Protokoll (Frame et al., 2002) unreife Embryonen. Diese eignen sich als schnell teilendes Gewebe sehr gut für eine Infektion mit *Agrobacterium* (Mahalakshmi und Khurana, 1997) und besitzen die Fähigkeit, präembryogenen Typ II-Kallus zu bilden, aus dem im Verlauf der Gewebekultur Pflanzen regeneriert werden können. Unreife Embryonen sind nur in der Phase der Differenzierung der ersten 1-2 Blattinitialen „kompetent“ für die Transformation mittels *Agrobacterium* (Schläppi et al., 1992). Es zeigte sich, dass die Embryonen mit einer Größe von 1,8-2,5 mm, im Gegensatz zu Frame et al. (2002) mit 1,5-2,0 mm, sehr gut für die stabile Transformation geeignet waren, aber selbst eine große Variation der Embryonengröße von 1,5-3,0 mm keine Limitierung für die T-DNA-Übertragung oder die Kallusbildung darstellte, wenn die Gewebekulturbedingungen individuell an die Größe und Qualität der Embryonen angepasst wurden (Anhang Tab. 5, Versuche 142-157).

Voraussetzung für die Produktion transgener Pflanzen ist eine erfolgreiche T-DNA-Übertragung von *A. tumefaciens* in die Pflanzenzelle. Die Übertragung der T-DNA kann in der transienten Expression verfolgt werden. Die Optimierung der transienten

Expression erwies sich als relativ einfach, aber es zeigte sich, dass eine hohe transiente Expression keine Aussage liefert über die zu erwartende stabile Expression. Ishida et al. (1996) beschreiben, dass das eigentliche Hauptproblem im Überleben der transgenen Zellen in der Gewebekultur besteht. In der transienten und stabilen Transformation wurde nachgewiesen, dass verschiedene Faktoren zwar die transiente Expression erhöhen, aber eine stabile Transformation hemmen und sogar verhindern können. Dazu zählen die Cystein- und *Agrobacterien*-Konzentration sowie der pH-Wert im Medium. In den Versuchen zur transienten Expression wurden zwei verschiedene Cystein-Konzentrationen verglichen (300 mg/l und 150 mg/l). Frame et al. (2002) wiesen eine Steigerung der transienten Expression, vor allem im basalen Bereich des Skutellums, durch die Zugabe von 300-400 mg/l Cystein nach. Ein Zusammenhang zwischen der Cystein-Konzentration im Kokultur-Medium und der Höhe der transienten Expression konnte in den vorliegenden Versuchen nicht bestätigt werden, sondern nur ein negativer Einfluss einer zu hohen Cystein-Konzentration (300 mg/l) auf die Kallusbildung.

Nach Akula et al. (2001) hat die Art und Konzentration der Salze im Kokultur-Medium einen starken Einfluss auf die Effizienz des T-DNA-Transfers bei Mais. Carvalho et al. (2004) beschreiben eine Erhöhung der transienten Expression bei Sorghum bei reduzierter Salzmenge (1/10 MS-Salze). Bei Mais konnten Zeng et al. (2004) die meisten stabil transformierten, GUS-positiven Klone mit reduziertem Salzgehalt erzielen (1/2 N6-Salze). Bei der stabilen Transformation wurde ebenfalls eine verbesserte Entwicklung eines Typ II-Kallus bei 1/2 N6-Salzen festgestellt und zudem entstanden bei diesen Versuchen mehr Linien, als bei Versuchen mit normaler Salzkonzentration. Grund für das vermehrte Auftreten stabil transformierter Zellen ist vermutlich, dass die *Agrobacterien* bei Reduktion des Stickstoffangebots im Medium auf das Pflanzengewebe übersiedeln. Wildtyp-*Agrobacterien* regen die Pflanze nach Übertragung des Ti-Plasmids durch Tumorbildung in den transformierten Pflanzenzellen zur Opininproduktion an. Opine sind eine Stickstoff- und Kohlenstoffquelle für die *Agrobacterien* (de la Riva et al., 1998).

Akula et al. (2001) stellen die Auswirkung verschiedener Temperaturen während der Kokultur dar, die höchste Effizienz beim T-DNA-Transfer trat bei 20-22 °C auf, während keine GUS-Expression bei 10-15 °C und nur eine sehr geringe bei 18 °C beobachtet werden konnte. Nach Frame et al. (2002) ist die Transformations-Effizienz bei 20 °C (6,2 %) nur geringfügig höher, als bei 23 °C (5,3 %). In dieser Arbeit wurden im

Gegensatz dazu bei der stabilen Transformation bei 21 °C gute Ergebnisse erzielt, bei 18 °C und 24 °C konnten keine Erfolge verzeichnet werden.

Ein wesentliches Problem war die eingesetzte *Agrobacterien*-Konzentration. Eine hohe Bakterienkonzentration (OD_{550nm} 1,4) führte zu einer erhöhten transienten Expression, aber bei der stabilen Transformation kam es bei Konzentrationen von mehr als OD_{550nm} 0,5 zu unkontrollierbarem Bakterienwachstum (bei pH 5,8) und dadurch verursachter starker Nekrosenbildung (Anhang Tab. 4) (vgl. Chugh und Khurana, 2003).

Nach dem T-DNA-Transfer müssen die Explantate zur Bildung von Typ II-Kallus angeregt werden. Erhebliche Auswirkungen auf die Kallusbildung und -entwicklung hatte der Wasserhaushalt. Während der Kokultur und der Subkultur der präembryogenen Typ II-Kalli und Klone führte eine zu hohe Luftfeuchte und Kondenswasser zu einer Stagnation in der Entwicklung. Bei Frame et al. (2000) werden zur besseren Ventilation die Verwendung hoher Petrischalen und „micropore tape“ während der Regeneration, nicht aber während der Kokultur, und die Verfestigung mit Gelrite nur in der Kokultur und Regeneration, empfohlen. Mit der Verwendung von Gelrite ergab sich während der Kokultur durch die enge Kontaktzone zwischen Medium und Explantat eine gute Versorgung des Embryos mit den Inhaltsstoffen, und auch in der Ruhe-Phase verbesserte sich die Kallusbildung wesentlich im Vergleich mit Phytoagar.

Es stellte sich heraus, dass zudem die Anpassung der Ruhe-Phase an die Qualität der Embryonen die Kallusbildung beeinflusst. Eine Verlängerung bis 14 Tage wurde bei suboptimaler Qualität (zu klein, sehr glasig) vorgenommen. Erst nach abgeschlossener Kallusbildung wurde Selektion angelegt, während die Embryonen bei Frame et al. (2002) bereits nach 4-7 Tagen auf Selektionsmedium umgesetzt werden.

Das Hauptproblem in der Gewebekultur stellte das Auftreten von Nekrosen dar. Nekrosen wurden durch zu viele *Agrobacterien* und durch zu frühe bzw. zu starke Selektion hervorgerufen, traten bereits in der Ruhe-Phase und verstärkt in den Selektionsphasen auf und führten häufig zum Absterben des gesamten Kallus.

Die durch *Agrobacterien* hervorgerufenen Nekrosen wurden insbesondere zum Problem, wenn sie den gesamten Kallus erfassten und durch die Bildung phenolischer

Komponenten alle Zellen vergifteten. Dieses Phänomen ist als “oxidative burst” bekannt, d. h. die schnelle, transiente Produktion großer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Wojtaszek, 1997). Der Auslöser ist die mangelnde Kompatibilität von Wirtspflanze und Pathogen. Da Monokotyledonen und damit auch Mais nicht zum natürlichen Wirtsspektrum von *A. tumefaciens* gehören (Ishida et al., 1996), kommt es bei einem Befall zu einer hypersensitiven Antwort (“hypersensitive response”) des Gewebes, einer Art induzierten Apoptose (Hansen, 2000). Dieser lokalisierte Zelltod am Ort der Infektion ist eine Resistenz- bzw. Abwehrreaktion der Pflanze, um den Befall einzudämmen (Wojtaszek, 1997; Hansen, 2000). Die hypersensitive Antwort der Pflanze als Teil des Unverträglichkeitsmechanismus zwischen Wirt und Pathogen ist bereits bei Wein (Yanofsky, 1985; Perl et al., 1996) und Sorghum (Carvalho et al., 2004) beobachtet worden. Unter normalen Bedingungen haben Pflanzen die Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies auch zu entgiften (Wojtaszek, 1997). Bei Stress überwiegt jedoch die rasche Produktion großer Mengen ROS, die in der Folge weitere Abwehrreaktionen aktivieren und letztendlich zum Absterben ganzer Zellbereiche führen, damit wird bei intakten Pflanzen der Pathogenbefall abgewehrt (Tenhaken et al., 1995). Gleiches geschieht auch in der Gewebekultur, die für die Pflanze einen enormen Stressfaktor darstellt. Je höher die eingesetzte *Agrobacterien*-Konzentration bzw. deren Wachstum und Aktivität ist, desto stärker fällt die Abwehrreaktion der Embryonen aus (Carvalho et al., 2004). Carvalho et al. (2004) beobachteten mittels SEM bei Sorghum-Embryonen, dass diese während der Kokultur nicht nur mit *Agrobacterien* bedeckt waren, sondern der ganze Embryo von einer Schicht organischen Materials umhüllt war, das von den Bakterien produziert wurde. Diese Embryonen entwickelten starke Nekrosen und bildeten statt eines Kallus eine Koleoptile.

Durch verschiedene Maßnahmen konnte dem Problem der Nekrosenbildung begegnet werden. Bei der stabilen Transformation wurde die eingesetzte Bakterienkonzentration (OD_{550nm} 0,2-0,3) kontrolliert, die überschüssige Bakteriensuspension („Abtupfen“, „Filterpapier“) nach der Inkubation der Embryonen entfernt und die Kokulturlänge auf 2-3 Tage begrenzt. Der Zusatz antioxidativer/antinekrotischer Substanzen (DTT, Ascorbinsäure) wurde optimiert. Antinekrotische Zusatzstoffe finden in der Gewebekultur häufig Verwendung. Bei Reis-Meristemkulturen wird Ascorbinsäure zur Senkung der Nekrosenbildung eingesetzt (Enriquez-Obregon, 1999). Perl et al. (1996) erwähnen unter anderem eine positive Wirkung des Antioxidans DTT auf die Transformationsfrequenz

bei der *Agrobacterien*-vermittelten Transformation von Wein. Zeng et al. (2004) schreiben ebenfalls, dass die Verwendung von Cystein und DTT zusammen im Kokulturm Medium die Entstehungsrate von stabilen GUS-positiven Klonen stark erhöht, insbesondere im Zusammenhang mit reduziertem Salzgehalt (1/2 N6-Salzen). DTT selbst hat antinekrotische Wirkung (Zeng et al., 2004) und außerdem die Eigenschaft, Disulfide zu reduzieren und überführt damit das durch den Zerfall von Cystein in wässriger Lösung entstehende Cystin zurück in die Cystein-Form. Somit bleibt im Medium längere Zeit eine stabile antinekrotisch wirksame Cystein-Konzentration erhalten. Ascorbinsäure wurde nur in wenigen Versuchen getestet (Versuch 86-88, 104). Insgesamt konnte zwar eine Verringerung nekrotischer Verbräunungen während der Gewebekultur beobachtet werden, doch aufgrund der geringen Anzahl der Versuche ist es nicht möglich eine gesicherte Aussage darüber zu treffen, ob die Transformationsrate durch Ascorbinsäure positiv beeinflusst werden kann.

