

**Züchtung mit transgenen Pflanzen:  
Kombination rekombinanter Pilzresistenzgene  
mittels Kreuzung transgener Erbsenlinien  
(*Pisum sativum* L.)**

**Von dem Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover zur  
Erlangung des Grades einer DOKTORIN der  
GARTENBAUWISSENSCHAFTEN**

**Dr. rer.hort.**

**genehmigte Dissertation**

**von**

**Dipl.-Ing. Andrea Richter**

**geboren am 06.01.1970 in Langenhagen**

**Januar 2005**

**Referent: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen**

**Korreferent: Prof. Dr. Hans-Peter Braun**

**Tag der Promotion: 12.November 2004**

## **Zusammenfassung**

Richter, Andrea

### **Züchtung mit transgenen Pflanzen: Kombination rekombinanter Pilzresistenzgene mittels Kreuzung transgener Erbsenlinien (*Pisum sativum* L.)**

Etwa 20 % der weltweiten Leguminosenproduktion entfallen auf die Erbse (*Pisum sativum* L.). Sie dient der menschlichen und tierischen Ernährung und wird hauptsächlich in gemäßigten Regionen angebaut. Der sehr begrenzte Genpool der Erbse erschwert die Züchtung, die insbesondere auf eine Erhöhung der Krankheitsresistenz gegenüber phytopathogenen Pilzen ausgerichtet ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein gentechnischer Ansatz zur Resistenzverbesserung der Erbse über die Artgrenzen hinweg verfolgt und mit klassischer Züchtung kombiniert. Hierbei wurden transgene Erbsenpflanzen, die verschiedene antifungale Gene integriert hatten, charakterisiert und zur Kreuzung verwendet. Zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation waren folgende antifungale Gene verwendet worden: zwei Gene, die für Polygalakturonase-inhibierende Proteine aus Kiwi (*Actinidia deliciosa* L.) und Himbeere (*Rubus idaeus* L.) kodieren und das *vst1*-Gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), welches für die Stilbensynthase kodiert. Der erste Arbeitsabschnitt war durch die Identifizierung unabhängiger transgener Klone mittels Southern-Blot-Analyse und die Etablierung homozygoter Linien gekennzeichnet. Bei sieben Klonen wurde eine Linienetablierung durchgeführt. Parallel dazu wurde mittels RNA Analytik und funktionaler Analyse, in Form von HPLC und eines semiquantitativen Inhibierungstests gegen pilzliche Polygalakturonasen, die Expressionsstabilität der antifungalen Gene in den verschiedenen Linien und innerhalb der Linien überprüft. Ein abschließender Resistenztest der Elternlinien gegenüber zwei pathogenen Pilzen (*Erysiphe pisi* und *Uromyces pisi*), führte zur Auswahl einiger Linien zur Durchführung von Kreuzungsexperimenten.

Für die Kreuzungen wurde eine Linie verwendet, die das PGIP Gen aus Himbeere integriert hatte (98-19-1,9). Die Linie zeigte eine 100%ige Inhibierung verschiedener pilzlicher Polygalakturonasen und Effekte in Resistenztests gegenüber zwei phytopathogenen Pilzen. Für die zweite Linie (98-67-8,1) konnte mittels HPLC die Synthese von 5µg Resveratrol pro g Pflanzenmaterial nachgewiesen werden, zudem konnten im Resistenztest leicht hemmende Effekte auf die Pilze verzeichnet werden.

Die resultierenden Hybridpflanzen und deren Nachkommenschaften wurden auf die gleiche Weise untersucht wie die Elternlinien.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Erbsen erstmals die Strategie verfolgt, das antifungale Potenzial verschiedener Gene zum Einsatz zu bringen, in der Annahme, dass durch additive oder synergistische Effekte der rekombinanten Gene eine Erweiterung des Resistenzniveaus der Pflanzen gegenüber phytopathogenen Pilzen erreicht werden kann.

**Schlagwörter:** Erbse (*Pisum sativum* L.), Gene stacking, Pilzresistenz, PGIP, *vst1*, Expressionstabilität.

## Abstract

Richter, Andrea

### **Breeding with transgenic plants: Gene stacking of recombinant antifungal genes via crossing of transgenic pea lines (*Pisum sativum* L.)**

With a production of 11 million tons per year, pea is the fourth most important legume crop in the world. Pea has a worldwide economic importance as source of protein for animal and human nutrition. It is a cool season crop and is widely grown in the cooler temperate zones of the world.

Yield stability and productivity and the value of peas could be greatly increased by the introduction of stably inherited traits such as pest and disease resistance, herbicide resistance and improved protein quality. These traits are not available in natural populations of near relatives of cultivated peas, but current advances in plant genetic engineering provide a potentially powerful tool for achieving these goals by an alternative mean.

In the present study we combined genetic engineering with the classical breeding in order to initiate gene stacking of recombinant antifungal genes for durable resistance of peas against fungal pathogens. Different transgenic pea clones, harbouring either a *vst 1* gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) which is coding for a stilbensynthase to produce resveratrol, or two different *pgip* (polygalacturonase-inhibiting-proteins) genes from raspberry (*Rubus idaeus* L.) and kiwi (*Actinidia deliciosa* L.), were characterised at the molecular and functional level. The first step was the identification of independent clones via Southern-blot-analysis and the establishment of potential parental lines from the initial transformants. We were able to establish seven different parental lines. In parallel, the pea lines were examined for their expression of the transgenes at the RNA level via RT-PCR and Northern-blot-analysis. On the functional level, the plants were analyzed via HPLC for the resveratrol synthesis and with a semiquantitative polygalacturonase-inhibition assay, which was established in our lab. In the studies we were interested to analyse the expression stability and level in the different transgenic lines, but also the expression pattern within the lines in course of the plant development. The final decision for the selection of the parental lines for the crossing program was based on the results of resistance assays against two fungal pathogens (*Erisiphe pisi*, *Uromyces pisi*).

For the crosses we used mainly a pea line with the raspberry PGIP (98-19-1,9), which showed 100 % inhibition of different polygalacturonases in the in-vitro assay and also antifungal effects in the resistance assay. The second pea line (99-67-8,1) which was used for the crosses harbours the *vst1* gene. Via HPLC it was shown that the plants were able to synthesize up to 5 µg resveratrol per g plant material and also in the resistance assays they showed slight effects on the fungi.

The resulting hybrids and their progenies were characterised in the same way as the parental lines.

It is the first time in pea, that different antifungal genes were combined, with the expectation of additional or synergistical effects of the antifungal genes, in order to increase the resistance level against fungal pathogens.

**Keywords: transgenic pea, gene stacking, antifungal resistance, PGIP, *vst1*, expression stability.**

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung _____	I
Abstract _____	II
Inhaltsverzeichnis _____	III
Abkürzungsverzeichnis _____	IV
Vorwort _____	V

<b>1 Einleitung</b> _____	<b>1</b>
<b>1.1 Die Erbse (<i>Pisum sativum</i> L.)</b>	<b>1</b>
1.1.1 Ursprung	1
1.1.2 Taxonomie	1
1.1.3 Wirtschaftliche Bedeutung	3
1.1.4 Biochemische Zusammensetzung der Erbsensamen	4
1.2 Züchtung bei der Erbse	5
1.2.1 Züchtungsproblematik und Zuchtziele	5
1.2.2 Biotechnologische Ansätze	6
<b>1.3 Antifungale Substanzen zur Erhöhung der Resistenz</b>	<b>9</b>
1.3.1 Phytoalexine	10
1.3.2 Polygalakturonase-inhibierende Proteine	12
1.3.3 Kombination von antifungalen Substanzen	14
<b>1.4 Konzeption der vorliegenden Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>2 Material und Methoden</b> _____	<b>17</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>17</b>
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Materialien	17
2.1.3 Reagenzien	18
2.1.4 Pflanzenmaterial	20
2.1.5 Pilzliche Polygalakturonasen	20
2.1.6 Pflanzenpathogene	21
2.1.7 Nukleinsäuren	21
2.1.7.1 Oligonukleotide zur Charakterisierung der transgenen Pflanzen	21

2.1.7.2 Oligonukleotide zum Nachweis von Backbone-Sequenzen	23
2.1.7.3 Binäre Vektoren	23
2.1.7.3.1 pSCP1	23
2.1.7.3.2 pSCP2	24
2.1.7.3.3 pHKvst	25
2.1.8 Medien	26
2.1.8.1 Medien zur Anzucht phytopathogener Pilze	26
2.1.8.2 Pflanzenmedien	26
<b>2.2 Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1 Herstellung und Kultur der transgenen Erbsen	27
2.2.1.1 Pflanzentransformation	27
2.2.1.2 Nomenklatur der Pflanzen	28
2.2.1.3 In-vitro-Vermehrung	29
2.2.1.4 Akklimatisierung der In-vitro Sprosse	29
2.2.1.5 Kulturführung im Gewächshaus	29
2.2.1.6 Kreuzung der Erbsen	30
2.2.2 Charakterisierung der Erbsenpflanzen auf Nukleinsäurebasis	31
2.2.2.1 Isolierung von DNA aus Pflanzen	31
2.2.2.2 Isolierung von RNA aus Pflanzengewebe	33
2.2.2.3 Reverse Transkription	33
2.2.2.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.2.2.5 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	34
2.2.2.6 Fluorimetrische Bestimmung	35
2.2.2.7 Abschätzung der DNA Menge im Agarosegel	35
2.2.2.8 DNA Agarosegelelektrophorese	35
2.2.2.9 RNA Agarosegelelektrophorese	36
2.2.2.10 PCR zur Charakterisierung der transgenen Pflanzen	37
2.2.2.11 PCR zum Nachweis von Backbone Sequenzen	38
2.2.2.12 Segregationsanalyse	39
2.2.2.13 Southern-Blot-Analyse	40
2.2.2.14 Herstellung DIG-markierter Sonden	44
2.2.2.15 Transkriptionsanalyse mittels RT-PCR	46
2.2.2.16 Northern-Blot-Analyse	48

2.2.3 Funktionale Charakterisierung der transgenen Erbsenpflanzen	49
2.2.3.1 Extraktion des Pflanzenmaterials zur Durchführung des PGIP-Assays	49
2.2.3.2 Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford	50
2.2.3.3 Agarose Diffusionstest zum Nachweis der PGIP Aktivität	50
2.2.3.4 Auswertung des Agarose Diffusionstest – Bestimmung der inhibitorischen Aktivität	51
2.2.3.5 Durchführung des PGIP-Assays nach Induktion der Blätter mit UV-Licht	52
2.2.3.6 Isolierung von Polygalakturonasen aus <i>Aphanomyces euteiches</i>	52
2.2.3.7 Resveratrolnachweis in Pflanzen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) – Extraktion des Pflanzenmaterials	53
2.2.3.8 Resveratrolnachweis mittels HPLC – Chromatographiebedingungen	54
2.2.3.9 Resveratrolnachweis mittels HPLC – Saure Hydrolyse	55
2.2.3.10 Funktionstest des <i>bar</i> -Gens – Leaf Paint Test	55
2.2.3.11 Funktionstest des <i>bar</i> -Gens – Phosphinotricin-Acetyltransferase-Test	55
2.2.4 Resistenztestung der transgenen Erbsenpflanzen	57
2.2.4.1 Test auf Mehltaresistenz ( <i>Erysiphe pisi</i> )	57
2.2.4.2 Test auf Rostresistenz ( <i>Uromyces pisi</i> )	57
2.2.5 Statistische Auswertung	58
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Molekulare Analyse der Elternpflanzen</b>	<b>59</b>
3.1.1 Analyse der <i>Ri</i> PGIP-Klone	59
3.1.1.1 Southern-Blot-Analyse der <i>Ri</i> PGIP-Klone	59
3.1.1.2 Linienetablierung der <i>Ri</i> PGIP-Klone – PCR Daten und Segregationsanalyse	61
3.1.1.3 Transkriptionsanalyse der <i>Ri</i> PGIP-Linien	63
3.1.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularen Analyse: <i>Ri</i> PGIP-Linien	64
3.1.2 Analyse der <i>Ad</i> PGIP-Klone	65
3.1.2.1 Southern-Blot-Analyse der <i>Ad</i> PGIP-Klone	65
3.1.2.2 Linienetablierung der <i>Ad</i> PGIP-Klone – PCR Daten und Segregationsanalyse	68

3.1.2.3 Transkriptionsanalyse der <i>Ad</i> PGIP-Linien	70
3.1.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularen Analyse: <i>Ad</i> PGIP-Linien	70
3.1.3 Analyse der <i>Vst1</i> -Klone	71
3.1.3.1 Southern-Blot-Analyse der <i>Vst1</i> -Klone	71
3.1.3.2 Linienetablierung der <i>Vst1</i> -Klone – PCR Daten und Segregationsanalyse	72
3.1.3.3 Transkriptionsanalyse <i>Vst1</i> -Linien	74
3.1.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularen Analyse: <i>Vst1</i> -Linien	75
<b>3.2 Funktionale Analyse der Elternlinien</b>	<b>76</b>
3.2.1 Expressionsanalyse des <i>bar</i> -Gens	76
3.2.1.1 Leaf-Paint-Test der Erbsenlinien	76
3.2.1.2 PAT-Assay der Erbsenlinien	80
3.2.2 Expressionsanalyse des <i>pgip</i> -Gens mittels Polygalakturonase-Inhibierungstests	83
3.2.3 Expressionsanalyse des <i>vst1</i> -Gens mittels HPLC	89
<b>3.3 Resistenztestung der Elternlinien</b>	<b>93</b>
3.3.1 Resistenztestung der <i>Ri</i> PGIP-Linien	93
3.3.2 Resistenztestung der <i>Ad</i> PGIP-Linien	94
3.3.3 Resistenztestung der <i>Vst1</i> -Linien	95
<b>3.4 Auswahl der Elternlinien</b>	<b>96</b>
<b>3.5 Molekulare Analyse der Hybriden und deren Nachkommenschaften</b>	<b>97</b>
3.5.1 Kombination von <i>Ri</i> PGIP und <i>Ad</i> PGIP	97
3.5.2 Kombination von <i>Ad</i> PGIP mit <i>Vst1</i>	101
3.5.3 Kombination von <i>Ri</i> PGIP mit <i>Vst1</i>	101
<b>4 Diskussion</b>	<b>110</b>
<b>4.1 Molekulare Analyse auf DNA Ebene</b>	<b>112</b>
4.1.1 Problematik multipler T-DNA Integrationen	112
4.1.2 Transfer von Backbone-Sequenzen in das Pflanzengenom	112
4.1.3 Biologische Sicherheitsaspekte	115
4.1.4 Segregationsanalyse der Nachkommenschaften	115