Eine weitere wesentliche Veränderung war der Ersatz von Cefotaxim durch Timentin als Antibiotikum zur Kontrolle der *Agrobacterien*. Timentin war für das Maisgewebe verträglicher als Cefotaxim und erzeugte weniger Nekrosen.

Abweichend von Frame et al. (2002) wurde eine alternative Methode zur Klونغewinnung entwickelt. Im ursprünglichen Protokoll wird ein entstehender Klon erst nach der dritten bis sechsten Subkultur in der SII-Phase und ab 1 cm im Durchmesser vom übrigen Gewebe getrennt. Außerdem ist keine regelmäßige Säuberung des Klons von nekrotischem Gewebe vorgesehen (Frame, pers. Mitt.). Mit dieser Vorschrift konnten keine Erfolge erzielt werden. Es zeigte sich, dass eine frühe Entnahme des Typ II-Kallus in der SI-Phase, Subkultur auf geringer Selektion (1,5 mg/l Bialaphos) bis zur Entwicklung eines Klons und kontinuierliche Säuberung des Gewebes wesentlich für die Entstehung einer transgenen Linie waren. Insgesamt wurde eine deutliche Verbesserung der Gewinnung transgener Linien, verglichen mit dem Protokoll von Frame et al. (2002) erreicht.

Der Einfluss der einzelnen Schritte auf die Transformations-Effizienz kann wie folgt beziffert werden. In der ersten Etablierungsphase wurden zunächst keine Erfolge verzeichnet, auch nicht mit genauer Befolgung des Protokolls von Frame et al. (2002) (Anhang Tab. 5, Versuche 1-77). In der zweiten Etablierungsphase führte die durch die

Verwendung von Timentin als Antibiotikum verbesserte Kallusentwicklung zu einer Transformationsrate von 0,2 % (Versuche 78-108). Die Optimierung weiterer Faktoren, wie zusätzliches Entfernen der *Agrobacterien*-Suspension, Verwendung von DTT und Isolierung des Typ II-Kallus in der ersten Subkultur der SII-Phase und dessen Subkultur auf geringerer Selektion (1,5 mg/l Bialaphos) in der dritten Etablierungsphase führten zu einer Erhöhung der Transformationsrate auf 1,0 % (Versuche 110-141). Erst die Isolierung des präembryogenen Typ II-Kallus bereits nach der SI-Phase, die Optimierung des Wasserhaushalts (Gelrite zur Verfestigung auch im Ruhe-Medium) und eine verkürzte Kokultur (2-3 Tage) ermöglichten eine Transformationsrate von 2,2 % in der vierten Etablierungsphase (Versuche 142-157).

Diese Rate liegt im Bereich der in anderen Veröffentlichungen genannten Werte (Frame et al., 2002; Mohamalawari et al., 2002; Chugh und Khurana, 2003; Zeng et al., 2004). Die erzielte Transformationsrate ist ausreichend für den Zweck der Erzeugung transgener Pflanzen zur Analyse von Reportergenkonstrukten. Zudem können die transgenen Pflanzen mit einem vertretbaren Aufwand erzeugt werden.

4.2 Charakterisierung der transgenen Pflanzen

In der Segregationsanalyse wurden 21 Pflanzen unterschiedlicher Linien oder Geschwisterpflanzen untersucht. Mehr als 3/4 der Pflanzen mendelten in Bezug auf das Resistenzgen, bei den übrigen Pflanzen traten mehr transgene Pflanzen als erwartet auf. Dies kann durch unabhängige Integration verschiedener DNA-Kopien in das Pflanzengenom zustande kommen. Die mittels Southern-Blot-Hybridisierung untersuchten 12 Pflanzenlinien zeigten zudem Integration von „backbone“-DNA.

Bei der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation kann die übertragene T-DNA zum einen als einzelne Kopie oder als tandemartig angeordnete Vielzahl an Kopien in Transgenen auftreten (de Block et al., 1984; Spielmann und Simpson, 1986; Jorgensen et al., 1987; Deroles und Gardner, 1988). Bislang wurde angenommen, dass nur T-DNA innerhalb der linken und rechten T-DNA-Grenze in das Pflanzengenom integriert wird (Zambryski, 1992), jedoch wurde bereits bei Ooms et al. (1982) von transformiertem pflanzlichen Tumorgewebe berichtet, in dem T-DNA-Bereiche mit Sequenzen des Ti-Plasmids außerhalb der linken T-DNA-Grenze nachgewiesen wurden. Martineau et al.

(1994) beschreiben, dass nach *Agrobacterien*-vermittelter Transformation etwa 20-30 % der getesteten Transgenen auch Plasmid-DNA-Rückgrat integriert haben, nach Shou et al. (2004) weisen 75 % der durch Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* erzielten Maispflanzen „backbone“-DNA-Sequenzen auf. Dies führt somit zum Auftreten größerer Fragmente bei der Analyse der Transgenen mittels Southern-Blot-Hybridisierung.

Die Übertragung von Plasmid-„backbone“-DNA kann dadurch zustande kommen, dass während der T-DNA-Ausbildung im Bakterium das Ablesen der Sequenzen nicht an den T-DNA-Grenzen stoppt, sondern in die Plasmid-DNA übergeht (Stachel et al., 1987; Veluthambi et al., 1988). Diese „backbone“-Sequenzen des Vektors können entweder unabhängig von der T-DNA oder an eine der T-DNA-Grenzen gebunden in das Pflanzengenom integriert werden (Kononov et al., 1997). Eine Bindung an die linke T-DNA-Grenze kann auftreten, wenn bei der T-Strang-Bildung die linke Grenze „übersehen“ und die Plasmid-DNA darüber hinaus abgelesen wird (Ooms et al., 1982). Dieser Vorgang kann auch von der linken zur rechten T-DNA-Grenze ablaufen (Kononov et al., 1997).

Nach Vain et al. (2004) hängt die Integration von „backbone“-Sequenzen von der Art der eingebauten *vir*-Gene ab. Es wurde gezeigt, dass zusätzliche *vir*-Gene zwar keinen Einfluss auf die Kopienzahl, den Prozentsatz exprimierender Pflanzenlinien und das Expressionsniveau transgener Reispflanzen haben. Aber der Einbau mutierter *virG*-Gene, steigert die Transformationseffizienz bei Tabak und Baumwolle (Hansen et al., 1994), erhöht aber gleichzeitig die Integration von „backbone“-DNA auf das Doppelte, während der Einbau einer anderen Mutante *virGwt* die Integration verhindert (Vain et al., 2004). Die T-DNA-Vektoren und *Agrobacterien*-Stämme zur Transformation von Monokotyledonen wurden aufgrund ihrer Eigenschaft des effizienten Transfers, gemessen an der Ausbildung transgener Zelllinien ausgewählt. Mit diesem effizienten Transfer könnte eine Steigerung des artifiziellen Transfers von „backbone“-Sequenzen einhergehen, der für alle in dieser Arbeit untersuchten, mit dem Vektor pTF 102 und dem *Agrobacterien*-Stamm EHA 101 transformierten Transgenen, nachweisbar war. Dasselbe System wird bei Frame et al. (2002) verwendet, es wird jedoch keine Integration von „backbone“-DNA erwähnt. Es ist unklar, welche Faktoren im Transformationsprotokoll Einfluss auf die Art der transferierten T-DNA haben.

Bei der *Agrobacterien*-vermittelten Transformation ist eine Kopienzahl von durchschnittlich 3 Kopien (Spencer et al., 1992) zu erwarten, beim Goldpartikelbeschuss können es auch 100 Kopien sein (Shou et al., 2004). Bei den hier dargestellten Versuchen wurde eine Kopienzahl von 2-18 Kopien mit „backbone“-Sonde und von 1-30 Kopien mit GUS-Sonde nachgewiesen. Im Gegensatz zum Goldpartikelbeschuss wird mittels *Agrobacterium* die vollständige T-DNA übertragen, während beim Beschuss auch Fragmentbruchstücke übertragen und integriert werden können (Taylor und Fauquet, 2002). Dies konnte anhand der vorliegenden Versuche bestätigt werden, die keinen Hinweis auf Integration von Fragmenten der T-DNA geben. Eine hohe Kopienzahl kann zu Kosuppression und „Silencing“ führen (Matzke und Matzke, 1998; Vaucheret et al., 1998; Fagard und Vaucheret, 2000; Dai et al., 2001). Bei der Kosuppression wird doppelsträngige RNA gebildet, welche die Degradierung einer Ziel-RNA initiiert und damit „post-transcriptional gene-silencing“ (pTGS) auslöst (Vance und Vaucheret, 2001). „transcriptional gene-silencing“ (tGS) entsteht hauptsächlich durch Methylierung von Promotorsequenzen (Taylor und Fauquet, 2002), sowie Neuordnung der DNA und die Integration der DNA in Bereiche mit hoch kondensierter Chromatinstruktur (Matzke, 1994; 1996; Kumpatla, 1998; Muskens et al., 2000; Vaucheret und Fagard, 2001; Taylor und Fauquet, 2002).

Das Auftreten vieler Kopien und die dadurch verursachten Probleme können die Expressionsanalyse anhand stabil transformierter Pflanzen problematisch machen. Lösung für die Erzielung einer geringeren Kopienzahl wäre die Reduktion der *Agrobacterien*-Konzentration auf die gerade noch wirksame Menge oder die Verwendung von Vektoren und *Agrobacterien*, die eine geringere Tendenz zum Transfer artifizieller T-DNA aufweisen. Darüber hinausgehende Ansätze liegen in der Anwendung der Cre-*lox* Rekombinase-vermittelten, ortsspezifischen Integration. In diesem System ist es möglich, Pflanzen zu erzeugen, die nur eine Kopie des Transgens an einer vorbestimmten Stelle tragen (Day et al., 2000).

4.3 Analyse der Reportergenkonstrukte

Die Promotor-Deletions-Analyse zur Identifizierung regulatorischer Elemente gehört zu den Standardmethoden zur Untersuchung von Genen (z. B. Analyse der ADH-Aktivität in *Petunia*; Garabagi et al., 2005). Diese kann entweder mit transient oder mit stabil transformierten Pflanzen durchgeführt werden. Der Vorteil einer transienten Analyse ist die Erzielung von Ergebnissen nach vergleichsweise kurzer Zeit. Eine erfolgreiche transiente Analyse mit Deletions-Reporter-GUS-Konstrukten zur Identifizierung regulatorischer Elemente im *Hrgp*- (*hydroxyproline-rich glycoproteins*) Promotor bei Mais wurde von Menossi et al. (2003) durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die GUS-Expression in unterschiedlichen Geweben verschiedener Entwicklungsstufen, Koleoptilen und Embryonen, variiert, die Lage der jeweils notwendigen *cis*-Elemente konnte identifiziert werden. Zudem führte das Einklonieren eines Introns zu einer Expressionssteigerung. Dass die Integration eines Introns eine Steigerung der Genexpression zur Folge hat, wird auch in früheren Arbeiten mit Reis (Fiume et al., 2004) und Mais (Köhler et al., 1996) dargestellt. Es ist bekannt, dass die Expression einiger Gene sehr stark von der Anwesenheit eines Introns abhängt bzw. nur mit Intron möglich ist (Luehrsen und Walbot, 1991). Die Expressionssteigerung kommt durch das „Heraussplicen“ des Introns zustande. Luehrsen und Walbot (1991) bestätigen diese Annahme und beschreiben die Erhöhung der Expression entweder auf transkriptionaler Ebene durch Stimulation der Transkriptionsinitiation, oder auf posttranskriptionaler Ebene durch verbesserte mRNA-Stabilität bzw. verstärkten mRNA-Export ins Cytoplasma. Daneben können Introns selbst Enhancer-Elemente enthalten (Beispiele bei Bornstein et al., 1987; Cohen und Levinson, 1988; Evans und Scarpulla, 1988).

Die transiente Analyse mittels Goldpartikelbeschuss ist nicht für die *Igl*-Reportergenkonstrukte geeignet, da die Genexpression durch Verwundung des Gewebes induziert wird, die Präparation des Gewebes und der Beschuss selbst genau solch eine Verwundung darstellen, und damit keine den *in vivo*-Bedingungen entsprechende Analyse möglich ist. Auch für die *Bx*-Gene stellte die gewebespezifische Expression ein Problem dar, da keine Expression in der Epidermis stattfindet. Durch quantitative PCR wurden Mesokotylexplantate als am besten geeignetes Gewebe bestimmt, da in diesen die endogene *Bx*-Genexpression am höchsten war. Durch Längsteilung der Mesokotyle wurde eine Zellschicht von *Bx*-Gen-exprimierenden Zellen freigelegt. Als optimale Positivkontrolle erwies sich das Ubi-GUS-Konstrukt. Christensen und Quail (1996)

beschreiben, dass der Mais-Ubiquitin-Promotor in Monokotyledonen, selbst in frühen Entwicklungsstadien (Xu et al., 2002) und in fast allen Geweben hoch aktiv ist, und sich damit sehr gut für die Steuerung der Expression von Reporter Genen zur Kontrolle eignet. Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben die Verwendung des Mais Ubi-1 Promotors bei Mais (Christensen et al, 1992; Gallo-Meagher und Irvine, 1993) und verschiedenen anderen Monokotyledonen-Spezies wie Reis (Bruce et al., 1989; Cornejo et al., 1993; Uchimiya et al., 1993) oder Zuckerrohr (Gallo-Meagher et al., 1993). Beim Goldpartikelbeschuss zeigte Ubi-GUS in Mesokotylhälften hohe Aktivität.

Von den für den Goldpartikelbeschuss verwendeten *Bx4*-Konstrukten sollte das größte, P2.1T650-GUS, die für die Promotoraktivität verantwortlichen regulatorischen Elemente enthalten. Nach Tagu et al. (1992) weisen die ersten 600 bp des *Hrgp*-Promotors Sequenzen auf, welche die Expression am meisten beeinflussen. Es ist zudem bekannt, dass die Stärke der Expression durch Intronsequenzen erhöht wird, daher wird häufig das Alkoholdehydrogenase- (*Adh*) Intron aus Mais in Expressionskonstrukte eingebaut (Luehrsen und Walbot, 1991). Aus diesem Grund wurde wie bei Menossi et al. (2003) die Expression der *Bx4*-Konstrukte parallel mit Intron und ohne Intron untersucht. Mit Intron konnte die Expression des Kontrollkonstruktes Ubi-GUS gesteigert werden, bei den *Bx*-Konstrukten zeigte sich kein Einfluss des Introns. Bei den *Bx4*-Konstrukten konnte insgesamt nur eine geringe Expression nachgewiesen werden, die zur Definition möglicher *cis*-Elemente unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht ausreichte. Mit weiteren Optimierungen der Bedingungen könnte dieser Ansatz erfolgreich sein. So weist sehr junges Gewebe, wie 2 Tage alte Mesokotyle, eine höhere Expression der endogenen *Bx*-Gene auf, und wäre ein geeigneteres Ausgangsmaterial.

Die Untersuchung stabil transgener Pflanzen bietet, im Gegensatz zur transienten Analyse, die Möglichkeit, beliebiges Pflanzengewebe in unterschiedlichsten Entwicklungsstadien unter definierten Bedingungen zu analysieren. Die Promotoranalyse transgener Maispflanzen ist aufwändig und zeitintensiv, da die stabile Transformation von Mais mit *Agrobacterium* bislang kein Routineverfahren darstellt. Jedoch ist es notwendig, Reporter Genkonstrukte mit Mais-Promotorfragmenten in Mais zu untersuchen, da Ergebnisse, die auf der Untersuchung anderer Spezies basieren, nicht ohne weiteres übertragen werden können (siehe Kortes, 2003). Als Reporter Gen für die Konstrukte wurde *UidA* (GUS) (Jefferson et al., 1987) gewählt, da dies eine optische Bonitierung der

Expression ohne größeren Aufwand erlaubt. Als problematisch erwies sich das Auftreten unspezifischer Färbungen (siehe „3.2.2 Analyse der Reporter-Gen-Expression“) und fehlende Dynamik des Systems, was die Analyse der Genexpressionen in verschiedenen Entwicklungsstadien erschwerte.

4.3.1 Analyse der *Bx1*- und *Bx2*-Reporter-Gen-Konstrukte

Zur Identifizierung von *cis*-Elementen auf dem *Bx1*-Promotor wurden Deletions-Reporter-Gen-Konstrukte der Länge 870 bp, 1,3 kb und 1,8 kb mittels *Gus*-Genexpression bei 4 unabhängigen Linien in verschiedenen Geweben untersucht. Für die funktionelle Überprüfung des bei Martin (2003) beschriebenen *Bx2*.box-Motivs TAATT wurden die Reporter-Gen-Konstrukte *Bx2*.box 0,6 kb und *Bx2*.mut 0,6 kb in 5 Linien stabil transformierter Maispflanzen analysiert. Martin (2003) konnte eine spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren *ZmHD-Zip1* und -2 in Yeast-One-Hybrid- und *in vitro*-Experimenten an dieses Motiv nachweisen. In transienten Studien mit Maisprotoplasten zeigte sich eine Steigerung der GUS-Expression des Reportergens *Bx2*.box durch die Expression der Transkriptionsfaktoren, mit analogen Reporter-Gen-Konstrukten mit dem *Bx2*.mut-Motiv blieb diese Steigerung aus.

Bei *Arabidopsis* beträgt die durchschnittliche Größe des Gesamtpromotors 2,0-3,0 kb. Dies wird aus der Genverteilung geschlossen: die Promotorsequenz liegt zwischen dem 3'-Ende des 5'-gelegenen Gens und dem 5'-Ende des untersuchten Gens. Bei Mais ist dieser „Gen zu Gen“-Abstand meist so groß, dass der Promotorbereich auf diese Weise nicht begrenzt werden kann. Eine Ausnahme bildet der zwischen dem *Bx1*- und *Bx2*-Gen gelegene *Bx2*-Promotor. Dieser Abstand beträgt 1,8 kb, innerhalb dieser Sequenz müssen verantwortliche *Bx2*-Promotor-*cis*-Elemente lokalisiert sein. In der Tat konnte mit den *Bx2*-Reporter-Gen-Konstrukten Genaktivität nachgewiesen werden. In der histochemischen Analyse verschiedener Gewebekulturstadien der T₀- und T₁-Generationen von *Bx2*.box 0,6 kb und *Bx2*.mut 0,6 kb ergab sich ein spezifisches Expressionsmuster in der Koleoptile in einem frühen Entwicklungsstadium. Die dazu notwendigen Sequenzen liegen auf dem 0,6 kb-upstream-Fragment des Promotors. Das hier lokalisierte *Bx2*.box-Motiv TAATT ist allerdings nicht verantwortlich für diese spezifische Expression, da auch mit mutiertem Motiv *Bx2*.mut Expression auftrat (siehe „3.2.2.1 *Bx*-Reporter-Gen-Konstrukte“). Diese beiden Konstrukte unterscheiden sich nur in der Stabilität der Ausprägung des

Expressions-musters. Bei den *Bx2.mut*-Konstrukten wiesen nicht alle untersuchten Linien eine Expression auf, und in der Nachkommenschaft ist die Ausprägung nicht stabil. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass ein die Expression stabilisierender Faktor, möglicherweise einer der Transkriptionsfaktoren *ZmHDZip1* oder *ZmHDZip2*, an das *Bx2.box*-Motiv bindet. Die gefundene Expression in der Koleoptile hängt allerdings nicht von einer WT-*Bx2.box* ab. Hierfür notwendige *cis*-Elemente bzw. Transkriptionsfaktoren müssen noch identifiziert werden. Dieses Expressionsmuster ist Teil des Musters, das die *Bx*-Gene, also auch das *Bx2*-Gen, aufweisen. Nach Schmäzlin (2003) tritt bei den Genen *Bx1*, *Bx3*, *Bx8* und *Bx9* starke Expression im Mesokotyl, in jungen Blättern und der Differenzierungszone der Wurzel auf, welche bei den *Bx2*-Reporter-genkonstrukten in den vorliegenden Versuchen fehlt. Weitere 5'-Elemente, 3'-Elemente, oder Elemente im Intron sind somit für eine Ausprägung des Gesamtmusters notwendig. Die Konstrukte *Bx2.box* 0,8 kb und *Bx2.mut* 0,8 kb stehen für weitere Analysen bereit.

Das *Bx2.box*-Motiv findet sich auch in den Promotoren der Gene *Bx1*-*Bx5* sowie *Bx8* und *Bx9* (Martin, 2003). Es könnte sich bei diesem Sequenzelement prinzipiell um ein die Expression der *Bx*-Gene verstärkendes Element handeln. Die Expression könnte durch Binden von *ZmHDZip1* oder *ZmHDZip2* vermittelt werden. Die Analyse der Expression des Reportergens und der endogenen *Bx*-Gene in transgenen Pflanzen, die diese Transkriptionsfaktoren überexprimieren sollen, kann diese Interaktion bestätigen. Die Regeneration von transgenen Pflanzen mit Ubiquitin-Promotor-*ZmHDZip1*- oder *ZmHDZip2*-Konstrukten wurde dazu begonnen.