<b>4.2 Expressionsanalyse der transgenen Erbsenpflanzen</b>	<b>116</b>
4.2.1 Expression des <i>bar</i> -Gens in den transgenen Erbsenpflanzen	119
4.2.2 Expression der <i>pgip</i> -Gene in den transgenen Erbsenpflanzen	121
4.2.2.1 Resistenztestung der transgenen Erbsenpflanzen mit PGIP	125
4.2.3 Expression des <i>vstI</i> -Gens in den transgenen Erbsenpflanzen	126
4.2.3.1 Resistenztestung der transgenen Erbsenpflanzen mit VstI	127
<b>4.3 Untersuchung der Hybridpflanzen und deren Nachkommenschaften</b>	<b>128</b>
<b>4.4 Ausblick</b>	<b>130</b>
<b>5 Literatur</b>	<b>131</b>

---

Eidesstattliche Erklärung_____	VI
Curriculum Vitae_____	VII

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<b>Abbildung</b>
<i>Ad</i> PGIP	<b>P</b> olygalakturonase <b>i</b> nhibierendes <b>P</b> rotein aus Kiwi ( <i>Actinidia deliciosa</i> )
AEP	European Association for grain legume research
AS	<b>A</b> minosäure
ASS	<b>A</b> minosäuresequenz
BAP	<b>6-Benzylaminopurin</b>
bp	<b>B</b> asenpaare
bzw.	<b>B</b> eziehungsweise
cDNA	<b>c</b> opy ( <b>c</b> omplementäre) <b>D</b> N
CTAB	<b>C</b> etyl <b>t</b> rimethylammonium <b>b</b> romid
dest.	destilliert
DEA	<b>D</b> iethanol- <b>A</b> min
DEPC	<b>D</b> iethylpyrocarbam
DIG	<b>D</b> igoxigenin
DNA	<b>d</b> esoxyribo <b>n</b> ucleic <b>a</b> cid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<b>D</b> esoxynucleosid <b>t</b> riphosphat
EDTA	<b>E</b> thylendiaminetetraacetic <b>A</b> cid
EtOH	Ethanol
evt.	<b>e</b> ventuell
Fa.	<b>F</b> irma
FW	<b>f</b> resh <b>w</b> eight (Frischgewicht)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
<b>g</b>	<b>G</b> ramm
ggf.	<b>g</b> egebenenfalls
GOI	<b>G</b> ene <b>o</b> f <b>i</b> nterest
h	<b>h</b> ours (Stunden)
HPLC	<b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatographie
inkl.	<b>i</b> nklusiv
L	<b>L</b> iter
LB	<b>l</b> eft <b>b</b> order-Sequenz /linke Bordersequenz
LRR	<b>L</b> eucin- <b>R</b> ich- <b>R</b> epeats
M	<b>M</b> ol

max.	<b>maximal</b>
MeOH	Methanol
mg	<b>Milligramm</b>
min	<i>Minuten</i>
mM	<b>Millimol</b>
MS	<b>Murashige&amp;Skoog</b>
μM	Mikromol
ng	nanogramm
NAA	1-Naphtalene <b>acetic acid</b> (1-Naphtylelessigsäure)
neg.	<b>negativ</b>
o.g.	<b>oben genannt</b>
OD	<b>optische Dichte</b>
PAT	<b>Phosphinotricin-Acetyltransferase</b>
PCR	<b>Polymerase Chain Reaction</b> (Polymerase Kettenreaktion)
PG	<b>Polygalakturonase</b>
PGIP	<b>Polygalakturonase-inhibierende Proteine</b>
ppt	<b>Phosphinothricin</b>
PTGS	<b>Post transkriptionales Gene Silencing</b>
PVP	<b>Polyvinylpyrrolidon</b>
RB	<b>right border-Sequenz</b> (rechte Bordersequenz)
<i>Ri</i> PGIP	<b>Polygalakturonase-inhibierendes Protein</b> aus Himbeere ( <i>Rubus idaeus</i> )
rpm	<b>rounds per minute</b> (Umdrehungen pro Minute)
RT	<b>reverse Transkriptase</b>
Tab.	<b>Tabelle</b>
TGS	<b>Transkriptionales Gene Silencing</b>
ÜN	<b>über Nacht</b>
ÜNK	<b>über Nacht Kultur</b>
v/v	<b>volume per volume</b> (Volumenanteil pro Volumen)
vir-Region	<b>Virulenz- Region</b>
vst 1	<b>Stilbensynthese</b> aus <i>Vitis vinifera</i> L.
w/v	<b>weight per volume</b> (Gewichtsanteil pro Volumen)
z.B.	<b>zum Beispiel</b>
z.T.	<b>zum Teil</b>

## Vorwort

Die Pflanzenbiotechnologie ist nach wie vor ein spannendes Thema und birgt enormes Potential zur Herstellung verbesserter Kulturpflanzen, aber auch zur Nutzung transgener Pflanzen als Produktionsstätte von Antikörpern oder pharmazeutisch interessanten Inhaltsstoffen. In diesem Kontext ist die stabile Expression der rekombinanten Gene von großer Bedeutung. Durch die intensive Forschung der letzten Jahre, sind die Mechanismen des 'Gene Silencing' inzwischen weitgehend geklärt. Da es sich hierbei jedoch um ein sehr komplexes Thema handelt, ist der Forschungsbedarf noch sehr groß.

Ich hoffe dass ich mit meiner Arbeit einen kleinen Beitrag dazu leisten konnte und möchte mich bei allen bedanken die mir, in dieser nicht immer ganz einfachen Zeit zur Seite standen.

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. H.-J. Jacobsen für die Überlassung des Themas, sein in mich gesetztes Vertrauen und seine stete Gesprächsbereitschaft und sein Verständnis bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-P. Braun möchte ich mich für die spontane Übernahme des Korreferates bedanken.

Mein besonderer Dank gilt der ganzen Crew des LGM für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung. Ganz besonders möchte ich mich bei Claudia Wichmann, Monika Müller und Beate Meyer für ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Giulia De Lorenzo von der Universität „La Sapienza“ in Rom für ihre Gastfreundschaft bedanken und die Unterstützung bei der Etablierung des PGIP Assays am LGM.

Herrn Dr. Diego Rubiales vom CSIC in Cordoba danke ich ganz herzlich für die Durchführung der Resistenztests and den transgenen Erbsen.

Herrn Priv. Doz. Karlis Briviba von der Bundesanstalt für Ernährung in Karlsruhe danke ich für die Durchführung der HPLC Analysen.

Den Mitarbeitern der Angewandten Genetik sei an dieser Stelle ganz herzlich für die Betreuung meiner Erbsen gedankt.

Traud Winkelmann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre absolut wertvollen Korrekturvorschläge.

Mein ganz besonderer Dank gilt Heiko Kiesecker, der mich während der gesamten Arbeitsphase betreut und motiviert hat, auch wenn es nicht immer einfach für ihn war.

Meinem Mann Markus und meinen Eltern danke ich dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben und mir den Rücken freigehalten haben. Ohne sie wäre diese Arbeit sicher nie zustande gekommen.

Hannover, im Dezember 2004

Andrea Richter

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Erbse (*Pisum sativum* L.)

### 1.1.1 Ursprung

Der Ursprung der heutigen Erbse (*Pisum sativum* L.) ist noch nicht sicher geklärt. Archäologische Funde weisen auf eine Entstehung als Kulturpflanze im Nordwesten Asiens vor etwa 10.000 Jahren hin (MAKASHEVA 1983). Bei Ausgrabungen in Europa jedoch wurden Erbsensamen zusammen mit Weizen, Gerste und Bohnen gefunden, die in die Früh- und Jungsteinzeit eingeordnet werden können (vor etwa 10-20.000 Jahren). Im Alpenvorland deuten Funde aus der Jungsteinzeit sogar auf einen gezielten Einsatz von Hülsenfrüchten wie Erbsen, Linsen und Bohnen in Fruchtwechselfolgen hin (SCHICHTERLE 1989). Es gibt Hinweise, dass die Vorgänger der heutigen Futter- und Gartenerbse durch Kreuzung der ursprünglichen Arten *Pisum elatius* Bieb. und *Pisum fulvum* Sibth et Sm. entstanden sind (MAKASHEVA 1983). Durch Mutationen, intrachromosomale Umordnungen und Hybridisierungen ist sehr schnell eine hohe Variationsbreite in Morphologie und Biologie entstanden (MAKASHEVA 1983). Aus diesen Wildformen ist dann zunächst die Futtererbse (*P. arvense*) hervorgegangen und daraus schließlich die Gartenerbse (*P. sativum*).

Die Verbreitung erfolgte vor etwa 5000 bis 6000 Jahren über den Balkan und Südrussland nach Europa und vor 2000 Jahren über Afghanistan in den indischen Raum. Amerika erreichten sie schließlich erst mit Columbus.

### 1.1.2 Taxonomie

Die Erbse (*Pisum sativum* L.) gehört zu der Familie der *Leguminosae*, die sich mit über 18000 Arten -von baumartigen bis krautigen Pflanzen- durch große Vielfalt auszeichnet ([www.ildis.org/Leguminosae](http://www.ildis.org/Leguminosae)). Aufgrund ihrer Blütenform werden die Leguminosen in drei Unterfamilien eingeteilt: die *Papilionoideae*, die *Caesalpinioideae* und die *Mimosoideae*.

Die *Papilionoideae* stellt die größte der drei Subfamilien dar und enthält neben der Erbse die Kichererbse (*Cicer arietinum*), die Bohne (*Phaseolus vulgaris*), die Sojabohne (*Glycine max*), die Linse (*Lens culinaris*) und die Erdnuss (*Arachis hypogaea*).

Alle Arten der Gattung *Pisum* besitzen eine Chromosomenzahl von  $2n = 14$ . Das Genom ist mit  $3,8-4,8 \times 10^9$  bp (ELLIS 1993), was 4,42 pg DNA/1C ( $S/R=0,333$ ) entspricht, relativ groß. Die Gattung *Pisum* ist mit maximal 7 Arten vergleichsweise klein, es werden aber allein in England 6000 Einträge in den Samenbanken geführt (AMBROSE UND GREEN 1991). Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die der Gattung *Pisum* zugerechneten Arten. Insbesondere die Tatsache, dass fast keine Kreuzungsbarrieren innerhalb der Gattung existieren, führt dazu, dass die Unabhängigkeit der Arten unter Taxonomen sehr umstritten ist (GRIGA UND NOVAK 1990).

Landwirtschaftlich von Bedeutung sind: die Felderbse *Pisum arvense* und die Gartenerbse *Pisum sativum*.

**Tab. 1.1: Verbreitung und Eigenschaften der verschiedenen Arten der Gattung *Pisum* (nach MAKASHEVA 1983, verändert von DE KATHEN 1993)**

systematischer Name	Vorkommen	Eigenschaften
<i>Pisum formosum</i>	in alpinen und subalpinen Regionen des Kaukasus, Iran, Kleinasien	ursprüngliche Form, einzige mehrjährige Pflanze, 5-15 cm groß, lange Rhizome
<i>Pisum fulvum</i>	auf felsigen Böden Syriens, Israels und Arabiens	keine Kulturform, einjährig, stark verzweigt, häufig auftretende Sterilität bei Kreuzungen
<i>Pisum syriacum</i>	auf felsigen Böden Armeniens, der Türkei, Israels, Syriens und des Iran	keine Kulturformen, einjährige 20-25 cm hohe Pflanze, wenig verzweigt, partielle Sterilität bei Kreuzungen
<i>Pisum sativum</i>	weltweit in gemäßigten Klimaten	einjährig, extrem polymorph
<i>Pisum elatius</i>	Zentral-und Südrussland, Kaukasus, Mittelmeer, steinige sandige Böden	einjährig, wird häufig auch als mediterrane Subspecies von <i>Pisum sativum</i> (ssp. <i>elatius</i> ) bezeichnet
<i>Pisum abyssinicum</i>	hauptsächlich Jemen	einjährig, 60-70 cm, einige Kulturformen, wird häufig als Subspecies von <i>Pisum sativum</i> eingeordnet
<i>Pisum arvense</i>	Weltweit	Felderbse, mehrere Kulturformen, oft als ssp. <i>commune</i> bestehend aus ssp. <i>sativum</i> und ssp. <i>arvense</i>

### 1.1.3 Wirtschaftliche Bedeutung

Die Leguminosen stellen innerhalb der dikotylen Pflanzen die Familie mit der höchsten wirtschaftlichen Bedeutung dar. Nur die Getreide haben mit 583 Millionen Tonnen (2001/2002; AEP) einen größeren Stellenwert bei der Weltproduktion von Nahrungs- und Futtermitteln. Im Vergleich zu den Getreiden ist der Proteingehalt der Leguminosen doppelt bis dreimal höher.

Der Anbau von Erbsen erfolgt weltweit, hauptsächlich in den gemäßigten Regionen Europas, in China, Indien und Nordamerika. Jährlich werden etwa 57 Millionen Tonnen Leguminosen (ohne Sojabohne) weltweit produziert (FAO 2001), davon nimmt die Erbse mit 11 Millionen Tonnen etwa 20 % der Leguminosenproduktion ein.

Die Erbsenproduktion verdoppelte sich von 1980 bis 1990 auf etwa 16,5 Millionen Tonnen. In den 90 er Jahren fluktuierten die Produktionszahlen zwischen 15 und 11 Millionen Tonnen (AEP 2004). Mit dem Zerfall der Sowjetunion gab es zu Beginn der 90er Jahre eine drastische Reduktion des Erbsenanbaus von 7,7 Millionen Tonnen (1990) auf etwa 2 Millionen Tonnen (2001) (AEP, 2004), was sich auch auf die Weltproduktion auswirkte.

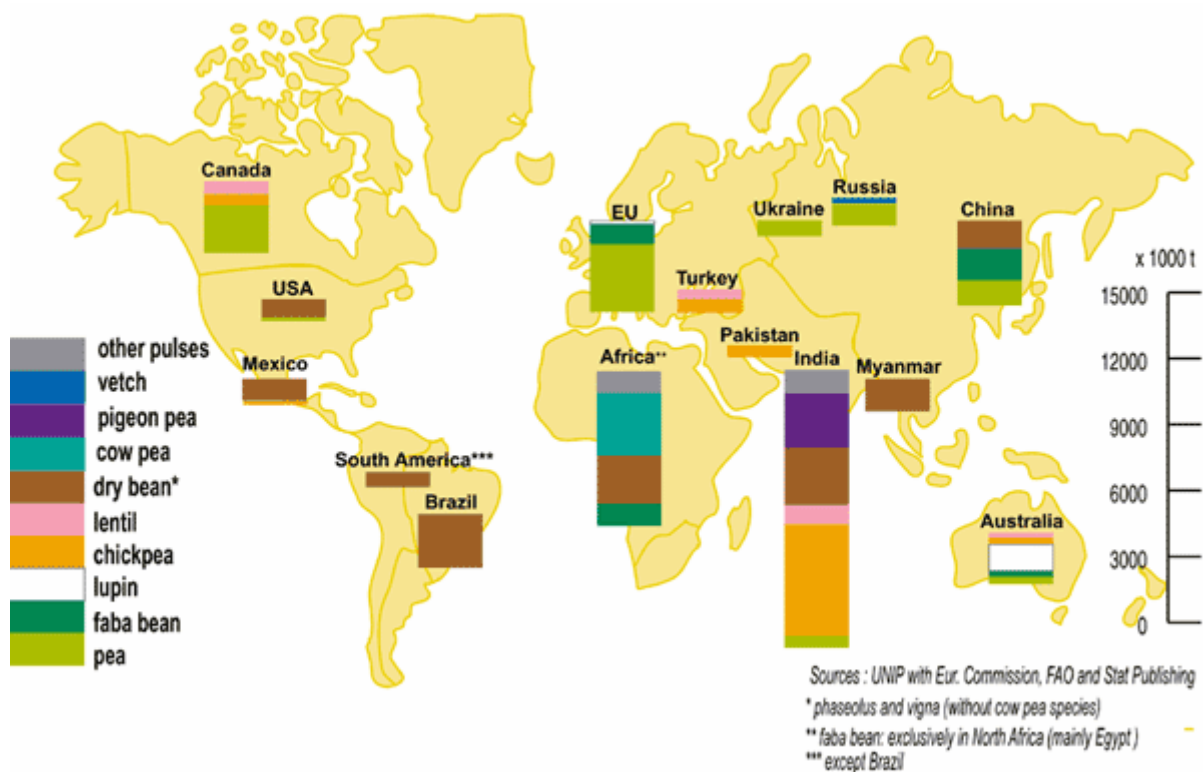


Abb. 1.1 Verteilung der Weltproduktion an *Leguminosen* im Jahr 2001 (AEP, 2004)



Die EU produzierte im Jahr 2000 3,1 Millionen Tonnen Erbsen (30 % der Weltproduktion), davon wurden 63% der Erbsen in Frankreich produziert. In Indien, China, Süd-Amerika und Nord Afrika werden Erbsen hauptsächlich zur menschlichen Ernährung verwendet, während sie in der EU zu etwa 90% als Tierfutter verwendet werden.

#### **1.1.4 Biochemische Zusammensetzung der Erbsensamen**

Wegen des hohen Anteils an Protein sind die Samen der Erbse neben denen der Sojabohne, der Ackerbohne und der Linse die Haupteweißlieferanten der menschlichen und der tierischen Ernährung. Besonders als Kraftfutter in der Tierernährung ist die Erbse als Alternative zur importierten Sojabohne zu sehen. Der Proteingehalt von Erbsen liegt zwischen 15,5 % bis 39,7 % des Trockengewichtes (DAVIES et al. 1985; BRESSANI UND ELIAS 1988). Außerdem enthalten Erbsen sehr viele Kohlenhydrate (Stärke: 20-50 %; Zucker 4-10 %) und relativ wenig Ballaststoffe. Hinzu kommen essentielle Aminosäuren wie Lysin und Tryptophan, Vitamine und Mineralstoffe, die die Erbse zu einer sehr wertvollen Kulturpflanze machen (CHRISTOU 1992). Da die Erbse nur geringe Mengen an Trypsin-Inhibitoren enthält, kann sie direkt, ohne Aufarbeitung, als Tierfutter verwendet werden. Gerade im Zeitalter von BSE, bekommen die proteinreichen Samen der Leguminosen eine noch größere Bedeutung als Alternative zum Tiermehl.

## 1.2 Züchtung bei der Erbse

### 1.2.1 Züchtungsproblematik und Zuchtziele

Die Blüten der Erbsen sind zygomorph, d.h. zweiseitig symmetrisch. Durch die frühe Reife von einem Teil der Staubgefäße herrscht Selbstbefruchtung schon in der geschlossenen Knospe vor (Kleistogamie). Spontane Fremdbefruchtungen treten daher nach einer Einschätzung von GRITTON (1980) mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 1 % auf. Dies ist ein Faktor, der nicht unwesentlich zu der biotechnologischen Sicherheit der Erbse beiträgt. Denn auch wenn ein gewisser Prozentsatz an „Gene flow“ keinerlei Gefahren für natürliche Populationen oder benachbarte Biotope birgt, so mindert es doch die öffentliche Akzeptanz gegenüber transgenen Pflanzen (RAYBOULD 1999). Nach Untersuchungen von POLOWICK et al. (2002), lag die Auskreuzungsrate von transgenen Erbsen bei 0,07 %. In 9000 untersuchten Nachkommen konnten sie lediglich bei fünf Pflanzen das von ihnen verwendete Markergen nachweisen. All diese Pflanzen befanden sich in unmittelbarer Nähe der transgenen Pflanzen, es handelte sich also um den sogenannten „worst case“.

Die heute kultivierten Sorten gehen, trotz der Variabilität innerhalb der Art *Pisum sativum* L., auf nur wenige Linien zurück (DE KATHEN 1993). So stammen alle in Europa angebauten Varietäten von CEBECO- bzw. MANSHOLT-Material ab. Damit haben alle Varietäten faktisch nur einen Vorgänger: die erste, 1915 durch Kreuzung erhaltene, kommerziell genutzte Sorte: Mansholt g.e.k. (gekreuzt, extra kurz) (BOUWMAN 1991).

Die Ertragsstabilität ist bei der Erbse nicht besonders gut ausgeprägt, dies ist sicherlich auch auf den begrenzten Genpool zurückzuführen. Eine Reihe von biotischen und abiotischen Faktoren können die Erträge des Erbsenanbaus erheblich mindern. Während Bakterien und Nematoden im Erbsenanbau nur geringe und meist lokal begrenzte Schäden anrichten, werden durch Viren und Pilze ganz erhebliche Ertragsverluste ausgelöst (HAGEDORN 2001). Die meisten Erbsenviren werden durch Vektoren, wie Aphiden, übertragen.

Durch Pilzerkrankungen werden im Erbsenanbau jedoch die stärksten Ertragseinbußen ausgelöst, zudem wird die Qualität der Erbsen vermindert. Im „Compendium of Pea Diseases

and Pests“ werden mehr als 20 Erbsenkrankheiten beschrieben, die durch Pilze ausgelöst werden können. Zudem kann durch Pilzinfektionen der Gehalt von Mykotoxinen in den Samen dazu führen, dass auch die verbleibende Ernte nicht verwendbar ist.

Die Erhöhung der Ertragsstabilität im Erbsenanbau ist ein sehr komplexes Problem, daher sind auch die Ansätze in der konventionellen Züchtung sehr vielseitig (SNOAD 1985, JACOBSEN 1992, DE KATHEN und JACOBSEN 1993, PUONTI-KAERLAS 1993). Von der Verbesserung der Standfestigkeit, über eine allgemeine Verbesserung der Widerstandskraft gegenüber abiotischen und biotischen Stressoren, bis hin zu einer gezielten Einführung von (bzw. Selektion auf) Resistenzen gegenüber Pathogenen wie dem echten Mehltau (*Erisiphe pisi*) oder der Wurzelfäule (*Aphanomyces euteiches*).

Weder die konventionelle Züchtung noch die Mutationszüchtung konnten die genetische Basis bisher wesentlich verbreitern und führten nur in wenigen Fällen zur Produktion kommerziell genutzter Sorten (GOTTSCHALK und WOLF 1983, BLIXT et al. 1991).

Mit Hilfe gentechnischer Methoden könnte der Gen-Pool der Erbse über die Artgrenzen hinweg erweitert und der konventionellen Züchtung zugeführt werden. Insbesondere die Tatsache, dass häufig erst durch das Zusammenspiel mehrerer Gene ein Effekt erzielt wird, eröffnet durch Kombination von Pflanzenbiotechnologie und Pflanzenzüchtung durch das sogenannte „Gene stacking“ neuartige Möglichkeiten. Zu diesem Thema gibt es bisher nur wenige Arbeiten (HALPIN et al 2001).

## 1.2.2 Biotechnologische Ansätze

Der Schlüssel zur erfolgreichen Integration rekombinanter Gene in marktfähige Sorten liegt in einem effektiven Transformationssystem. Seit den ersten Versuchen zur in-vitro Kultur von HABERLANDT (1902) zeigte sich anhand umfangreicher Experimente im Bereich der pflanzlichen Gewebekultur, dass oft nur bestimmte Gewebetypen oder Zellen bestimmter Entwicklungsstadien in der Lage sind, durch exogene Stimulatoren induziert vollständige Pflanzen zu regenerieren (HALPERIN 1986; POTRYKUS 1991).

Die ersten Ansätze zur Produktion transgener Erbsen stammen aus dem Jahre 1990 (DE KATHEN und JACOBSEN 1990; PUONTI-KAERLAS et al. 1990). Die entwickelten Methoden erwiesen sich jedoch als zeitaufwendig, sortenspezifisch und führten zur Produktion steriler Chimären. In den frühen 90er Jahren wurde sehr intensiv an der Transformation großsamiger Körnerleguminosen und speziell an der Erbsentransformation gearbeitet. Im Jahr 1993 schließlich wurde von SCHROEDER et al. ein Transformationsprotokoll via *Agrobacterium*-vermitteltem Gentransfer publiziert, das vergleichsweise schnell zur Produktion transgener Erbsenpflanzen führte. Dabei wurden Embryoachsensegmente unreifer Samen transformiert und anschließend regeneriert. Dieses Protokoll erweist sich auch heute noch als eines der effizientesten und sortenunabhängigsten Transformationssysteme für Erbsen. Da sich jedoch insbesondere die Auswahl der Reifegrades der Embryonen als sehr schwer reproduzierbar herausstellte, wurde am LGM in Hannover ein Transformationssystem für Erbsen etabliert, das auf dem Protokoll von SCHROEDER et al. basiert. Es werden an Stelle unreifer Embryonen jedoch reife Samen zur Präparation der Embryoachsen und anschließenden Transformation verwendet. Dies hat zwar eine Minderung der Transformationsrate zur Folge (DE KATHEN 1993), das System ist jedoch stabiler und besser reproduzierbar.

Der molekulare Gentransfer ist ein wichtiges Werkzeug für die Grundlagenforschung sowie für die angewandte Züchtung. Das setzt die stabile Integration, Vererbung und Expression der rekombinanten Gene voraus. Die Integrationsmuster und die Expressionslevel unabhängiger Transformanden, die das gleiche Transgen tragen, können sehr stark variieren (PEACH und VELTEN 1991; SPENCER et al. 1992; WALTERS et al. 1992). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch eine Gen-Dosis Effekt, bezogen auf die Homozygotie/Hemizygotie des Transgens, einen Einfluss auf die Expression des Gens haben kann (JAMES et al. 2002). Die Integration

von Backbone Sequenzen kann zum Gene Silencing der Transgene führen (IGLESIAS et al. 1997; MATZKE und MATZKE 1998; JAKOWITSCH et al. 1999) und auch die Integration multipler Kopien der T-DNA (LINN et al. 1990) oder das genomische Umfeld der T-DNA (Positionseffekt, PEACH UND VELTEN 1991; MATZKE und MATZKE 1998) kann die Expression des Transgens erheblich beeinflussen. Um all diesen Phänomenen gerecht zu werden, wurden die transgenen Pflanzen detailliert auf DNA Ebene charakterisiert und anschließend in Bezug auf die Expression des Markergens *bar* und der verschiedenen antifungalen Gene analysiert.