Bei der Analyse der *Bx1*-Reporter-genkonstrukte konnte bei keiner Linie mit keinem analysierten Konstrukt in der Gewebekultur oder im Keimling GUS-Expression beobachtet werden. Keines der Konstrukte umfasst also Sequenzelemente, die eine Expression des Transgens vermitteln. Dies ist bei einem Umfang der 5'-upstream-Sequenzen von bis zu 1,8 kb unerwartet, da der proximale Promotorbereich im Bereich von 0,5 kb-upstream-Sequenzen erwartet wird. So finden sich, wie bereits erwähnt, z. B. im 600 bp-upstream-Bereich des *Hrgp*-Promotors Sequenzen, die für eine gute Expression ausreichend sind (Tagu et al., 1992). Verschiedene transgenaktive Maispromotoren umfassen Längen von ca. 0,5 kb (CamV(35S)-Promotor) bis 1,5 kb (Ubiquitin-Promotor), und auch der DR5-Promotor erstreckt sich über diesen Größenbereich. Dieser artifizielle Promotor vermittelt eine spezifische Genexpression in Abhängigkeit von Auxin durch die 7fache Wiederholung

des Auxin-Response-Elements, fusioniert mit dem 35S-Minimalpromotor und der TMV Ω -Sequenz (Ulmasov et al., 1997).

Es ist möglich, dass die untersuchten upstream-Sequenzen des *Bx1*-Gens für eine Expression nicht ausreichen, die für eine Genexpression notwendigen Elemente im nicht untersuchten downstream-Bereich liegen oder dass die Expression der gesuchten Elemente durch Repressoren unterdrückt wird. Weiter könnte die Anwesenheit von Introns erforderlich sein. Die *Bx*-Gene *Bx1*-*Bx5* bilden ein Gencluster auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (Frey et al., 1997). Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass diese Gene gemeinsam über weitgreifende Chromatin-basierende Mechanismen reguliert werden können. Es wird angenommen, dass solche regulatorischen Einheiten „loops“ bilden, die von sogenannten matrix attachment regions (MARs) flankiert werden. Daher ist es möglich, dass die Hauptkomponenten für die Expression nicht die Sequenzelemente selbst sind, sondern die Chromatinstruktur, die dieses Cluster aufweist („Positionseffekt“). Fukuda und Nishikawa (2003) wiesen in transienten Expressionsstudien solche weitgreifenden Effekte nach. MARs erhöhen die Expression eines downstream gelegenen Transgens. Als Mechanismus wird postuliert, dass sie downstream lokalisierte Enhancer-Elemente aktivieren oder das Öffnen des Chromatins im Bereich des Promotors vermitteln, wodurch eine verstärkte Transkription stattfindet. Bei Tabak konnte zudem eine Reduktion des Positionseffekts durch das Transgen flankierende MARs nachgewiesen werden (Han et al., 1997), d. h. MARs können abschirmend auf Signale der angrenzenden Chromatinbereiche wirken. Über die Chromatinstruktur des *Bx*-Clusters ist nichts bekannt.

Die fehlende Expression bei den *Bx1*-Konstrukten kann aber auch artifiziell sein. Wie in der Southern-Blot-Analyse (siehe „3.2.1 Integrationsmuster und Kopienzahl der T-DNA“) festgestellt wurde, waren in den Transgenen Kopienzahlen von 1-30 Kopien nachweisbar. Wie beschrieben, können durch die Integration vieler Kopien in einer Zelle „Silencing“-Effekte oder Kosuppression auftreten, durch die eine vorhandene Expression verhindert wird (Matzke und Matzke, 1998; Vaucheret et al., 1998; Fagard und Vaucheret, 2000; Dai et al., 2001). Allerdings erstreckt sich das „Silencing“ im Fall der *Bx1*-Reportergenkonstrukte in der T₁-Generation nicht auf das Resistenzgen, da die Pflanzen für dieses Merkmal mendeln. Zur detaillierteren Analyse der *Bx1*-Reportergenkonstrukte müssen weitere unabhängige, stabil transformierte Pflanzenlinien in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedlichen Analysen unterworfen werden. Erst dann kann eine

Aussage darüber getroffen werden, ob die fehlende Expression bei den bisherigen Analysen auf transformationsspezifische Probleme in den untersuchten Pflanzen (z. B. „Silencing“) zurückzuführen ist. Weitere transgene Linien für die *Bx1*-Konstrukte sind demnächst für Analysen verfügbar (siehe Tab. 8).

4.3.2 Untersuchung der *Igl*-Reporter-genkonstrukte

Die histologische Analyse der *Igl*-Promotorgenkonstrukte MID 3,7 kb, TA 0,7 kb und no motive 0,36 kb erwies sich als nicht sinnvoll. Wesentlich ist, dass die *Igl*-Expression transient ist, eine transiente Expression von *Igl* ist aber wegen der Stabilität des GUS-Enzyms und der Akkumulation des gebildeten Farbstoffs mit dem GUS-Reporter-gen nicht zu verfolgen. Daher erfolgte eine Untersuchung mittels quantitativer RT-PCR nach jeweils zweistündiger Induktion durch Verwundung und Elicitor. Die Induktion von *Igl* ist unterschiedlich für verschiedene Maislinien, geringste steady-state-Mengen des Transkripts und höchste Raten nach Induktion (ca. 10fache Steigerung durch Verwundung und 50fache Steigerung bei zusätzlicher Elicitor-gabe) wird in der *bx1bx1*-Mutante gefunden (Frey et al., 2000). Die Linie „Hi-II“ hat eine größere Ausgangsmenge an *Igl*-Transkript, Verwundung und Elicitor-gabe führen jedoch, verglichen mit der *bx1bx1*-Mutante, zu einer geringeren Steigerung der Transkriptmenge. Die Elicitor-gabe bewirkte nur eine Verdopplung der Transkriptmenge verglichen mit der Verwundung (Ergebnis nicht dargestellt). Bei den untersuchten transgenen Pflanzen handelt es sich um Kreuzungen der transgenen T₀-Pflanzen mit *bx1bx1* (MID 3,7 kb und TA 0,7 kb) bzw. mit „Hi-II“ (no motive 0,36 kb). Entsprechend lief in den mit „Hi-II“ gekreuzten Transgenen die Induktion von *Igl* weniger effizient ab und ergab eine insgesamt nur 3fache Erhöhung der Transkriptmenge durch Verwundung bzw. Elicitor-gabe (siehe Abb. 29). Kreuzungen von „Hi-II“ mit *bx1bx1* ergaben intermediäre Werte.

Beim no motive 0,36 kb-Konstrukt unterscheidet sich die GUS-Expression bei beiden untersuchten Linien. Nur die Linie 2 reagierte mit einer Steigerung der *Gus*-Transkriptmenge auf Induktion durch Verwundung, die Linie 1 dagegen ließ sich nicht induzieren. Dieses unterschiedliche Verhalten lässt sich möglicherweise auf Positionseffekte bei der Integration der DNA ins Pflanzengenom zurückführen.

Alle drei in transgenen Pflanzen analysierten Konstrukte vermitteln eine, verglichen mit dem endogenen Gen, hohe Grundexpression. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Einsatz der gleichen Reporter-genkonstrukte in Gerste und *Arabidopsis thaliana* (Kortes, 2003). In Gerste konnte keine Expression nachgewiesen werden, bei *Arabidopsis* trat eine definierte GUS-Färbung in abgegrenzten Geweben auf, bei TA 0,7 kb ist sie begrenzt auf die Hydathoden, während beim no motive 0,36 kb-Konstrukt keine Expression nachzuweisen war (Kortes, 2003). Eine entsprechende gewebespezifische Expression konnte in transgenem Mais nicht beobachtet werden (siehe Abb. 26). Die hohe Expressionsrate in der unverletzten Pflanze könnte auf die hohe Kopienzahl des Transgens zurückzuführen sein. Bereits die no motive 0,36 kb-5'-upstream-Promotorsequenz vermittelt diese basale Promotoraktivität und eventuell eine Wundinduktion. Für die MID 3,7 kb- und TA 0,7 kb-Konstrukte stand jeweils nur eine transgene Pflanze zur Verfügung. Das Beispiel der no motive 0,36 kb-Pflanzen zeigt, dass Einzelergebnisse nicht verallgemeinert werden dürfen. Gemessene Transkriptmengen und die Verteilung der putativen Promotorelemente in den Reporter-genkonstrukten lassen jedoch vermuten, dass mit der 0,36 kb-upstream-Sequenz der minimal notwendige Promotorbereich vorliegt, und weiter im Bereich der 3,7 kb-upstream-Sequenz Elemente für eine Elicitorinduktion lokalisiert sein können. Es muss also mit weiteren transgenen Pflanzen überprüft werden, ob in der Tat mit dem 3,7 kb-Promotorfragment eine, wenn auch moderate, Steigerung der *Bx*-Genexpression durch Elicitorgabe vermittelt wird.

Von drei Genen, *Bx1*, *Bx2* und *Igl*, für die Promotor-Reporter-genkonstrukte in transgenen Pflanzen analysiert wurden, konnte für zwei eine Expression nachgewiesen werden, die mit einem Teilmuster der endogenen Genexpression übereinstimmt. Damit erwies sich dieser Ansatz der Promotoranalyse mittels Reporter-genkonstrukten als sinnvoll, auch wenn diese Art der Analyse transgener Pflanzen großen zeitlichen und materiellen Aufwandes bedarf.

5 Zusammenfassung

Der Sekundärmetabolit DIMBOA ist ein natürliches Pestizid und Insektizid der Maispflanze. Die an der Biosynthese beteiligten *Bx*-Gene weisen ein ähnliches Expressionsmuster in Bezug auf den zeitlichen Verlauf und die Gewebespezifität ihrer Transkripte auf. Die stärkste Expression wird im Maiskeimling gefunden. Das *Igl*-Gen ist an einer indirekten Abwehrstrategie der Maispflanze beteiligt. Herbivorbefall induziert *Igl*-Expression und führt zur Freisetzung von Indol, das als Signal für Parasiten der Herbivore dient. In dieser Arbeit wurden Promotoranalysen mit Reportergenkonstrukten für die Gene *Bx1*, *Bx2* und *Igl* in stabil transgenen Maispflanzen durchgeführt, mit dem Ziel, Komponenten der Genregulation dieser abwehrrelevanten Biosynthesen zu identifizieren. Die dafür notwendige Erzeugung transgener Maipflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens* wurde etabliert. Mit *Bx4*-Reportergenkonstrukten wurde zudem eine transiente Analyse mittels Goldpartikelbeschuss durchgeführt.

Für eine erfolgreiche stabile Transformation unreifer Maisembryonen mit *A. tumefaciens* mussten sowohl die Anzuchtbedingungen der Spenderpflanzen im Gewächshaus, als auch die Infektion der Embryonen mit *Agrobacterium* und die Gewebekulturbedingungen bis zur Regeneration der transgenen Pflanze etabliert und optimiert werden. Diese Optimierungen führten zu einer Transformationsrate von 2,2 %. Die Analyse der transgenen Pflanzen mittels Southern-Blot-Hybridisierung ergab eine Kopienzahl von 1-30 Kopien, sowie die Integration von Plasmid-DNA („backbone“-DNA) in das Pflanzengenom.

Die zur Identifizierung regulatorischer *cis*-Elemente im *Bx1*-Promotor transformierten Deletions-Reportergenkonstrukte *Bx1/870* bp, *Bx1/1,3* kb und *Bx1/1,8* kb wiesen in keinem Gewebe in den jeweils untersuchten Entwicklungsstadien *Gus*-Genexpression auf.

Für die *Bx2*-Reportergenkonstrukte *Bx2.box* 0,6 kb und *Bx2.mut* 0,6 kb konnte eine Expression in frühen Entwicklungsstadien in der Gewebekultur und in Keimlingen nachgewiesen werden. Die Expression ist in der Koleoptile begrenzt auf die Leitbündel und umgebenden Gewebe.

Alle *Igl*-Reportergergenkonstrukte (0,36 kb- bis 3,7 kb-5'-upstream-Sequenzen) zeigen eine hohe basale Expressionsrate, die durch Verwundung erhöht wird. Die diese Reaktion vermittelnden DNA-Motive müssen noch bestimmt werden.

Die parallel durchgeführte, transiente Analyse mit *Bx4*-Reportergergenkonstrukten zeigte unter den vorliegenden Bedingungen nur eine geringe Genexpression, die zur Identifizierung von *cis*-Elementen nicht ausreichte. Die zusätzliche Verwendung eines Introns als Enhancer führte nur beim Kontrollkonstrukt (Ubi-GUS-Intron) zu einer Steigerung der Genexpression. Für eine erfolgreiche transiente Analyse der übrigen *Bx*-Reportergergenkonstrukte sind die bislang erfolgten Optimierungen nicht ausreichend.

6 Literatur

Agbios, GM Database, MON88017, Monsanto Company, Abstract, <http://www.agbios.com>, Stand August 2005

Akula C., Akula A., Droessler B., Sidorenko L., Kaeppler S., Chandler V., Kaeppler H. (2001) High efficiency *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer into maize immature embryos. 43rd Maize Genetics Conference, March 15-18, 2001, Grand Geneva Resort, Lake Geneva, Wisconsin, P100

Alborn H. T., Turlings T. C. J., Jones T. H., Stenhagen G., Loughrin J. H., Tumlinson J. H. (1997) An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, Vol. 276, S. 945-949

Armstrong C. L., Green C. E., Phillips R. L. (1991) Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genet. Coop. Newslett.*, Vol. 65, S. 92-93

Armstrong C. L., Parker G. B., Pershing J. C., Brown S. M., Sanders P. R., Duncan D. R., Stone T., Dean D. A., Deboer D. L., Hart J., Howe A. R., Morrish F. M., Pajean M. E., Petersen W. L., Reich B. J., Rodriguez R., Santino C. G., Sato S. J., Schuler W., Sims S. R., Stehling S., Tarochione L., Fromm M. E. (1995) Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Sci.*, Vol. 35, S. 550-557

Armstrong C. L. (1998) The first decade of maize transformation: a review and future perspectives. *Maydica*, Vol. 44, S. 101-109

Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2001) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg

Birnboim H. C. und Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acides Res.*, Vol. 7, S. 1513-1523

Blatter R. und Wolfe M. S. (1995) Die Verwendung molekularbiologischer Technologien zur Erzeugung von Wirtsresistenz gegen Schadenserreger: Mögliche Folgen bezüglich einer Anpassung der Krankheiten und Schädlinge. ETH, Institut für Pflanzenwissenschaften, Bereich Phytomedizin, Gruppe Pathologie, LFW, Zürich

Bomstein P., McKay J., Morishima J. K., Devarayalu S., Grelinas R. E. (1987) Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human alpha-1(I) collagen gene. *PNAS*, Vol. 84, S. 8869-8873

Borevitz J. O., Xia Y., Blount J., Dixon R. A., Lamb C. (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, Vol. 12(12), S. 2383-2394

Bruce W. B., Christensen A. H., Klein T., Fromm M., Quail P. H. (1989) Photoregulation of a photochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment. *PNAS*, Vol. 86, S. 9692-9696

- Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. (1987) XL1Blue: A high efficiency plasmid transforming red A Escherichia coli strain with beta-glucosidase selection. *Biotechniques*, Vol. 5, S. 376-379
- Cambier V., Hance T., de Hoffmann E. (2000) Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. *Phytochem.*, Vol. 53, S. 223-229
- Carvalho C. H. S., Zehr U. B., Gunaratna N., Anderson J., Kononowicz H. H., Hodges T. K., Axtell J. D. (2004) *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genet. Mol. Biol.*, Vol. 27(2), ISSN 1415-4757, S. 259-269
- Christensen A. H., Sharrock R. A., Quail P. H. (1992) Maize polyubiquitin gene: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promotor activity following transfer to protoplasts by electroporation *Plant Mol. Biol.*, Vol. 18, S. 675-689
- Christensen A. H. und Quail P. H. (1996) Ubiquitin promotor-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, Vol. 5, S. 213-218
- Chugh A. und Khurana P. (2003) Herbicide-resistant transgenics of bread wheat (*T. aestivum*) and emmer wheat (*T. dicoccum*) by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated approaches
- Cohen J. B. und Levinson A. D. (1988) A point mutation in the last intron is responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-ras oncogene. *Nature*, Vol. 335, S. 119-124
- Cone K. C., Burr F. A., Burr B. (1986) Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. *PNAS*, Vol. 83, S. 9631-9685
- Cone K. C., Cocciolone S. M., Burr F. A., Burr B. (1993) Maize anthocyanin regulatory gene p1 is a duplicate of c1 that functions in the plant. *Plant Cell*, Vol. 5, S. 1795-1805
- Conti E., Lanzanova C., Baldoni E., Allegri L., Lupotto E. (2003) Improving in vitro culture and transformation conditions in *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *MNL* 77(40), S. 8-9
- Cornejo M.-J., Luth D., Blankenship K. M., Anderson O. D., Blechl A. E. (1993) Activity of a maize ubiquitin promotor in transgenic rice. *Plant Mol. Biol.*, Vol. 23, S. 567-581
- Dai S., Zheng P., Marmey P., Zhang S., Tian W. Z., Chen S. Y., Beachy R. N., Fau C. (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breeding*, Vol. 7, S. 23-33
- Day C., Lee E., Kobayashi J., Holappa L., Albert H., Ow D. (2000) Transgene integration into the same chromosomal location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.*, Vol. 14, S. 2869-2880

- de Block M., Herrera-Estrella L., van Montagu M., Schell J., Zambryski P. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J.*, Vol. 3, S. 1681-1689
- de la Riva G. A., Gonzalez-Cabrera J., Vazquez-Padron R., Ayra-Pardo C. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Mol. Biol. & Genet.*, Vol. 1(3), <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/1/index.html>, ISSN 0717-3458
- Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, Vol. 1, S. 19-21
- Deroles S. C. und Gardner R. C. (1988) Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.*, Vol. 11, S. 355-364
- DMK Deutsches Maiskomitee e. V., <http://maiskomitee.de>, Stand Oktober 2005
- Enriquez-Obregon G. A., Prieto-Samsonov D. L., de la Riva G. A., Perez M., Selman-Housein G., Vazquez-Padron R. (1999) *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Vol. 59, S. 159-168
- Evans M. J. und Scarpulla R. C. (1988) Both upstream and intron sequence elements are required for elevated expression of the rat somatic cytochrome c gene in COS-1 cells. *Mol. Cell Biol.*, Vol. 8, S. 35-41
- Fagard M. und Vaucheret H. (2000) (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Vol. 51, S. 167-194
- Fiume E., Christou P., Giani S., Breviario D. (2004) Introns are key regulatory elements of rice tubulin expression. *Planta*, Vol. 218(5), S. 693-703
- Frame B. R., Zhang H., Cocciolone S. M., Sidorenko L. V., Dietrich C. R., Pegg S. E., Zhen S., Schnable P. S., Wang K. (2000) Production of transgenic maize from bombarded type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, Vol. 36, S. 21-29
- Frame B. R., Shou H., Chikwamba R. K., Zhang Z., Xiang C., Fonger T. M., Pegg S. E. K., Li B., Nettleton D. S., Pei D., Wang K. (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Phys.*, Vol. 129, S. 13-22
- Frey M., Kliem R., Saedler H., Gierl A. (1995) Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 246, S. 100-109
- Frey M., Chomet P., Glawischnig E., Stettner C., Grün S., Winklmeier A., Eisenreich W., Bacher A., Meeley R. B., Briggs S. P., Simcox K., Gierl A. (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*, Vol. 277(5326), S. 696-699

- Frey M., Stettner C., Pare P. W., Schmelz E. A., Tumlinson J. H., Gierl A. (2000) An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *PNAS*, Vol. 97(26), S. 14801-14806
- Frey M., Huber K., Park W. J., Sicker D., Lindberg P., Meeley R. B., Simmons C. R., Yalpani N., Gierl A. (2003) A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. *Phytochem.*, Vol. 62, S. 371-376
- Fukuda Y. und Nishikawa S. (2003) Matrix attachment regions enhance transcription of a downstream transgene and the accessibility of its promoter region to micrococcal nuclease. *Plant Mol. Biol.*, Vol. 51(5), S. 665-675
- Gallo-Meagher M. und Irvine J. E. (1993) Effects of tissue type and promoter strength on transient GUS expression in sugarcane following particle bombardment. *Plant Cell Rep.*, Vol. 12(12), S. 666-670
- Garabagi F., Duns G., Strommer J. (2005) Selective recruitment of Adh genes for distinct enzymatic functions in *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.*, 58(2), S. 283-294
- Gierl A. und Frey M. (2001) Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta*, Vol. 213, S. 493-498
- Gordon-Kamm W. J., Spencer T. M., Mangano M. L., Adams T. R., Daines R. J., Start W. G., O'Brien J. V., Chambers S. A., Adams W. R. Jr., Willetts N. G., Rice T. B., Mackey C. J., Krueger R. W., Kausch A. P., Lemaux P. G. (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell*, Vol. 2, S. 603-618
- Han K.-H., Ma C., Stauss S. H. (1997) Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequency and transgene expression in poplar. *Trans. Res.*, Vol. 6, S. 415-420
- Hansen G., Das A., Chilton M. (1994) Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *PNAS*, Vol. 91, S. 7603-7607
- Hansen G. (2000) Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *MPMI*, Vol 13(6), S. 649-657
- Harborne J. B. (1977) *Introduction to Ecochemical Biochemistry*. Academic Press, London
- Heiser W., Optimization of Biolistic® transformation using the helium-driven PDS-1000/He-System, EG Bulletin 1688, Bio-Rad
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumasho T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, Vol. 6, S. 271-282
- Hood E. E., Helmer G. L., Fraley R. T., Chilton M.-D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, Vol. 168(3), S. 1291-1301

- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nat. Biotechnol., Vol. 14, S. 745-750
- Iwamura H., Nakagawa E., Hirai N. (1996) Localization of benzoxazinones that occur constitutively in wheat seedlings. Z. Naturforsch., Vol. 51c, S. 807-812
- Jefferson R., Kavanagh T., Bevan M. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J., Vol. 6, S. 3901-3907
- Jorgensen R., Snyder C., Jones J. D. G. (1987) T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. Mol. Gen. Genet., Vol. 207, S. 471-477
- Kern M. (2002) Grüne Gentechnik und Bevölkerungswachstum. Spannungsfeld Nahrungsmittelproduktion und Biodiversität. VDBiol., Biologen heute, Vol. 5, S. 2-7
- Kortes O. (2003) Untersuchungen zur Bestimmung regulatorischer Elemente des Indolglycerinphosphatlyasegens *Igl* von Mais (*Zea mays*). Dissertation, Technische Universität München
- Kononov M. E., Bassuner B., Gelvin S. B. (1997) Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integrations. The Plant Journal, Vol. 11(5), S. 945-957
- Köhler U., Donath M., Mendel R. R., Cerff R., Hehl R. (1996) Intron-specific stimulation of anaerobic gene expression and splicing efficiency in maize cells. Mol. Genet. Genom., Vol. 251(2), S. 252-258
- Kumpatla S. P., Chandrasekharan M. B., Iyer L. M., Li G., Hall T. C. (1998) Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. Trends Plant Sci., Vol. 3, S. 97-104
- Lu C., Vasil V., Vasil I. K. (1983) Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). Theor. Appl. Genet., Vol. 66, S. 285-289
- Ludwig S. R., Habera L. F., Dellaporta S. L., Wessler S. R. (1989) Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similarity to transcriptional activators and contains the myc-homology region. PNAS, Vol. 86, S. 7092-7096
- Luehrsen K. R. und Walbot V. (1991) Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells. Mol. Gen. Genet., Vol. 225(1), S. 81-93
- Lupotto E., Reali A., Passera S., Chan M.-T. (1998) Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. Maize Genet. Coop. Newslett., Vol. 72, S. 20-22
- Mahalakshmi A. und Khurana P. (1997) Indian J. Exp. Biol., Vol. 35, S. 416-426

- Martin A. (2003) Charakterisierung einer Transkriptionsfaktorfamilie aus *Zea mays* und deren Funktion in der Expression der DIMBOA-Biosynthesegene. Dissertation, Technische Universität München
- Martineau B., Voelker T. A., Sanders R. A. (1994) On defining T-DNA. *Plant Cell*, Vol. 6, S. 1032-1033
- Matzke A. J. M., Neuhuber F., Park Y. D., Ambros P. F., Matzke M. A. (1994) Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 244, S. 219-229
- Matzke M. A., Matzke A. J. M., Eggleston W. B. (1996) Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? *Trends Plant Sci.*, Vol. 1, S. 382-388
- Matzke M. A. und Matzke A. J. M. (1998) Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *Cell Mol. Life Sci.*, Vol. 54(1), S. 94-103
- Melanson D., Chilton M.-D. Masters-Moore D., Chilton W. S. (1997) A deletion in an indole synthase gene is responsible for the DIMBOA-deficient phenotype of *bxbx* maize. *PNAS*, Vol. 94, S. 13345-13350
- Menossi M., Rabaneda F., Puigdomenech P., Martinez-Izquierdo J. A. (2003) Analysis of regulatory elements of the promotor and the 3' untranslated region of the maize *Hrgp* gene coding for a cell wall protein. *Plant Cell Rep.*, Vol. 21, S. 916-923
- Meyers Taschenlexikon Biologie, Band 2 (1994) B. I.-Taschenbuchverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 3. Aufl.
- Mohamalawari D., Sharma N. C., Cristae P., Sahi S. V. (2002) Transformation of maize by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one resistant *Agrobacterium* strains. *Biotechnology Letters*, Vol. 24, S. 197-203
- Murry L. E., Elliott L. G., Capitant S. A., West J. A., Hanson K. K., Scarafia L., Johnston S., Deluca-Flaherty C., Nichols S., Cunanan D., Dietrich P. S., Mettler I. J., Dewald S., Warnick D. A., Rhodes C., Sinibaldi R. M., Brunke K. J. (1993) Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. *Biotechnol.*, Vol. 11, S. 1559-1564
- Muskens M. W. M., Vissers A. P. A., Mol J. N. M., Kooter J. M. (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.*, Vol. 43, S. 243-260
- Niemeyer H. M. (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. Review article Nr. 39, *Phytochem.*, Vol. 27(11), S. 3349-3358
- Ohnhäuser R. (2000) Analyse der Promotorelemente des Gens *Bx4* von *Zea mays* mit Hilfe von Reportergenkonstrukten. Diplomarbeit, Technische Universität München

Ooms G., Bakker A., Molendijk L., Wullems G. J., Gordon M. P., Nester E. W., Schilperoort R. A. (1982). T-DNA organization in homogenous and heterogenous octopine-type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell*, Vol. 30, S. 589-597

Osbourn A. E. (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, Vol. 8, S. 1821-1831

Perl A., Lotan O., Abu-Abied M., Holland D. (1996) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nat. Biotechnol.*, Vol. 14, S. 624-628

Rhodes C. A., Pierce D. A., Mettler I. J., Mascarenhas D., Detmer J. J. (1988) Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, Vol. 240, S. 204-207

Richter G. (1996) *Biochemie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, S. 387-451

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D., Allen N. (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*, Vol. 5, S. 27-37

Santi C., Svistoonoff S., Constans L., Auguy F., Duhoux E., Bogusz D., Franche C. (2003) Choosing a reporter for gene expression studies in transgenic actinorhizal plants of the *Casuarinaceae* family. *Plant and Soil*, Vol. 254, S. 229-237

Schläppi M., Hohn B. (1992) Competence of immature maize embryos for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *The Plant Cell*, Vol. 4, S. 7-16

Schmälzlin K. (2003) *Expressionsanalyse der DIMBOA-Biosynthese in Zea mays*. Dissertation, Technische Universität München

Shou H., Frame B. R., Whitham S. A., Wang K. (2004) Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breed.*, Vol. 13, S. 201-208

Sicker D., Frey M., Schulz M., Gierl A. (2000) Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *Internat. Review of Cytology*, Vol. 198, S. 319-346

Simcox K. und Weber D. (1985) Location of the benzoxazineless (bx) locus in maize by monosomic and B-A translocation analysis. *Crop Science*, Vol. 25, S. 825-830

Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, Vol. 98, S. 503-517

Spencer T. M., Gordon-Kamm W. J., Daines R. J., Start W. G., Lemaux P. G. (1990) Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor. Appl. Genet.*, Vol. 79, S. 625-631

- Spencer T. M., O'Brien J. V., Start W. G., Adams T. R. (1992) Segregation of transgenes in maize. *Plant Mol. Biol.*, Vol. 18, S. 201-210
- Spielmann A. und Simpson R. B. (1986) T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites. *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 205, S. 34-41
- Stachel S. E., Timmerman B., Zambryski P. (1987) Activation of *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: Requirement for 5' *virD* gene products. *EMBO J.*, Vol. 6, S. 857-863
- Tagu D., Walker N., Ruiz-Avila L., Burgess S., Martinez-Izquierdo J. A., Leguay J. J., Netter P., Puigdomenech P. (1992) Regulation of the maize *Hrpg* gene expression and wounding, mRNA accumulation and qualitative expression analysis of the promoter by microprojectile bombardment. *Plant Mol. Biol.*, Vol. 20, S. 529-538
- Taylor N. J. und Fauquet C. M. (2002) Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology*, Vol. 21(12), S. 963-977
- Tenhaken R., Levine A., Brisson L. F., Dixon R. A., Lamb C. (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *PNAS*, Vol. 92, S. 4158-4163
- Uchimiya H., Iwata M., Nojiri C., Smarajewa P. K., Takamatsu S., Ooba S., Anzai H., Christensen A. H., Quail P. H., Toki S. (1993) Bialaphos treatment of transgenic rice plants expressing a *bar* gene prevents infection by the sheath blight pathogen (*Rhizoctonia solani*). *Bio/Technology*, Vol. 11, S. 835-836
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, Vol. 9, S. 1963-1971
- Vain P., Harvey A., Worland B., Ross S., Snape J. W., Lonsdale D. (2004) The effect of additional virulence genes on transformation efficiency, transgene integration and expression in rice plants using the pGreen/pSoup dual binary vector system. *Transgenic Research*, Vol. 13, S. 593-603
- Vance V., Vaucheret H. (2001) RNA silencing in plants – Defense and counter defense. *Science*, Vol. 292, S. 2277-2280
- Vaucheret H., Beclin C., Elmayer T., Feuerbach F., Godon C., Morel J. B., Mourrain P., Palauqui J. C., Vernhettes S. (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.*, Vol. 16, S. 651-659
- Vaucheret H. und Fagard M. (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.*, Vol. 17, S. 29-35
- Veluthambi K., Ream W., Gelvin S. B. (1988) Virulence genes, borders and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, Vol. 170, S. 1523-1532

Virtanen A. I. und Hietala P. K. (1960) Precursors of benzoxazolinone in rye plants: I. Precursors II, the Aglucone. Acta Chem. Scand., Vol. 14, S.499-502

von Rad U. (2000) Isolierung und funktionelle Charakterisierung der UDP-Glycosyltransferasen *Bx8* und *Bx9* des DIMBOA-Biosynthesewegs in *Zea mays*. Dissertation, Technische Universität München

von Rad U., Hüttl R., Lottspeich F., Gierl A., Frey M. (2001) Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. Plant J. Dec., Vol. 28(6), S. 633-642

Walkerpeach C. R. und Velten J. (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector system. In S. B. Gelvin und R. A. Schilpoort (Hrsg.): Plant Mol. Biol. Manual, B1, Kluwer Academic Publishers, S. 1-19

Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem. J., Vol. 322, S. 681-692

Xu Z. Q., Jia J. F., Hao J. G., Wang Y. J., Feng S. Z. (2002) Expression activity of maize Ubi-1 promotor in fertile transgenic maize plants. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao., Vol. 35(4), S. 296-302

Yannisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains. Nucleotide sequences of the M13mp and pUC 19 vectors. Gene, Vol. 33, S. 103-119

Yanofsky M., Lowe B., Montaya A., Rubin R., Krul W., Gordon M., Nester E. W. (1985) Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., Vol. 168, S. 237-243

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

Zeng P., McGill M. A., Kaeppler H. F. (2004) Decreased salt concentration and antioxidants improve *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos in a standard binary vector-based system. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal, Vol. 40, S. 67-A-67-A