Der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Gentransfer ist zurzeit wohl das gebräuchlichste System zur Integration fremder Gene in Pflanzen Genome (GELVIN 1998; GHEYSEN et al. 1998). Zur Transformation der charakterisierten transgenen Erbsen wurde der entwaffnete *Agrobacterium* Stamm EHA 105 verwendet. Auf dem Ti-Plasmid des Bakteriums wird die T-DNA von zwei nicht identischen 25 bp langen Repeats flankiert, die als linke (LB) und rechte (RB) Bordersequenzen bezeichnet werden. Diese bilden die Erkennungssequenzen für die sogenannten *vir*-Gene des Bakteriums. Sie sind für die Herauslösung des T-DNA Einzelstranges und deren Integration in das pflanzliche Genom zuständig (TINLAND 1996). Bei diesem Vorgang ist das VirD2 Protein von großer Bedeutung (YANOFSKY et al. 1986; BRAVO-ANGEL et al. 1998). Die transferierte DNA wird zufällig an verschiedenen Positionen in die genomische Pflanzen DNA integriert. Hierbei kommt es gelegentlich zur Integration multipler T-DNA Kopien (JORGENSEN et al. 1987; DE NEVE et al. 1997). Diese komplexen T-DNA Integrationsmuster, insbesondere *inverted repeats*, korrelieren stark mit einem „Gene Silencing“ der auf der T-DNA codierten Gene (HOBBS et al. 1993; DEPICKER und van MONTAGU 1997; GELVIN 1998; MUSKENS et al. 2000).

### 1.3 Antifungale Substanzen zur Erhöhung der Resistenz

Mit dem Beginn der molekularen Pflanzenbiologie in den frühen 80er Jahren begann auch die Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung zahlreicher Gene, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind. Erst durch die Isolierung und Charakterisierung dieser Gene wurde es möglich, die komplexen Abwehrmechanismen der Pflanzen gegenüber Schaderregern zu verstehen und die Bedeutung einzelner Gene in den Signalkaskaden zu ermessen. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse konnten neue Strategien zur Erhöhung der Resistenz gegenüber pilzlichen Pathogenen entwickelt werden. Diese neuen Ansätze werden in einem Review von PUNJA (2001) in fünf Kategorien gegliedert:

1. Die Synthese von Genprodukten, die toxisch für die Pathogene sind oder zumindest deren Wachstum oder Ausbreitung reduzieren. In diese Kategorie sind die PR (Pathogenesis related) Proteine einzuordnen, wie z.B. hydrolytische Enzyme, antifungale Proteine, antimikrobielle Peptide, Ribosomen-inaktivierende Proteine und Phytoalexine.
2. Die Synthese von Genprodukten, die einzelne Komponenten des Pathogens abbauen oder neutralisieren können, wie z.B. Polygalakturonasen, Oxalsäuren oder Lipasen.
3. Die Synthese von Genprodukten, die zu einer Erhöhung der strukturellen Resistenz von Pflanzen führen, wie die verstärkte Produktion von Peroxidasen oder Ligninen.
4. Die Produktion von Verbindungen der Signaltransduktionswege in Pflanzen. Dies beinhaltet die Produktion von spezifischen Elicitoren, Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ), Salicylsäure (SA) und Ethylen.
5. Die Expression von „echten“ Resistenzgenen, die in die Hypersensitive Reaktion (HR) oder in spezifische Interaktionen mit Avirulenzgenen (Avr) involviert sind.

Die verschiedenen Mechanismen lassen sich natürlich in der Pflanzenzelle nicht voneinander trennen und so ist zu erwarten, dass z.B. durch den Abbau pilzlicher Zellwände durch hydrolytische Enzyme, Bruchstücke dieser Zellwände entstehen, die ihrerseits wiederum als Elicitoren fungieren und die Pathogenabwehr der Pflanze weiter verstärken.

Um eine möglichst breite Resistenz gegenüber dem komplexen Arsenal phytopathogener Pilze zu erreichen, ist es sinnvoll, zwei oder mehr antifungale Gene mit unterschiedlichem Wirtsspektrum oder Mechanismus in einer Pflanze zu exprimieren (LAMB et al. 1992; CORNELISSEN und MELCHERS 1993; STRITTMATTER und WEGNER 1993; JACH et al. 1995; SHAH 1997; EVANS und GREENLAND 1998; SALMERON und VERNOOIJ 1998; MELCHERS und STUIVER 2000).

Diese Kombination verschiedener antifungaler Gene mittels Kreuzung transgener Pflanzen bildet den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

### 1.3.1 Phytoalexine

Bei den Phytoalexinen handelt es sich um Sekundärmetabolite mit geringer molekularer Masse, die von vielen Pflanzenspezies wie z.B. der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), der Erdnuss (*Arachnis hypogaea*), dem Klee (*Trifolium* L.) und dem Knöterich (*Polygonium cuspidatum*) gebildet werden (LANGCAKE UND PRYCE 1976; INGHAM 1976 und 1978; ARACHI et al. 1982). Sie gehören sehr unterschiedlichen Stoffklassen, wie den Isoprenoiden, Flavonoiden oder den Stilbenen an (HELDT 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die durch Pathogene und Elicitoren induzierbaren Phytoalexine antimikrobiell aktiv sind (HAMMERSCHMIDT 1999; GRAYER und KOKUBUN 2001). Die Produktion von Phytoalexinen findet über komplexe biochemische Synthesewege statt (DIXON et al. 1996).

Durch die Charakterisierung verschiedener Pathogen-Pflanzen-Interaktionen wurde belegt, dass eine Korrelation zwischen der Akkumulation von Phytoalexinen, bzw. deren Fehlen und einer erhöhten Resistenz bzw. Suszeptibilität gegenüber Pathogenen besteht (DERCKX und CREASY 1989; THOMMA et al. 1999).

In transgenen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die Produktion verschiedener rekombinanter Phytoalexine zu einer verzögerten Entwicklung von Schadpilzen und einer verminderten Symptomausprägung bei den transgenen Pflanzen führten (Tabelle 1.2).

Tab.1.2: Expression von Phytoalexinen in transgenen Pflanzen (verändert nach PUNJA 2001)

Pflanzen	Gen Produkt	Effekt auf Pathogene	Referenz
Apfel ( <i>M. domestica</i> )	Stilbensynthase aus Wein ( <i>V.vinifera</i> ) Produktion von Resveratrol	nicht untersucht	SZANKOWSKI et al. (2003)
Gerste ( <i>H. vulgare</i> )	Stilbensynthase aus Wein ( <i>V.vinifera</i> ) Produktion von Resveratrol	Verminderte Kolonisierung des Pflanzengewebes durch <i>Botrytis cinerea</i>	LECKBAND UND LÖRZ (1998)
Luzerne ( <i>M. sativa</i> )	Alfalfa isoflavone O- methyltransferase  Peanut resveratrol synthase	Reduzierte Größe der durch <i>Phoma medicaginis</i> gebildeten Läsionen Reduzierte Größe der durch <i>Phoma medicaginis</i> gebildeten Läsionen, und verminderte Sporulation	HE UND DIXON (2000)
Luzerne ( <i>M. sativa</i> )	Resveratrolsynthase aus der Erdnuss ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Erhöhte Resistenz gegenüber <i>Phoma medicaginis</i>	HIPSKIND UND PAIVA (2000)
Pappel ( <i>P. tremula</i> )	Pinosylvinsynthase aus <i>Pinus sylvestris</i>	Teilweise verminderter Abbau durch <i>Phellinus tremulae</i>	SEPPÄNEN et al. (2004)
Reis ( <i>O. sativa</i> )	Stilbensynthase aus Wein ( <i>V.vinifera</i> ) Produktion von Resveratrol	Reduzierte Größe der durch <i>Pyricularia oryzae</i> gebildeten Läsionen	STARK-LORENZEN et al. (1997)
Tabak ( <i>N. tabacum</i> )	<i>Fusarium trichodiene</i> Synthase	nicht untersucht	ZOOK et al. (1996)
Tabak ( <i>N. tabacum</i> )	Stilbensynthase aus Wein ( <i>V.vinifera</i> ) Produktion von Resveratrol	Verminderte Kolonisierung durch <i>Botrytis cinerea</i>	HAIN et al. (1993)
Tomate ( <i>L. esculentum</i> )	Stilbensynthase aus Wein ( <i>V. vinifera</i> ) Produktion von Resveratrol	reduzierte Größe der durch <i>Phytophthora infestans</i> gebildeten Läsionen; kein Effekt bei <i>Alternaria solani</i> und <i>Botrytis cinerea</i>	THOMZIK et al. (1997)
Wein ( <i>V. vinifera</i> )	Chimäres Stilbensynthase-Gen aus Wein ( <i>V. vinifera</i> ) mit induzierbarem Promotor (PR 10)	reduzierte Symptomausprägung nach Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i>	COUTOS-THEVENOT et al. (2001)
Weizen ( <i>T. aestivum</i> )	Stilbensynthase aus Wein ( <i>V. vinifera</i> ) Produktion von Resveratrol	nicht untersucht	FETTIG UND HESS (1999)
Weizen ( <i>T. aestivum</i> )	Stilbensynthase aus Wein ( <i>V. vinifera</i> ) Produktion von Resveratrol	teilweise erhöhte Resistenz gegenüber echtem Mehltau	LIANG et al. (2000)



### 1.3.2 Polygalakturonase-inhibierende Proteine

Polygalakturonase-inhibierende Proteine (PGIP) sind zellwandassoziierte Glykoproteine, die in mono- und dikotylen Pflanzen vorkommen und die Aktivität pilzlicher Endopolygalakturonasen inhibieren können (POWELL et al. 1994; DESIDERIO et al. 1997; DE LORENZO et al. 2001; DE LORENZO und FERRARI 2002). Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine sehr spezifische Interaktion zwischen PGIP und pilzlicher Endopolygalakturonase. PGIPs zeigen keinen Effekt auf andere pectolytische Enzyme mikrobieller oder pflanzlicher Herkunft (CERVONE et al. 1990). Die limitierende Wirkung der pflanzlichen PGIPs auf die pilzliche Kolonisierung besteht zum einen in der Reduktion der hydrolytischen Aktivität pilzlicher Polygalakturonasen, zusätzlich werden durch die Interaktion zwischen PGIP und PG sogenannte Oligogalacturonide (OG) freigesetzt, die als Elicitoren fungieren und zur Induktion weiterer Abwehrreaktionen in der Pflanze führen (DE LORENZO et al. 2001, D'OVIDIO et al. 2004).

Die Bildung von Polygalakturonasen (PG) konnte bereits für sehr viele phytopathogene Pilze nachgewiesen werden. Die meisten Pilze produzieren multiple Isoenzyme (D'OVIDIO et al. 2004). Sie sind hinsichtlich ihrer Stabilität, spezifischen Aktivität, des pH Optimums, der Form von OG Freisetzung und in ihrer Regulation sehr unterschiedlich (DE LORENZO et al. 1997; WALTON 1994; HERRON et al. 2000). Die codierenden Gene sind in Genfamilien organisiert (ANNIS und GOODWIN 1997; MARKOVIC und JANECEK 2001).

PGIPs sind ebenso vielfältig wie ihre Gegenspieler und sind ebenfalls in Genfamilien organisiert. Das erste PGIP Gen wurde 1992 aus *Phaseolus vulgaris* kloniert (TOUBART et al. 1992). Inzwischen wurden PGIP Gene von sehr vielen verschiedenen Pflanzenspezies kloniert. Bei DE LORENZO et al. (2001) findet sich eine sehr detaillierte Übersicht.

Wenn auch die inhibitorische Aktivität der PGIPs sehr unterschiedlich ist, so ist ihr Aufbau doch relativ ähnlich. Typischerweise enthalten die *pgip* Gene die Sequenz für ein Signalpeptid, welches für die Translokation in das Endoplasmatische Reticulum zuständig ist, das reife Polypeptid besteht aus 300 bis 315 Aminosäuren und hat viele Glycosilierungssignale (DE LORENZO et al. 2001). Charakteristisch für das reife PGIP ist ein

sich 10-fach wiederholendes Sequenz-Motiv, welches aus der Modifikation eines 24 Aminosäure großen, leucinreichen Peptids besteht. Diese Leucin reiche Wiederholung (LRR) tritt auch bei zahlreichen R-Genen auf, die bei der Gen-für-Gen Resistenz bedeutend sind (DE LORENZO et al. 1994; STASKAWICZ et al. 1995). LRRs sind Bestandteile von Proteinen aus Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen, sie sind in jedem Fall für eine Protein-Protein Interaktion zuständig (BUCHANAN und GAY 1996). Bei Pflanzen lässt sich die Funktion der LRR noch weiter eingrenzen in Bereiche der Entwicklung und der Abwehrmechanismen.

Die PGIP-Expression in den Pflanzen kann durch diverse Stress-Stimuli wie Verwundung oder Pathogeninfektion ausgelöst werden. Auch durch die Behandlung mit Acetylsalicylsäure (BERGMANN et al. 1994) und Methyl-Jasmonat (REYMOND et al. 2000; SCHENK et al. 2000) konnte bei einigen Pflanzen eine Expression der PGIPs induziert werden. Die bei DE LORENZO et al. (2001) beschriebenen Untersuchungen zur Induktion der PGIPs und funktionellen Promotoranalyse in verschiedenen Pflanzen zeigen jedoch ganz deutlich wie komplex dieses Thema ist, da einige PGIPs zudem noch gewebespezifisch exprimiert werden oder auch nur in bestimmten Entwicklungsstadien der Pflanze vorkommen (ABU-GOUKH et al. 1983; JOHNSTON et al. 1993; YAO et al. 1999).

Transgene Pflanzen, die PGIPs überexprimieren oder über effiziente RNAi Techniken ausgeschaltet werden, bieten eine gute Möglichkeit zur Klärung der Bedeutung der PGIPs innerhalb der Pflanzenabwehrmechanismen gegenüber phytopathogenen Pilzen.

Darüber hinaus bieten die PGIPs eine weitere Möglichkeit, mit den Methoden der angewandten Gentechnik die Pilzresistenzspektren wertvoller Kulturpflanzen zu erweitern. Aufgrund der hohen Spezifität der einzelnen PGIPs, bietet sich gerade hier die Kombination verschiedener rekombinanter PGIPs an, um ein größeres Wirkungsspektrum zu erzielen.

Die Expression von PGIPs in transgenen Pflanzen führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die in Tabelle 1.3 kurz erläutert werden.

**Tab.1.3: Expression von PGIPs in transgenen Pflanzen**

Pflanzen	Gen Produkt	Effekt auf Pathogene	Referenz
Apfel ( <i>M. domestica</i> )	<i>AdPGIP</i> – PGIP aus Kiwi ( <i>Actinidia deliciosa</i> L.)	nicht untersucht	SZANKOWSKI et al. (2003)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtPGIP1</i> - PGIP 1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>AtPGIP2</i> – PGIP 2 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	eine Verdoppelung beider PGIP Gene führte zu einer Überexpression und zu einem signifikant reduzierten Befall mit <i>Botrytis cinerea</i>	FERRARI et al. (2003)
Tomate ( <i>L. esculentum</i> )	<i>PvPGIP1</i> – PGIP aus Bohne ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Keine Effekt auf die Infektion mit <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> , <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> , <i>Alternaria solani</i>	DESIDERIO et al. (1997)
Tomate ( <i>L. esculentum</i> )	<i>PcPGIP1</i> – PGIP aus Birne ( <i>Prunus</i> )	Reduzierte Entwicklung von <i>Botrytis cinerea</i>	POWELL et al. (2000)

### 1.3.3 Kombination von antifungalen Substanzen

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse über die Anwendung von potentiell antifungalen Genen in transgenen Pflanzen ergeben ein sehr diffuses Bild: In vielen Ansätzen konnte eine Erhöhung des Resistenzniveaus durch die heterologe Expression antifungaler Gene erreicht werden (Tab. 1.2 und 1.3; Übersicht in PUNJA 2001). Jedoch zeigen viele transgene Pflanzen nur eine sehr geringe Erhöhung der Resistenz und es gibt auch Berichte, in denen keine Erhöhung der Resistenz durch Integration einzelner antifungaler Gene erreicht werden konnte (NEUHAUS et al. 1991; NIELSEN et al. 1993; PUNJA UND RAHARJO 1996; DESIDERIO et al. 1997; KIM et al. 1999; WANG et al. 1999). Für viele PR Proteine, besonders hydrolytische Enzyme wie Glucanase und Chitinase, konnte bereits eine synergistische Wirkung gezeigt werden (SELA-BUURLAGE et al. 1993; VAN DEN ELZEN et al. 1993; ZHU et al. 1994; JONGEDIJK et al. 1995; MELCHERS UND STUIVER 2000). Die Wirkung kombinierter rekombinanter Resistenzgene ist bisher nur in der Kombination von Chitinase mit Glucanase und Chitinase mit RIP (Ribosome inactivating Proteins) untersucht worden (Übersicht Tabelle 1.4). Die bisher gewonnenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Expression zweier oder

multipler Pilzresistenzgene in einer Pflanze zu einer effektiveren Resistenz mit einem weiteren Wirkungsspektrum führen kann als jede monogenetische Resistenz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Strategie verfolgt und durch Kreuzung transgener Erbsenlinien die verschiedenen Resistenzen miteinander kombiniert.

**Tab.1.4: Expression kombinierter Genprodukte zur Erhöhung der Pilzresistenz in transgenen Pflanzen (verändert nach GROVER und GOWTHAMAN 2003; PUNJA 2001)**

Pflanzen	Gen Produkte	Effekt auf Pathogene	Referenz
Karotte ( <i>D. carota</i> )	Chitinase (Klasse I; <i>N.tabacum</i> ) + $\beta$ -1,3-Glucanase (Klasse I; <i>N.tabacum</i> )	Erhöhte Resistenz gegenüber <i>Alternaria dauci</i> , <i>Alternaria</i> <i>radicina</i> , <i>Cercospora carotae</i> , <i>Erisiphe heraclei</i>	MELCHERS und STUIVER (2000)
Tabak ( <i>N. tabacum</i> )	Chitinase (Klasse I; <i>O. sativa</i> ) + $\beta$ -1,3-Glucanase (Klasse II; <i>M. sativa</i> )	Langsamere Läsionenentwicklung und weniger Läsionen durch <i>Cercospora nicotianae</i>	ZHU et al. (1994)
Tabak ( <i>N. tabacum</i> )	Chitinase (Klasse II; <i>H. vulgare</i> ) + $\beta$ -1,3-Glucanase (Klasse II; <i>H. vulgare</i> )	Reduzierter Befall durch <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Alternaria</i> <i>alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	JACH et al. (1995)
Tabak ( <i>N. tabacum</i> )	Chitinase (Klasse II; <i>H. vulgare</i> ) + RIP (Typ 1; <i>H. vulgare</i> ) (Ribosome inactivating protein)	Reduzierter Befall durch <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Alternaria</i> <i>alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	JACH et al. (1995)
Tomate ( <i>L. esculentum</i> )	Chitinase (Klasse I <i>N. tabacum</i> ) + $\beta$ -1,3-Glucanase (Klasse I, <i>N. tabacum</i> )	Reduzierter Befall durch <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	JONGEDIJK et al. (1995); VAN DEN ELZEN et al. (1993)

Es muss natürlich dabei bedacht werden, dass die Integration multipler rekombinanter Gene mit konstitutiv exprimierenden Promotoren zu „Gene Silencing“ Effekten in der Pflanze führen kann. Zum einen können die Transgene einem „Silencing“ unterliegen, aber auch die Stilllegung endogener Homologe wäre durch die Integration rekombinanter Genen möglich (KUNZ et al. 1996; CHAREONPORNWATTANA et al. 1999).

## 1.4 Konzeption der vorliegenden Arbeit

Pilzinfektionen sind entscheidende Effektoren für die unbefriedigende Ertragsstabilität bei Leguminosen. Die Verbesserung des Resistenzniveaus gegenüber phytopathogenen Pilzen wie *Ascochyta pisi* oder *Aphanomyces euteiches* ist diesbezüglich eines der vorrangigen Ziele der Züchtung in Europa. Die Übertragung rekombinanter antifungaler Gene in die Erbse stellt in jedem Falle eine Ergänzung des Resistenzspektrums von Erbsen dar. Eine Dauerhaftigkeit der Resistenz ist aber nur dann gegeben, wenn diese nicht auf der Wirkung eines einzigen Resistenzgens beruht, sondern durch multiple Resistenzgene erzeugt wird. Im Rahmen eines EU Projektes (PRELEG) wurden am Lehrgebiet Molekulargenetik antifungale Gene in drei Erbsenzuchtlinien übertragen: 'Baroness', 'Baccara' (Europa, Deutschland) und 'Greenfeast'(Australien). Als antifungale Gene wurden das *pgip1* Gen aus der Himbeere (*Rubus idaeus* L.) und das *pgip* Gen aus der Kiwi (*Actinidia deliciosa* L.) verwendet, sowie das Stilbensynthase Gen (*vst1*) aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.). Die aus dieser Projektarbeit erhaltenen Pflanzen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit molekular und funktional charakterisiert. In der Literatur gibt es viele Hinweise darauf, dass transgene Pflanzen, die lediglich ein Resistenzgen exprimieren, nur selten absolute Resistenzen gegenüber pilzlichen Pathogenen aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein sogenanntes 'Gene stacking' antifungaler Konstrukte mit unterschiedlichen Wirkmechanismen in Zuchtlinien von Erbsen durchgeführt. Die verschiedenen Resistenzgene wurden dazu über Kreuzung transgener Elternlinien miteinander kombiniert. Es schloss sich eine molekulare und funktionale Charakterisierung der Hybriden an.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Autoklav	Tuttnauer, Systec 5075 ELV
Binokular	Leica
Brutschränke	Memmert, Modell 400
Digitalkamera	Nikon
Fluorometer	BioRad
Gelapparatur	BioRad / Polymehr
Geldokumentation	Intas
Hybridisierungssofen	Biometra / H.Saur Laborbedarf
Inkubator	Heidolph Inkubator 1000
Kamera	Nikon
Mikroskop	Zeiss
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000
Reinstwasseranlage	Millipore
Schüttler	Heidolph Unimax 1010
Sterilwerkbank	Karl Bleymehl, Reinraumtechnik
Thermocycler	Biometra, T3
Transilluminator	Vilber Lourmat
Vortex	Heidolph REAX top
Waagen	Sartorius, Handy und 3705
Zentrifugen	Eppendorf 5415C; Sigma 302

#### 2.1.2 Materialien

Amicon Filter 10kD	Microcon Millipore; Amicon Millipore
Glasflaschen	Schott
Substrate	Biohum, Dransdorf
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt

Perligran G	Deutsche Perlite GmbH, Dortmund
Röntgenfilme	Kodak Biomax; Roche
Nylonmembran	Roche
Plastikverbrauchsmaterial	Greiner, Kitzel, Sarstedt
Zählkammer (Fuchs-Rosenthal)	Assistent
Objektträger	Roth
Deckgläschen	Roth

### 2.1.3 Reagenzien

2iP	Duchefa
6-Benzylaminopurin	Duchefa
AcetylCoA C <sup>14</sup> markiert	Amersham
Agar-Agar	Roth
Agarose HEEO Ultra Qualität	Roth
BASTA <sup>®</sup>	Bayer
Chloroform	Roth
Combactam	Pfizer
CornMealAgar	Sigma
CTAB	Roth
D(+)-Saccharose	Roth
Dig Easy Hyb	Roche
DIG DNA Labelling Mix	Roche
HCL 6M	Riedel-de Haen
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Eisessig (Essigsäure 99,8 %)	Roth
Glufosinat-ammonium PESTANAL <sup>®</sup>	Riedel-de Haen
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Maleinsäure	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth

Methylenblau	Sigma
Murashige & Skoog Medium (Makro-und Mikrosalze incl. Vitamine)	Duchefa
MOPS	Biomol
Myo-inositol	Serva
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Phenol	Roth
Plant Agar	Duchefa
Polygalacturonsäure	Sigma
RNase I	Quiagen
SDS	Roth
Ticarcillin	Duchefa
Tris-HCL	Roth
Tween20	Roth

**Spezielle Chemikalien, Enzyme, Kits:**

Anti-Digoxygenin-AP Fab fragments	Roche
Anti-DIG-AP-Konjugat	Roche
BamHI	MBI Fermentas
CDP Star	Roche
DIG Marker II	Roche
DNA Ladder 100bp plus	MBI Fermentas
DNA Ladder 1 kb	MBI Fermentas
dNTP Mix	MBI Fermentas
EcoRI	MBI Fermentas
Fluorescent DNA Quantification Kit	BioRad
Loading Dye (6x)	MBI Fermentas
MMLV-RT	MBI Fermentas
RNase Inhibitor	MBI Fermentas
RNeasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit	Qiagen Cat. No. 74903



Nucleo Spin <sup>®</sup> RNA Plant	Macherey-Nagel Cat. No. 740949
Concert <sup>™</sup> Plant RNA Reagent	Invitrogen Cat. No. 12322-012
SacI	MBI Fermentas
Taq Polymerase (Combizyme)	Invitrogen
Taq Polymerase (Red Taq)	Natutec
Xba I	MBI Fermentas

### 2.1.4 Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde Pflanzenmaterial charakterisiert, welches zuvor am LGM nach dem modifizierten Protokoll von SCHRÖDER et al. (1993) erstellt wurde.

Durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer wurden im Rahmen eines EU Projektes (PRELEG) verschiedene antifungale Gene in drei Erbsenzuchtlinien übertragen: ‘Baroness’, ‘Baccara’ (Europa, Deutschland) und ‘Greenfeast’ (Australien). Für die vorliegende Arbeit wurden transgene Erbsenpflanzen verwendet, die jeweils ein rekombinantes antifungales Gen beinhalten: zwei unterschiedliche Polygalakturonase-inhibierende Proteine (PGIP) aus Kiwi (*Actinidia deliciosa* L.) und Himbeere (*Rubus idaeus* L.), und das vst1 Gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), welches für die Stilbensynthese codiert.