7 Anhang

Tab. 4: Zusammenfassung der Versuche zur transienten Expression

Ver- such Nr.	Embry- onen- größe (in mm)	Optische Dichte d. Bakt. (OD _{550nm})	Anzucht- temperatur (°C) (und -dauer in Tagen)	Alter Ko- kultur- Medium (in Tagen)	Zeitpunkt Färbung nach Transf. (in Tagen)	Anzahl Embry- onen	Kokultur-Medium	Ergebnis (GUS-Färbung)
49/1	1,5-2,0	0,4	21,0 (3)	0	2	20	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.-HCl, pH 3,3	keine Färbung
49/2	1,5-2,2	0,4	21,0 (3)	12	2	20	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.-HCl, pH 3,3	keine Färbung
49/3	1,5-1,7	0,4	21,0 (3)	0	4	30	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.-HCl, pH 3,3	13% (v. a. apikaler Randbereich)
49/4	1,7-2,0	0,4	21,0 (3)	12	4	30	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.-HCl, pH 3,3	7% (v. a. Mitte Skutellum)
50/1	1,5-2,0	0,4	21,0 (3)	1	6	50	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.-HCl, pH 3,3	4% (v. a. Mitte Skutellum)
50/2	1,6-2,0	0,4	21,0 (3)	13	6	50	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.-HCl, pH 3,3	keine Färbung
51	1,5-2,2	0,4	21,0 (3)	2	5	100	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.-HCl, pH 3,3	13 % (v. a. Mitte Skutellum)
52	1,7-2,0	1,4	24,0 (2)	3	5	90	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.-HCl, pH 3,3	55% (v. a. Mitte Skutellum)
58	1,7-2,2	0,6	21,0 (3)	2	5	71	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst. free base, pH 5,8	85% gesamt, 65% basal
59	1,5-2,5	0,7	21,0 (3)	5	5	75	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.free base, pH 5,8	99% gesamt, 92% basal (v. a. Randbereich)
63	1,8-3,0	0,9	21,0 (3)	6	5	104	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst.free base, pH 5,8	70% gesamt, 37% basal
66	1,1-3,0	0,4	21,0 (3)	3	5	100	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst. free base, pH 5,8	97% gesamt, 74% basal
95	1,5-2,0	0,4	28,0 (2)	2	6	67	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. f. b., pH 4,3, 15 mg/l Ascorb.	43% gesamt, 13% basal

Ver- such Nr.	Embry- onen- größe (in mm)	Optische Dichte d. Bakt. (OD _{550nm})	Anzucht- temperatur (°C) (und -dauer in Tagen)	Alter Ko- kultur- Medium (in Tagen)	Zeitpunkt Färbung nach Transf. (in Tagen)	Anzahl Embry- onen	Kokultur-Medium	Ergebnis (GUS-Färbung)
96	1,5-2,2	0,4	28,0 (3)	0	6	25	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. f. b., pH 4,3, 15 mg/l Ascorb.	44% gesamt, 16% basal (v. a. Randbereich)
99	1,0-1,5	0,4	28,0 (2)	0	5	67	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst. free base, pH 4,3	keine Färbung
100	1,0-1,5	0,8	28,0 (3)	0	5	52	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 300mg/l Cyst. free base, pH 4,3	keine Färbung
105	1,2-1,7	0,4	28,0 (3)	1	5	26	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8	96% gesamt, 61% basal
107/1	1,7-1,8	0,2	28,0 (2)	0	6	98	100µM AS, 1N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8	49% gesamt, 32% basal
107/2	1,7-1,8	0,2	28,0 (3)	0	6	84	100µM AS, ½ N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8	64% gesamt, 43% basal
109	1,2-2,5	0,3	21,0 (3)	0	5	48	100µM AS, ½ N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8, 1mM DTT	92% gesamt, 73% basal
139	1,8-2,0	0,4	21,0 (3)	1	5	92	100µM AS, ½ N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8, 1mM DTT	64% gesamt, 43% basal
140	2,5-3,0	0,4	21,0 (2)	6	5	18	100µM AS, ½ N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8, 1mM DTT	61% gesamt, 42% basal (v. a. Zentrum u. Randber.)
143	2,0-3,0	0,4	21,0 (3)	0	5	80	100µM AS, ½ N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8, 1mM DTT	63% gesamt, 45% basal
145	1,8-2,0	0,4	21,0 (3)	1	6	67	100µM AS, ½ N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8, 1mM DTT	96% gesamt, 85% basal
149	1,9-2,9	0,4	21,0 (3)	0	5	90	100µM AS, ½ N ₆ -Salze, 150mg/l Cyst. free base, pH 5,8, 1mM DTT	61% gesamt, 49% basal

Tab. 5: Zusammenfassung der Versuche zur stabilen Transformation

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
1-7	359	1,2-1,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 0-3 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 3-4 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
8	40	1,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 7 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 2 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
9	50	2,0-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 9 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 2 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
10	70	2,0-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 9 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 2 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
11-24	729	1,2-1,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 2 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
25	100	1,0-1,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 8 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	1	1
26-31	374	1,2-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 4-8 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 2 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
32	170	2,0-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 5 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	4	2,4

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
33-41	455	1,2-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 5 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 18°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
42-48	346	1,2-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 4 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 2 Tage Temperatur: 24°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transiente Versuche 49/1, 49/2, 49/3, 49/4, 50/1, 50/2, 51, 52								
53	12	1,2-3,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 5 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 5 Tage Temperatur: 24°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
54	8	1,5-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 1,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 5 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 5 Tage Temperatur: 24°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe(mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
55	29	1,5-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 1,0 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 6 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 5 Tage Temperatur: 24°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
56	22	1,5-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,6 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 4 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 5 Tage Temperatur: 24°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
57	10	1,5-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,7 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 7 Tage pH: 3,3 Zusätze: 50µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 5 Tage Temperatur: 24°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transiente Versuche 58, 59								
60-62	231	1,5-3,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,6; 0,8; 1,2 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 2-6 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
Transienter Versuch 63								
64-65	470	1,5-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 8-9 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 4-5 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transienter Versuch 66								
67-71	1095	1,0-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4-0,8 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 3-9 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein-HCl 1N₆-Salze	Dauer: 3-5 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
72-76	725	1,0-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 4-6 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 2-4 Tage Temperatur: 21°C	ab hier Leucopore tape SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
77	225	1,2-1,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 5 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 250mg/l Cefotaxim 300mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: A: 2 Tage B: 5 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	A: 0 B: 0	A: 0 B: 0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
78-80	910	1,7-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3-0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 4-7 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 300mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 3-4 Tage Temperatur: 21°C	Ab hier SI u. SII: 1,6% Phytoagar SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
81/1	177	2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 3 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 300mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,0mg/l Bialaphos SII: 2,0mg/l Bialaphos	0	0
81/2	70	2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 3 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 300mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,0mg/l Bialaphos SII: 2,0mg/l Bialaphos	0	0
82-84	755	2,0-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4-0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 2-4 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 2-3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,0mg/l Bialaphos SII: 2,0mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
85-87	612	1,5-2,3	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,3-0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 4-6 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 2-4 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,0mg/l Bialaphos SII: 2,0mg/l Bialaphos	0	0
88-89	521	1,5-2,0	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 1-3 Tage pH: 4,3 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 2-3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,0mg/l Bialaphos SII: 2,0mg/l Bialaphos	0	0
90	100	1,7-2,3	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 4,3 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,0mg/l Bialaphos SII: 2,0mg/l Bialaphos	3	3
91	120	1,7-2,3	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 4,3 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,0mg/l Bialaphos SII: 2,0mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
92-93	330	2,2	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 1 Tage pH: 4,3 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,0mg/l Bialaphos SII: 2,0mg/l Bialaphos	0	0
94	107	1,4-2,2	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 4,3 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 15mg/l Ascorb.säure 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	2	1,9
Transiente Versuche 95, 96								
97-98	173	1,5-2,2	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 0-2 Tage pH: 4,3 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 15mg/l Ascorb.säure 1N₆-Salze	Dauer: 3-4 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transiente Versuche 99, 100								

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
101-104	142	1,0-1,5	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,4; 0,8 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 3,3 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 4 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transienter Versuch 105								
106	65	1,2-1,7	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 4 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transiente Versuche 107/1, 107/2								
108/1	125	1,7-1,8	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,2 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
108/2	134	1,7-1,8	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,2 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2 N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
Transienter Versuch 109								
110	108	1,2-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 4 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transiente Versuche 107/1, 107/2								
108/1	125	1,7-1,8	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,2 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
108/2	134	1,7-1,8	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,2 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2 N₆-Salze	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transienter Versuch 109								

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
110	108	1,2-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 4 Tage Temperatur: 21°C ab hier: Embr. nach Inf. Max. 1h in Inf.-Lös. liegen lassen	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
111	183	1,8-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	5	2,7
112	263	2,2	Vorkultur: 28°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	3	1,1
113-115	369	1,7-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3-0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 0-1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
116	169	2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
117	230	1,8-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 4 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	2	0,9
118	136	1,8-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 2 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	3	1,5
119	176	1,3-1,7	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze; 15mg/l Ascorbinsäure	Dauer: 10 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
120	154	2,0-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
121	204	1,8-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 2 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 4 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	6	2,9
122	172	1,8-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 3 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	0	0
123	183	1,2-1,9	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 4 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	2	1,1

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
124	179	1,5-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 5 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	0	0
125	197	2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 6 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	5	2,5
126	165	1,5-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 5 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	1	0,6
127	217	1,5-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 7 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	4	1,8

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
128	179	2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	0	0
129	162	1,8-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
130	184	2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	0	0
131	85	1,2-1,7	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,6 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	0	0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	Agrobacterien	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
132/1	107	2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,6 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 0,75mg/l Bialaphos 1,3% Phytoagar SII: 1,5mg/l Bialaphos	2	1,9
132/2	105	2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,6 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	2	1,9
133/1	82	2,0-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 136mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
133/2	79	2,0-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 136mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	1	1,9

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
133/3	32	2,0-2,2	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen und Filterpapier	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 136mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
134	109	2,0-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 2 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 136mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	2	1,9
135	165	1,8-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 2 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 136mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	4	2,4
136	96	2,0-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 136mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C Nescofilm während Kokultur-Phase	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	1	1,0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
137	198	1,8-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,2 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 136mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C ab hier: Leucopore tape während Kokultur	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	5	2,5
138	101	2,5-3,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	2	2,0
Transiente Versuche 139, 140								
141	172	2,0-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 6 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
142	171	2,2-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 1,1 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 3,0mg/l Bialaphos	0	0
Transienter Versuch 143								

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
144	109	2,0-2,4	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,8 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	0	0
Transiente Versuche 145								
146	45	1,8-2,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,4 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	3	6,7
147	128	2,5-3,0	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,7 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	3	2,3
148	102	1,9-2,9	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,5 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N₆-Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	1	1,0
Transienter Versuch 149								

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
150	162	1,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,2 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	4	2,5
151	168	1,5-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,2 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	3	1,8
152	154	1,5-2,1	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	4	2,6
153	101	1,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	2	2,0

Experiment Nr.	Anzahl Embr.	Embryonen-größe (mm)	<i>Agrobacterien</i>	Kokultur-Medium	Kokultur-Phase	Selektions-Phase	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)
154	181	1,6-2,3	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: frisch pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	0	0
155	181	1,6-2,3	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	2	1,1
156	74	1,8-2,3	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Abtupfen	Alter: 1 Tag pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 3 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	3	4,1
157	140	1,9-2,5	Vorkultur: 21°C OD _{550nm} : 0,3 Entfernen d. Susp. d.: Abpipettieren und Filterpapier	Alter: 2 Tage pH: 5,8 Zusätze: 100µM AS 150mg/l Timentin 150mg/l Cystein f. b. 1/2N ₆ -Salze;1mMDTT	Dauer: 2 Tage Temperatur: 21°C	SI: 1,5mg/l Bialaphos SII: 1,5mg/l Bialaphos	7	5,0