### 2.1.5 Pilzliche Polygalakturonasen

Zum Test der PGIP Aktivität in den transgenen Pflanzen wurde ein Agarose Diffusionstest (2.2.3.3) durchgeführt. Die dafür nötigen pilzlichen Polygalakturonasen wurden freundlicherweise von Frau Professor Giulia DeLorenzo, Dip. Biologia Vegetale, Universität „La Sapienza“ in Rom, Italien zur Verfügung gestellt.

*Botrytis cinerea* Stamm B05-10

Dr. Paul Tudzynski, Westfälische Wilhelms Universität, Münster

*Stenocarpella maydis* (Isolate von Mais) PPRI#6353

Dr. Berger, Universität Pretoria, Südafrika (BERGER et al. 2002 )

*Colletotrichum acutatum* (Lupin Pathogen) Zuordnung nicht eindeutig geklärt (YANG UND SWEETINGHAM 1998; NIRENBERG et al. 2002; TALHINHAS et al. 2002) Dr. Berger, Universität Pretoria, Südafrika

Eine der verwendeten pilzlichen Polygalakturonasen, wurde am LGM im Rahmen dieser Arbeit isoliert. Deren Isolierung aus *Aphanomyces euteiches* wird unter 2.2.3.6 beschrieben.

## 2.1.6 Pflanzenpathogene

Tab.2.1: Pflanzenpathogene

Pathogen		Stamm	Herkunft	
<i>Aphanomyces euteiches</i>	Wurzelpathogen	ATCC 201684	Dänemark	
<i>Erysiphe pisi</i>	Echter Mehltau		Cordoba	Dr. Diego Rubiales
<i>Uromyces pisi</i>	Rost	Einsporisolat	Cordoba	Dr. Diego Rubiales

## 2.1.7 Nukleinsäuren

### 2.1.7.1 Oligonukleotide zur Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Für die PCR-Analysen wurden Oligonukleotide der Firma MWG Biotech verwendet. Folgende Primersequenzen wurden für den Nachweis der verschiedenen Gensequenzen und zur Herstellung der Sonden für die Southern-Blot-Analyse verwendet:

Tab.2.2: Primersequenzen zur Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Zielgen	Name	Sequenz	Produkt-Größe
Stilbensynthasegen aus	RT vst1 sense	5'-TCTACCAGTCTGATTATGCTGA-3'	611 bp (DNA)
<i>Vitis vinifera</i> L.	RT vst1 antisense	5'-TCTTTAAGAGCCTTCAATGC-3'	255 bp (mRNA)
Stilbensynthasegen aus	Vst Sonde 1 forw	5'-GATGTTTATCAGGCTCATAT-3'	937 bp
<i>Vitis vinifera</i> L.	Vst Sonde 1 rev	5'-ATACTTAAGTGATCCACGAA-3'	

Zielgen	Name	Sequenz	Produkt- Größe
Stilbensynthasegen aus <i>Vitis vinifera</i> L.	Vst Sonde 2 forw Vst Sonde 2 rev	5'-TTGTACCATCAAGGTTGCTA-3' 5'-ACTTGCAGTTTCATCCACTT-3'	906 bp
PGIP Gen aus <i>Actinidia deliciosa</i>	kPGIP 31 kPGIP 686	5'-GAGTACTACTGCCATTTCCC-3' 5'-GCGAGACATCAATCACTGTG-5'	655 bp
PGIP Gen aus <i>Actinidia deliciosa</i>	kPGIP 691 kPGIP 929	5'-CATGCTTTCTGGCGATATAT-3' 5'-TCCAGTCGGAATATGACCAC-3'	238 bp
PGIP Gen aus <i>Actinidia deliciosa</i>	kPGIP 708 kPGIP 1150	5'-TATCGTTCATGTTCCGGTCA-3' 5'-CCCAATGGAAATTCCTATGG-3'	442 bp
PGIP Gen aus <i>Rubus idaeus</i> L.	pSCP1 108 pSCP1 733	5'-CAAGACAGCCTTCAACAACCC-3' 5'-CCACAATCTGGGTGGTCTTGT-3'	625 bp
PGIP Gen aus <i>Rubus idaeus</i> L.	r PGIP 1 r PGIP 366	5'-ATGATGGACTTCAAGCTCTT-3' 5'-CTTGAGATGTTTAAGCTTGG-3'	365 bp
PGIP Gen aus <i>Rubus idaeus</i> L.	r PGIP 421 r PGIP 958	5'-CAGCTCAAGAACCTCACATT-3' 5'-GGTTATGGAAATACGACGTG-3'	537 bp
bar-Gen aus <i>Streptomyces Hygroscopicus</i>	bar sense bar antisense	5'-GCAGGAACCGCAGGAGTGGA-3' 5'-AGCCCGATGACAGCGACCAC-3'	264 bp
High-mobility group protein <i>Pisum sativum</i> L. Intron flankierende Primer	HMG int forw 570 HMG int rev 570	5'-ATGGCAACAAGAGAGGTTAA-3' 5'-TGGTGCATTAGGATCCTTAG-3'	570 bp (DNA) 370 bp (c-DNA)

### 2.1.7.2 Oligonukleotide zum Nachweis von Backbone Sequenzen

Die in der Tabelle 2.3 aufgeführten Primer dienten zum Nachweis von Vektorsequenzen, sie wurden ebenfalls von der Firma MWG Biotech bezogen.

**Tab.2.3: Primersequenzen zum Nachweis von Backbone Sequenzen**

Zielgen	Name	Sequenz	Produktgröße
Kanamycinresistenzgen	Kan/bin 999	5'-AAGATTATACCGAGGTATG-3'	267 bp
<i>npt III</i>	Kan/bin 1266	5'-CATTAGTCCATGCAAGTTT-3'	
Kanamycinresistenzgen	SF Kan forw	5'-ATAAACCCAGCGAACCATTTGAGGT-3'	1150 bp
<i>npt III</i>	SF Kan rev	5'-TACGCAGCGGTATTTTTTCGATCAGT-3'	
Linke Border	Bin 19 LB forw 5705	5'-ATCGTCAACGTTCACTTCTAAAGAA-3'	793 bp
des pGPTV	Bin 19 LB rev 6498	5'-AAAAACTTGATTTGGGTGATGG-3'	
Rechte Border	Bin 19 RB forw 9055	5'-TTGCTAGCTGATAGTGAC-3'	1161 bp
des pGPTV	Bin 19 RB rev 10216	5'-CCAACAGTGAAGTAGCTGA-3'	

### 2.1.7.3 Binäre Vektoren

Im Folgenden werden die T-DNAs der zur Transformation verwendeten Plasmide dargestellt. Ausserhalb der T-DNA ist bei allen dargestellten Plasmiden *nptIII*-Gen enthalten. Es stammt aus *Enterococcus faecalis* und codiert für eine Amino-glycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III, die eine Resistenz gegen Kanamycin, Neomycin, Amikacin und weiteren Antibiotika dieser Klasse verleiht.

Alle zur Transformation verwendeten Vektoren basieren auf dem Vektor pGPTV (BECKER et al. 1992), einem Derivat des pBIN19.

#### 2.1.7.3.1 pSCP1

Dieses Plasmid beinhaltet auf der T-DNA das PGIP Gen aus der Himbeere (*Rubus idaeus* L.), es codiert für ein Polygalakturonase-inhibierendes Protein (WILLIAMSON et al. 1993; RAMANATHAN et al. 1996). Das Gen steht unter der Kontrolle eines doppelten 35S Promotors. Das Genkonstrukt wurde im Rahmen des EU Projektes PRELEG vom Scottish Crop Research Institute (SCRI) zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich enthält das Plasmid das *bar*-Gen (THOMPSON et al. 1987) aus *Streptomyces hygroscopicus* als selektives Markergen. Das *bar*-Gen steht unter der Kontrolle des konstitutiven Nopalin-Synthase Promotors aus *Agrobacterium tumefaciens*. Das *bar*-Gen kodiert für die Phosphinothricinacetyltransferase, es führt durch Acetylierung zur chemischen Inaktivierung von Phosphinothricin (auch Glufosinat). PPT bindet als Struktur analogon des Glutamats irreversibel an die katalytische Grube der Glutaminsynthetase und führt so zur Ammoniumakkumulation und Blattschäden im Licht (HOCK et al. 1995, S.162). Die entscheidende phytotoxische Wirkung von PPT scheint jedoch die Verarmung an Glutamin zu sein, wodurch sowohl der oxidative C2-Kohlenstoffzyklus als auch der Aminosäureaufbau blockiert wird. PPT ist aktives Agens der Totalherbizide BASTA® und Liberty®.

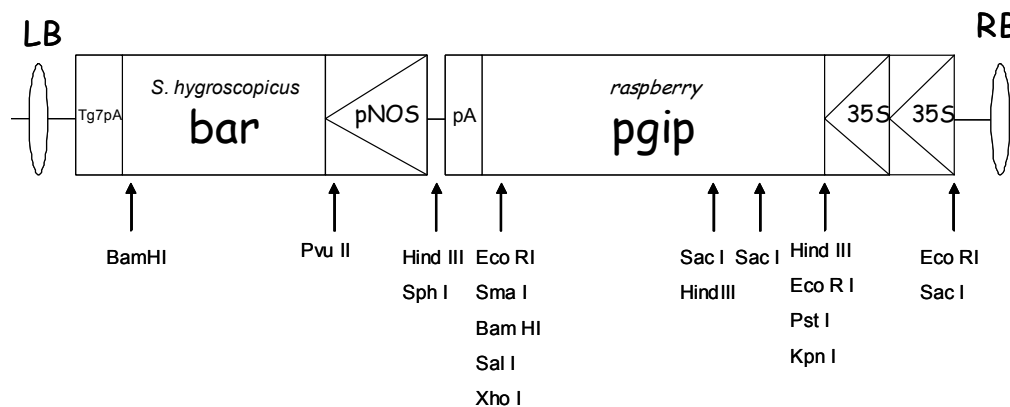


Abb.2.1: Schematische Darstellung der T-DNA des Plasmids pSCP1

### 2.1.7.3.2 pSCP2

Dieses Plasmid beinhaltet auf der T-DNA das PGIP Gen aus Kiwi (*Actinidia deliciosa*), es kodiert für ein Polygalakturonase-inhibierendes Protein (SIMPSON et al. 1995). Das Gen steht unter der Kontrolle des doppelten 35S-Promotors. Das Genkonstrukt wurde im Rahmen des EU Projekts PRELEG vom Scottish Crop Research Institute (SCRI) zur Verfügung gestellt. Zusätzlich enthält das Plasmid das *bar*-Gen (THOMPSON et al. 1987) aus *Streptomyces hygroscopicus* als selektierbares Markergen. Das *bar*-Gen steht unter der Kontrolle des konstitutiven Nopalin-Synthase Promotors.

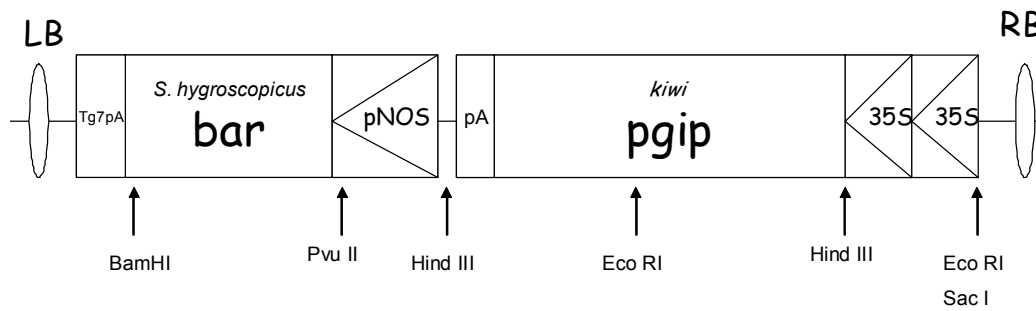


Abb.2.2: Schematische Darstellung der T-DNA des Plasmids pSCP2

### 2.1.7.3.3 pHKvst

Das Plasmid beinhaltet auf der T-DNA das *vstI*-Gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), es codiert für die Stilbensynthese. Das Enzym synthetisiert Resveratrol aus den Substraten p-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA. Das Gen steht unter der Kontrolle des eigenen UV- und Elicitorinduzierbaren *vstI*-Promotors. Der kodierende Bereich des Gens ist durch ein Intron (1797-2153 bp) unterbrochen.

Das Genkonstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. Hain, Bayer Crop Science, zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich enthält das Plasmid das *bar*-Gen (THOMPSON et al. 1987) aus *Streptomyces hygroscopicus* als selektives Markergen, welches durch den *nos*-Promotor reguliert wird.

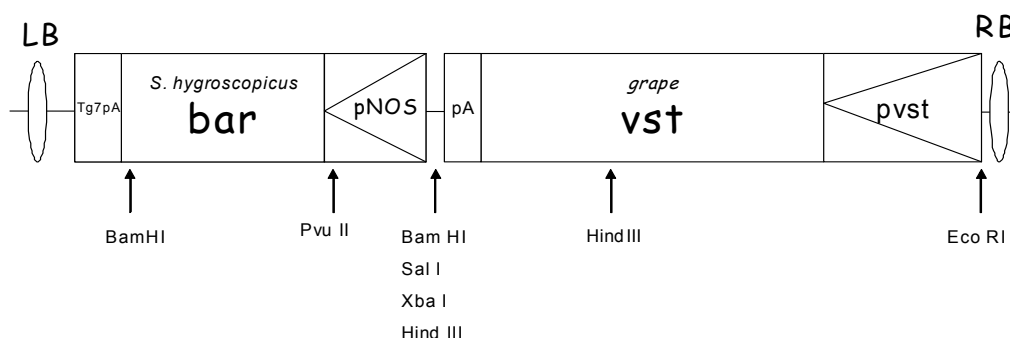


Abb.2.3: Schematische Darstellung der T-DNA des Plasmids pHKvst

## 2.1.8 Medien

### 2.1.8.1 Medien zur Anzucht phytopathogener Pilze

CMA Agar wurde zur Anzucht von *Aphanomyces euteiches* bei 21°C verwendet:

Corn Meal Agar	17 g/L
----------------	--------

Maltose Pepton Broth Flüssigmedium zum Mycelwachstum von *Aphanomyces euteiches* bei 21°C:

Maltose	3 g/L
Pepton (tryptisch verdaut)	1 g/L

### 2.1.8.2 Pflanzenmedien

Als Basismedium für die pflanzliche Gewebekultur (P 2), wurde die Fertigmischung des Mediums nach MURASHIGE & SKOOG (1962) von der Firma Duchefa verwendet. Hinzugefügt wurde die Vitamin Mischung B5 (Duchefa).

Zur Vermehrung der Pflanzen wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

30 g/L	Saccharose
20 µM	BAP
0,106 µM	NAA
2,5 bis 15 mg/l	PPT
100 mg/l	Combactam
100 mg/l	Ticarcillin
pH 5,8	
7,5 g/L	Plant Agar

Zur Elongation und Bewurzelung der Pflanzen (1/2 MS) wurde das Basismedium in halber Konzentration verwendet, ausserdem wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

20 g/L	Saccharose
10 µM	IBA
10 mg/l	PPT
100 mg/l	Combactam
100 mg/l	Ticarcillin
pH 5,8	
7,0 g/L	Plant Agar

Zur Selektion der transgenen Pflanzen wurde das Totalherbizid Glufosinat-Ammonium der Firma Riedel-de Haen verwendet, es beinhaltet das L-Isomer Phosphinitricin (PPT) als herbiziden Wirkstoff.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung und Kultur der transgenen Erbsen

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Pflanzen wurden im Rahmen eines EU Projektes (PRELEG) hergestellt. Die Transformation der Pflanzen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, sie soll jedoch unter 2.2.1.1 kurz erläutert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen von einigen potentiell transgenen Pflanzen Samen vor, andere Klone befanden sich noch in der in-vitro Kulturphase, in der die potentiell Transgenen als T0 bezeichnet werden.

#### 2.2.1.1 Pflanzentransformation

Zur Transformation der Erbsen wurde das Protokoll von SCHRÖDER et al. (1993) wie folgt abgeändert: Im Gegensatz zum Originalprotokoll wurden reife Embryonen zur Transformation verwendet, da diese einfacher zu erhalten sind.

Erbsensamen der Sorten 'Baroness', 'Baccara' oder 'Greenfeast' wurden einer Oberflächensterilisation unterzogen (5 min 70% Ethanol; 10 min 6 % NaOCl; 3 x 10 min steriles dest. Wasser) und über Nacht in Wasser vorgequollen. Die Samenschale der vorgequollenen Samen wurde entfernt, der Embryo an den Kotyledonen abgetrennt, die Radicula entfernt und der Sprosssteil des Embryos in mehrere Längsscheiben zerschnitten. Die Embryoscheiben wurden direkt in einer Agrobakteriensuspension gesammelt.

Nach Abschluss der Präparation wurden alle Explantate auf ein Kokulturbedium überführt und für 4 Tage bei 21°C und 16/8h (Licht/Dunkel) kultiviert. Nach Ablauf der Kokultur werden die Explantate in einer Waschlösung aus autoklaviertem Wasser mit Ticarcillin (300 mg/l) gespült und auf das unter 2.1.8.2 beschriebene P2 Medium ohne PPT überführt. Die Explantate wurden alle zwei Wochen subkultiviert. Nach etwa acht Wochen wurde mit der stufenweise (vier Wochen) erhöhten Selektion (2,5 mg/L; 5 mg/L; 7,5 mg/L; 10 mg/L; 15 mg/L) mittels PPT begonnen. Die auf 15 mg/L PPT selektierten Sprosse wurden auf ½ MS bewurzelt und anschließend im Gewächshaus kultiviert und zur Samenreife gebracht.





### **2.2.1.3 In-vitro-Vermehrung**

Da nicht alle selektierten Sprosse sofort angepasst werden konnten und Samen produzierten, wurden die verbleibenden Klone zunächst in der in-vitro Kultur erhalten. Dazu wurden die Pflanzen im 10 Wochen Rhythmus auf dem unter 2.1.8.2 beschriebenen Medium P2 subkultiviert.

### **2.2.1.4 Akklimatisierung der In-vitro Sprosse**

Zur Anpassung im Gewächshaus wurden die in-vitro Sprosse zunächst auf  $\frac{1}{2}$  MS Medium mit IBA (2.1.8.2) kultiviert, um eine Bewurzelung zu erreichen. Die elongierten, teilweise bewurzelten Pflanzen wurden von Agarresten befreit und in TKS I Substrat pikiert. Durch eine kurzfristige Abdeckung der Pflanzen mit Plastikhaube wurde eine hohe Luftfeuchtigkeit zum Anwachsen gewährleistet. Da die Kutikula der in-vitro Pflanzen noch wenig ausgebildet ist, wurden die Pflanzen auf diese Weise vor einer zu starken Transpiration bewahrt. Diese Massnahme wurde nach ca. einer Woche sukzessive reduziert, um die Pflanzen vollständig an Gewächshausbedingungen zu akklimatisieren. Die Temperaturen im Gewächshaus lagen zur Anpassung der T0 Pflanzen bei ca. 18 °C. Der Licht-Dunkel-Rhythmus betrug 16/8h und wurde je nach Jahreszeit durch Assimilationslicht unterstützt.

### **2.2.1.5 Kulturführung im Gewächshaus**

Die Samen keimen optimal bei Temperaturen um 18 °C und die Sämlinge werden danach bei 12 °C kultiviert (persönliche Mitteilung Dr. Ebmayer, Firma Lochow Pettkus). Dies führt zu langsamerem Wachstum, kräftigeren Sprossen, längeren Internodien und damit letztlich zu einem höheren Samenertrag. Insbesondere bei Pflanzen, die zur Kreuzung (2.2.1.6) verwendet werden sollten, wurde auf die Einhaltung der Temperaturen geachtet, da durch eine langsame Entwicklung der Blüten die Kreuzungsarbeit wesentlich vereinfacht wurde und so alle Blüten einer Pflanze optimal genutzt werden konnten. Die Belichtungsdauer betrug 16 h und wurde durchgängig durch Assimilationslicht unterstützt. Als Substrat wurde eine Gehölzerde von Ökohum (Dransfeld) verwendet, die einen relativ hohen Sandanteil und wenig Nährstoffe beinhaltet. Eine Düngung der Pflanzen war nicht nötig.

Pflanzenschutzbehandlungen wurden je nach Bedarf mit verschiedenen biologischen und chemischen Pflanzenschutzmitteln durchgeführt.

Bei den beschriebenen Bedingungen dauerte eine Vegetationsperiode von der Keimung bis zur Samenreife etwa 12 Wochen. Die Samen wurden nach vollständiger Abreife geerntet und

trocken bei Raumtemperatur gelagert. Bei höheren Temperaturen konnte die Samenreife wesentlich schneller erreicht werden, jedoch ging dies immer zu Lasten des Samenertrages. Zudem wird durch höhere Gewächshaustemperaturen der Pathogendruck enorm erhöht, so dass sich diese Vorgehensweise nur in Einzelfällen anbietet.

### 2.2.1.6 Kreuzung der Erbsen

Die Pflanzen wurden zur Kreuzung wie unter 2.2.1.5 beschrieben kultiviert. Etwa sechs bis acht Wochen nach Keimung der Erbsen kam es zur Bildung der ersten Infloreszenzen. Sobald von einem der beiden Kreuzungspartner reifer Pollen zur Verfügung stand, wurde mit der Kreuzungsarbeit begonnen. Die einzelnen Schritte sind in Abb.2.4 zu erkennen.



**Abbildung 2.4: Einzelne Arbeitsschritte der Kreuzung. A: Entfernung der unreifen Pollen; B: Pollenernte; C: Auftragen der Pollen auf die Narbe; D,E,F: Entwicklung der befruchteten Blüte zur Hülse.**

Das Bild A zeigt die Öffnung einer unreifen Blüte und die Entfernung der Antheren mit den unreifen Pollen. Auf dem Bild B ist eine Blüte mit reifen Pollen zu erkennen. Die Pollen wurden mit Hilfe einer Pinzette von dem Donor geerntet und auf die Narbe des Rezipienten aufgetragen (C). Die bestäubte Blüte erhielt ein Etikett mit der entsprechenden

Kreuzungsnummer. Auf den Bildern D und E ist die Entwicklung der bestäubten Blüte bis hin zum Hülsenansatz (F) zu erkennen.

Nach vollständiger Abreife der Samen wurden die Hülsen einzeln geerntet und trocken bei Raumtemperatur gelagert. In den nachfolgenden Generationen wurde die Selbstbefruchtung der autogamen Pflanzen zugelassen.

## **2.2.2 Charakterisierung der Pflanzen auf Nukleinsäure Basis**

In den durchgeführten Arbeiten wurden verschiedene grundlegende molekularbiologische Arbeitsmethoden angewandt. Zum Teil wurden auch Kits verwendet, deren Durchführung nicht im Detail erläutert wird, sondern auf den Hersteller verwiesen wird. Die spezifischen Anwendungen und Variationen der Methoden werden im Detail erläutert.

Als Pflanzenmaterial für die molekularen Analysen wurden, soweit nicht gesondert beschrieben, pro Pflanze einige möglichst junge Blätter geerntet und sofort weiterverarbeitet. Da dies nicht immer möglich war, wurde das Pflanzenmaterial zum Teil auch bei  $-80\text{ °C}$  eingelagert.

### **2.2.2.1 Isolierung von DNA aus Pflanzen**

Zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen wurde das DNA-Isolationsverfahren nach DOYLE UND DOYLE (1990) angewendet. Das Volumen der eingesetzten Puffer richtete sich dabei nach der Menge an zu verarbeitendem Pflanzenmaterial. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein kleiner Ansatz (100-200 mg Blattmaterial) zum PCR Screening verarbeitet und im Anschluss daran ein großer Ansatz (2 g Blattmaterial) zur detaillierten molekularen Analyse. Im folgenden Schema werden beide Protokolle kurz erläutert.

1. Das Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert
2. Das entstandene Pulver wurde in 800  $\mu\text{l}$  (10 ml) CTAB-Puffer ( $65\text{ °C}$ , vorgewärmt) aufgenommen, kräftig geschüttelt (Vortex) und für 30 min bei  $65\text{ °C}$  inkubiert.
3. Zugabe des gleichen Volumens (800  $\mu\text{l}$  bzw. 10 ml) CI-Mix zur Extraktion. Die Proben wurden nun vorsichtig geschwenkt und für 10 min bei  $12.000 \times g$  ( $3500 \times g$ ) zentrifugiert.
4. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei Verunreinigungen durch Pflanzenmaterial wurde Schritt 3 wiederholt. Bei klarem

Überstand erfolgte durch Zugabe von 2/3 Volumenanteil (550 µl bzw. 6 ml) eiskaltem Isopropanol eine DNA Fällung.

5. Kurzes Schwenken der Reaktionsgefäße, danach Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm (3500 x g).
6. Verwerfen des Überstandes und waschen der Pellets in 200 µl bzw. 3 ml Waschpuffer.
7. Die Pellets wurden kurz getrocknet und danach, zur Entfernung von RNA, in 200 µl bzw. 3 ml TE Puffer mit RNase gelöst und für 30 min bei 37 °C inkubiert.
8. Nach dem RNA Verdau erfolgte eine erneute Präzipitation der DNA durch die Zugabe von 100 µl (1 ml) 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac und 750 µl (7,5 ml) 99,8 % Ethanol.
9. Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm (3500 x g), Verwerfen des Überstandes und Trocknen der Pellets.
10. Die pelletierte DNA wurde über Nacht bei 4 °C in 100 µl (1ml) TE Puffer oder Reinstwasser gelöst. Vor der weiteren Verarbeitung sollte die DNA für 10 min auf 65 °C erwärmt werden um eventuell verbliebene Lösungsmittelrückstände zu verdampfen und die DNA in Lösung zu bringen.
11. Zur Lagerung der DNA empfiehlt sich die Aufnahme der DNA in TE Puffer und die Lagerung bei -20 °C oder langfristig bei -80 °C.

**Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:**

CTAB Puffer

CTAB	3%
NaCl	1,4 M
β-Mercaptoethanol	0,2 %
EDTA	20 mM
Tris-HCl pH 8,0	100 mM
PVP (soluble)	0,5 %

CTAB wurde der Lösung nach dem Autoklavieren hinzugefügt

β-Mercaptoethanol wurde direkt vor der Verwendung hinzugefügt

Chloroform-Isoamyl-Mix (CI-Mix)

Chloroform	23 ml
Isoamylalkohol	1 ml

Waschpuffer

Ethanol absolut	76 % (v/v)
Ammoniumacetat	10 mM

TE-Puffer (+RNase)

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA (RNase)	1 mM 50 µg/ml

In einigen Fällen wurde auch ein Kit zur DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial verwendet, hierbei handelte es sich um das Invisorb<sup>®</sup> Spin Plant Kit von Invitek. Das Kit führte zu guten Ergebnissen, es war im Vergleich zur CTAB Methode jedoch wesentlich teurer.