Tab. 7: Transformations- und Regenerationsraten

Experiment Nr.	Konstrukt	Anzahl transform. Embryonen	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)	Anzahl Linien mit transg. Pfl.	Regenerationsrate (%)
1-7	pTF102; <i>Igl</i> -MID 3,7kb	359	-	0	-	0
8	<i>Igl</i> -MID 3,7kb	40	-	0	-	0
9	<i>Igl</i> -MID 3,7kb	50	-	0	-	0
10	<i>Igl</i> -MID 3,7kb	70	-	0	-	0
11-24	<i>Igl</i> -MID 3,7kb	729	-	0	-	0
25	<i>Igl</i> -MID 3,7kb	100	1	1	1	1
26-31	<i>Igl</i> -MID 3,7kb	374	-	0	-	0
32	<i>Igl</i> -TA 0,7kb	170	4	2,4	1	25
33-41	<i>Igl</i> -MID 3,7kb; <i>Igl</i> -TA 0,7kb	455	-	0	-	0
42-48	<i>Igl</i> -MID 3,7kb; <i>Igl</i> -TA 0,7kb	346	-	0	-	0
53	<i>Igl</i> -TA 0,7kb	12	-	0	-	0
54	<i>Igl</i> -TA 0,7kb	8	-	0	-	0
55	<i>Igl</i> -MID 3,7kb	29	-	0	-	0
56	<i>Igl</i> -TA 0,7kb	22	-	0	-	0
57	<i>Igl</i> -TA 0,7kb	10	-	0	-	0
60-62	<i>Bx8</i> -Konstrukt	231	-	0	-	0
64-65	<i>Bx8</i> -Konstrukt	470	-	0	-	0
67-71	<i>Bx8</i> -Konstrukt	1095	-	0	-	0
72-76	<i>Bx2</i> .box 0,8kb; <i>Bx1</i> /370bp/1,3kb	725	-	0	-	0
77	<i>Bx1</i> /370bp	225	-	0	-	0
78-80	<i>Bx2</i> .box 0,8kb; <i>Bx1</i> /370bp/1,3kb	910	-	0	-	0
81	<i>Bx1</i> /1,3kb	247	-	0	-	0
82-84	<i>Bx2</i> .mut 0,6kb; <i>Bx2</i> .box 0,8kb; <i>Bx1</i> /1,3kb	755	-	0	-	0
85-87	<i>Bx1</i> /370bp/1,3kb	612	-	0	-	0
88-89	<i>Bx2</i> .mut 0,8kb; <i>Bx1</i> /870bp	521	-	0	-	0
90	<i>Bx2</i> .box 0,6kb	100	3	3	3	100
91	<i>Bx2</i> .mut 0,8kb	120	-	0	-	0
92-93	<i>Bx2</i> .box 0,6kb; <i>Bx1</i> /870bp	330	-	0	-	0
94	<i>Bx1</i> /870bp	107	2	1,9	2	100
97-98	<i>Bx2</i> .box 0,6kb; <i>Bx1</i> /870bp	173	-	0	-	0
101-104	<i>Bx1</i> /870bp	142	-	0	-	0
106	<i>Bx2</i> .box 0,8kb	65	-	0	-	0
108	<i>Bx1</i> /1,3kb	259	-	0	-	0
110	<i>Bx1</i> /870bp	108	-	0	-	0
111	<i>Bx1</i> /870bp	183	5	2,7	4	80
112	<i>Bx2</i> .mut 0,6kb	263	3	1,1	2	67

Experiment Nr.	Konstrukt	Anzahl transform. Embryonen	Anzahl Linien (RI)	Transformationsrate (%)	Anzahl Linien mit transg. Pfl.	Regenerationsrate (%)
113-115	<i>Bx1/870bp</i> ; <i>Bx2.mut 0,6kb</i>	369	-	0	-	0
116	<i>Bx1/870bp</i>	169	-	0	-	0
117	<i>Bx2.mut 0,6kb</i>	230	2	0,9	1	50
118	<i>Bx2.mut 0,6kb</i>	136	3	0	1	33
119	<i>Bx8-Konstrukt</i>	176	-	0	-	0
120	<i>Bx1/870</i>	154	-	0	-	0
121	<i>Bx8-Konstrukt</i>	204	6	2,9	2	33
122	<i>Bx1/370</i>	172	-	0	-	0
123	<i>Bx2.mut 0,6kb</i>	183	2	1,1	2	100
124	<i>Bx1/370</i>	179	-	0	-	0
125	<i>Bx2.box 0,8kb</i>	197	5	2,5	1	20
126	<i>Bx8-Konstrukt</i>	165	1	0,6	1	100
127	<i>Bx1/1,3</i>	217	4	1,8	2	50
128	<i>Bx1/870</i>	179	-	0	-	0
129	<i>Bx1/870</i>	162	-	0	-	0
130	<i>Bx1/1,3kb</i>	184	-	0	-	0
131	<i>Bx1/1,3kb</i>	85	-	0	-	0
132	<i>Bx2.box 0,8kb</i>	212	4	1,9	3	75
133	<i>Bx1/1,8kb</i>	193	1	0,5	1	100
134	<i>Bx1/1,8kb</i>	109	2	1,9	2	100
135	<i>Bx1/1,3kb</i>	165	4	2,4	1	25
136	<i>Bx1/1,8kb</i>	96	1	1,0	-	0
137	<i>Bx1/1,3kb</i>	198	5	2,5	4	80
138	<i>Igl-no motive</i> 0,36kb	101	2	2,0	2	100
141	<i>Bx2.mut 0,8kb</i>	172	-	0	-	0
142	<i>Igl-minimal 0,5kb</i>	171	-	0	-	0
144	<i>Igl-no motive</i> 0,36kb	109	-	0	-	0
146	pTF102	45	3	6,7	3	100
147	<i>Igl-minimal 0,5kb</i>	128	3	2,3	1	33
148	<i>Igl-no motive</i> 0,36kb	102	1	1	1	50
150	<i>Igl-no motive</i> 0,36kb	162	4	2,5	4	100
151	<i>Igl-no motive</i> 0,36kb	168	3	1,8	2	67
152	<i>Igl-minimal 0,5kb</i>	154	4	2,6	3	75
153	<i>Igl-no motive</i> 0,36kb	101	2	2,0	2	100
154	<i>Igl-minimal 0,5kb</i>	102	-	0	-	0
155	<i>Igl-minimal 0,5kb</i>	181	2	1,1	2	100
156	<i>Igl-minimal 0,5kb</i>	74	3	4,1	-	0
157	<i>Igl-minimal 0,5kb</i>	140	7	5	2	29

Tab. 9: Darstellung des Koleoptilenversuch mit *Bx2.box* 0,6 kb und *Bx2.mut* 0,6 kb

„+“: GUS-Färbung; „-“: keine GUS-Färbung; „T“: transgen; „NT“: nicht transgen; „k. A.“: keine Angaben möglich

Pflanze	Bx2.box 0,6kb 94 Li. 1		Bx2.box 0,6kb 94 Li. 2		Bx2.mut 0,6kb V8 Li. 2 (Ac. 106)		Bx2.mut 0,6kb V8 Li. 2 (Ac. 105)		Bx2.mut 0,6kb V14 Li. 14	
	GUS	BASTA	GUS	BASTA	GUS	BASTA	GUS	BASTA	GUS	BASTA
1	+	T	+	T	-	T	-	T	-	NT
2	+	T	-	NT	-	NT	k. A.	k. A.	+	T
3	+	T	-	NT	-	NT	k. A.	k. A.	+	T
4	+	T	-	NT	-	NT	-	NT	-	NT
5	-	NT	-	NT	-	NT	k. A.	k. A.	+	T
6	+	T	+	T	-	NT	-	NT	+	T
7	-	NT	+	T	-	T	-	NT	-	NT
8	+	T	+	T	-	T	k. A.	k. A.	-	NT
9	+	T	+	T	-	T	k. A.	k. A.	+	T
10	-	NT			-	NT	-	NT	-	NT
11	+	T			-	T	-	NT	-	NT
12	-	NT			-	T	-	T	+	T
13	k. A.	k. A.			-	NT	-	T	-	NT
14	+	T			-	T	k. A.	k. A.	+	T
15	+	T			-	T	-	T	-	NT
16	+	T			-	NT	-	NT	-	NT
17	-	NT			-	NT	-	NT	+	T
18	-	NT			-	T	-	NT		
19	-	NT			-	NT	-	NT		
20	+	T	-	NT	-	T				
Spaltung	1,7 : 1 T : NT		1,3 : 1 T : NT		1 : 1,2 T : NT		1 : 1,1 T : NT		1 : 1,1 T : NT	

Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr. Alfons Gierl für die Möglichkeit, dieses Thema an seinem Lehrstuhl zu bearbeiten und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Monika Frey für ihre Unterstützung und Hilfe, ihre ständige Gesprächsbereitschaft, sowie ihr großes Engagement für diese Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Peter Dobos, für die Zusammenarbeit in der Gewebekultur, die tatkräftige Unterstützung und die zahlreichen wissenschaftlichen und fachfremden Diskussionen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei den Doktoranden Katrin Schullehner, Verena Kriechbaumer, Andreas Fiesselmann, Thomas Rauhut, Rafal Jonczyk, Silvia Ronconi und ganz besonders Birgit Treml bedanken, für die nette Arbeitsatmosphäre, die heiteren Abende und die große Hilfe bei Problemen aller Art.

Vielen Dank auch an Dr. Gerti Spielbauer, den übrigen Mitgliedern des Lehrstuhls Regina Hüttl, Dr. Ramon Torres Ruiz, Dr. Ulrich Genschel, Dr. Erich Glawischnig, und den „Ehemaligen“ Dr. Regina Schuegger, Kristina Haage, Katharina Lange, Anne Osterrieder und Heidi Miller-Mommerskamp für die gemeinsame Zeit.

Ein „Danke“ geht auch an meine Praktikantin Beate Hagl für die Unterstützung beim „Strippen und Schießen“ und an „meinen“ HiWi Annette Vogl.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Verlobten Michael bedanken, für seinen Optimismus, die beständige Unterstützung und Geduld, sowie bei meiner Familie für ihre Hilfe bei allen Problemen.

Lebenslauf

Name	Regina Stefanek
Adresse	Giggenhauser Str. 46 85354 Freising
Geburtsdatum	27.12.1979
Geburtsort	Schwabmünchen
Eltern	Zoltan Stefanek, Dipl.-Ing. (FH) Brigitte Stefanek, geb. Rodestock
Familienstand	ledig

Ausbildung:

1986-1990	Grundschule Buchloe
1990-1999	Maristenkolleg Mindelheim (Math., neuspr. u. wirtschaftsw. Gymnasium) mit Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
1999	Beginn des Studiums der Gartenbauwissenschaften an der TUM Freising-Weihenstephan
2002	Bachelorabschluss (B. Sc.)
2003-2004	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
2004	Abschluss des Studiums (Dipl.-Ing. agr.)
2004-2006	Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Genetik unter Leitung von Prof. Dr. A. Gierl

Ich bestätige, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen angefertigt habe.

Freising, Februar 2006

.....

Regina Stefanek