### 2.2.2.2 Isolierung von RNA aus Pflanzengewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den Erbsenpflanzen erfolgte immer aus den allerjüngsten, noch nicht vollständig entfalteten Blättern der Erbse. Es wurden etwa 100 mg Pflanzenmaterial eingesetzt. Die RNA Isolierung erfolgte mit den unten aufgeführten Kits und Reagenzien verschiedener Firmen.

RNeasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit	Qiagen
Nucleo Spin <sup>®</sup> RNA Plant	Macherey-Nagel
Concert <sup>™</sup> Plant RNA Reagent	Invitrogen

Mit allen Kits war eine erfolgreiche Isolierung von Gesamt RNA möglich. Während mit den Kits von Macherey-Nagel und Qiagen RNA Konzentrationen von 1 µg/µl erreicht wurden, konnte mit dem RNA Plant Reagent<sup>®</sup> RNA Mengen im Bereich von 5-10 µg/µl isoliert werden. Der Kit von Invitrogen war also deutlich effizienter, als die anderen beiden Kits.

Die photometrische Bestimmung der RNA Konzentration erfolgte direkt im Anschluss an die Isolierung.

Die RNA Qualität wurde teilweise im denaturierenden RNA-Agarosegel überprüft. Die Reverse Transkription wurde idealerweise ebenfalls direkt im Anschluss an Isolation und Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die RNA Lösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Reverse Transkription

Mit Hilfe von Reverser Transkriptase wurde aus der mRNA eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Da die cDNA später für eine PCR eingesetzt werden sollte, reichte es in diesem Fall aus die Gesamt-RNA einzusetzen.

1. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA mit 1 µl 100 pmol Oligo-dT-Primer (18 Thymidine) versetzt (eventuell Zugabe von RNase freiem Wasser, Gesamtvolumen 13 µl) und 10 min auf 70 °C erhitzt um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen.
2. Dann wurde das Gemisch auf Raumtemperatur gebracht um die Hybridisierung der Primer zu ermöglichen.
3. Zugabe von 4 µl des Puffers für die Reverse Transkriptase (5 x Puffer), 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl RNase Inhibitor (MBI Fermentas) und Erwärmung der Mischung auf 37 °C.
4. Durch die Zugabe von 1 µl MMLV-RT (MBI Fermentas), einer RNA abhängiger DNA-Polymerase aus dem *Moloney murine leukemia virus* wurde die Reverse Transkription gestartet. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Die cDNA war relativ stabil und konnte kurzfristig bei 4 °C gelagert werden, für langfristige Lagerung sollte sie jedoch ebenfalls bei -20 °C oder -80 °C gelagert werden.

#### 2.2.2.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte, soweit die DNA nicht unter Verwendung des Detergens CTAB isoliert wurde, im Spektralphotometer durch Messung der Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm. Es besteht folgende Korrelation zwischen optischer Dichte (OD) und der DNA-Konzentration bei einer Schichtstärke von 1 cm:

$$\text{dsDNA-Konzentration} = (\text{OD}_{260} \times \text{Vf} \times 50) \mu\text{g/ml}$$

Vf = Verdünnungsfaktor

Die Reinheit der DNA wurde durch Ermittlung des Koeffizienten aus der OD bei 260 nm / 280 nm überprüft. Für reine DNA liegt dieser Koeffizient bei  $> 1,7$ .

#### 2.2.2.5 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte im Spektralphotometer durch die Messung der Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm in TE-Puffer (pH 8,0). Dabei wurde mit folgender Korrelation zwischen der optischen Dichte (OD) und der RNA-Konzentration bei einer Schichtstärke von 1 cm kalkuliert:

$$\text{RNA Konzentration} = (\text{OD}_{260} \times \text{Vf} \times 40) \mu\text{g/ml}$$

Die Reinheit der RNA wurde durch Ermittlung des Koeffizienten aus 260 nm / 280 nm überprüft. Für reine RNA liegt dieser Koeffizient bei konstantem pH zwischen 1,9 und 2,1.

#### **2.2.2.6 Fluorimetrische Bestimmung**

Das für die DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial eingesetzte Detergens CTAB (2.2.2.1) hat sein Absorptionsmaximum genau wie DNA bei 260 nm (DOYLE UND DOYLE 1990). Da es nach der Isolierung von DNA in unterschiedlich starken Spuren in der Probe zurückbleibt, würde es die im Spektralphotometer gemessenen Werte erheblich verfälschen. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der mittels CTAB Protokoll isolierten DNA im Fluorimeter bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem *Flourescent DNA Quantitation Kit* der Firma BioRad. Die Methode beruht auf der spezifischen Bindung des Farbstoffes Hoechst 33258 (Bisbenzimid) an AT reiche Regionen und einer damit verbundenen Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### **2.2.2.7 Abschätzung der DNA Menge im Agarosegel**

Speziell zur Vorbereitung von Southern Blot Gelen erwies es sich als sinnvoll, ein bestimmtes Volumen der isolierten DNA (30 µl) mit einem beliebigen Restriktionsenzym zu fragmentieren und die verdaute DNA auf ein Agarosegel aufzutragen und elektrophoretisch aufzutrennen. Diese Methode erwies sich als die zuverlässigste Methode im Hinblick auf gleichmäßig beladene Southerngele.

Parallel wurde Heringssperma DNA aufgetragen, um eine Abschätzung der DNA-Menge im Gel zu ermöglichen.

#### **2.2.2.8 DNA Agarosegelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte durch eine Horizontal-Elektrophorese in entsprechenden Anlagen verschiedener Größe. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele von 0,8 % (Southern Gele) bis zu 2 % (PCR Produkte ~ 200 bp) eingesetzt. Als Gel- sowie Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TAE Puffer gelöst, nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und in einen entsprechenden Gelträger mit Probenaschenkamm gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstantem Strom zwischen 1 und 10 Volt/cm Elektrodenabstand.



DNA Proben wurden für den Gelauftrag mit 6 x Probenpuffer versetzt. PCR Proben, die mit der BioTherm Red (Natutec) durchgeführt wurden, konnten ohne Zusatz des Puffers aufgetragen werden. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen wurden parallel zu den zu untersuchenden Proben DNA-Längenstandards aufgetragen.

**Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:**

<u>TAE-Puffer (50x)</u>	<u>6 x Probenpuffer (MBI Fermentas)</u>
40 mM Tris/HCl	50 mM EDTA
20 mM Eisessig	25 % (w/v) Ficoll 40
1 mM EDTA	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
pH 7,5	0,25 % (w/v) Xylene-Cyanol FF

### 2.2.2.9 RNA Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA-Proben erfolgte durch eine Horizontal-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen im 1,2 % igen Agarosegel. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt und sämtliche Gerätschaften wurden vor der Elektrophorese mit DEPC-Wasser gespült. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet. Die Gele sowie der Laufpuffer wurden zu 3 % mit Formaldehyd (37 %) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei konstantem Strom mit 4-6 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Die RNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit jeweils 10 µl des RNA Probenpuffers versetzt, für 5 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis gekühlt.

Die gesamte Elektrophorese wurde bei 4 °C durchgeführt, um RNA Abbau zu vermeiden. Um die Verwendung von Glycerin zu vermeiden, wurde der Laufpuffer nur bis zur Gelkante aufgegossen, so dass die Taschen des Gels leer blieben. Dadurch war es möglich, die Proben ohne Glycerin aufzutragen. Die Elektrophorese wurde gestartet und lief bis die Proben in das Gel gewandert waren. War dies der Fall, wurde die Kammer vollständig mit Laufpuffer aufgegossen und die Elektrophorese fortgesetzt.

**Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:**

<u>10 x MOPS-Puffer</u>	<u>DEPC-Wasser</u>
200 mM MOPS	0,01 % DEPC in Wasser (schütteln)
80 mM Na-Acetat	bei RT ÜN inkubieren, dabei rühren
10 mM EDTA	dann mehrmals autoklavieren
pH 7,0	

RNA Proben Puffer 150 µl

Formaldehyd (37%)	33 µl
Formamid	99 µl
10 x MOPS	16,5 µl
Ethidiumbromid	1,5 µl

Der Probenpuffer muss immer frisch angesetzt werden !

**2.2.2.10 PCR zur Charakterisierung der transgenen Pflanzen**

Zum Nachweis der rekombianten antifungalen Gene wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Standardmäßig wurde jeweils 1 µl isolierter DNA (entspricht ca. 100 ng) in 25 µl PCR-Ansätzen verwendet. Je nach Qualität der DNA-Isolate, wurde teilweise auch mehr Template eingesetzt. Die Menge der eingesetzten Substanzen ist der Tabelle 2.3 zu entnehmen.

Die PCR Ansätze zum Nachweis transgener Sequenzen wurden nach einem Standardprotokoll (Tab.2.4) durchgeführt, das sich lediglich in den errechneten Annealingtemperaturen für die verschiedenen Primerpaare unterschied. Die entsprechenden Kombinationen werden in Tabelle 2.5 aufgeführt.

**Tab.2.3 Standard PCR Ansatz 25 µl mit Bio Therm Red (Natutec) zum Nachweis transgener Sequenzen**

Konzentration der Komponenten	Volumen pro 25 µl Ansatz
H <sub>2</sub> O reinst	18,3 µl
Puffer 10 x	2,5 µl
dNTPs 5 mM (pro Nucleotid)	1 µl
10 pM forward Primer	1 µl
10 pM reverse Primer	1 µl
BioTherm Red (10 U/µl)	0,2 µl

**Tab. 2.4 PCR Standardbedingungen zum Nachweis transgener Sequenzen**

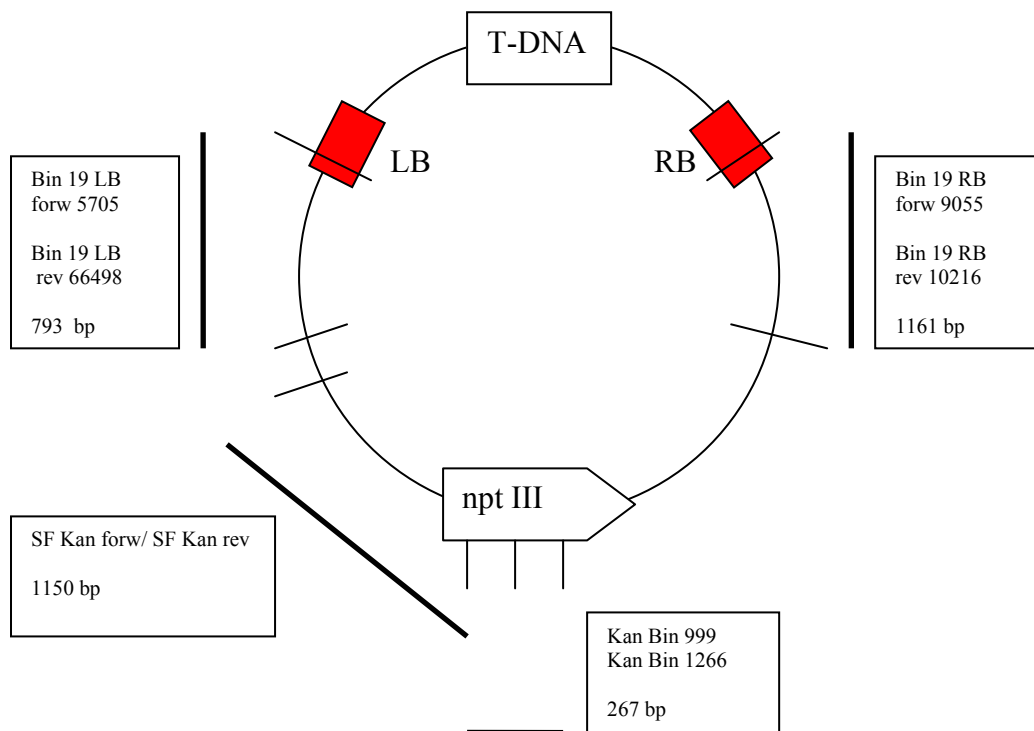
PCR Schritte	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	60	1
Denaturierung	94	45	30 x
Annealing	spezifisch für GOI	45	
Elongation	72	45	
Finale Elongation	72	300	1
Kühlung nach Abschluss der PCR	4	∞	

**Tab. 2.5 Annealingtemperaturen verwendeter Primerpaare**

Primer	Annealingtemperatur
RT vst1 sense / RT vst1 antisense	60 °C
Vst Sonde 1 forw / Vst Sonde 1 rev	58 °C
Vst Sonde 2 forw / Vst Sonde 2 rev	58 °C
kPGIP 31 / kPGIP 686	56 °C
kPGIP 691 / kPGIP 929	58 °C
kPGIP 708 / kPGIP 1150	58 °C
pSCP1 108 / pSCP1 733	53 °C
r PGIP 1 / r PGIP 366	58 °C
r PGIP 421 / r PGIP 958	58 °C
bar sense / bar antisense	60 °C
Kan/bin 999 / Kan/bin 1266	60 °C
SF Kan forw / SF Kan rev	60 °C
Bin 19 LB forw 5705 / Bin 19 LB rev 6498	53 °C
Bin 19 RB forw 9055 / Bin 19 RB rev 10216	53 °C
HMG int forw 570 / HMG int rev 570	56 °C

### 2.2.2.11 PCR zum Nachweis von Backbone Sequenzen

Wie in der Einleitung bereits erläutert, kann die Integration von Vektorsequenzen in das Pflanzengenom zu einer Stilllegung des GOIs führen. Aus diesem Grund wurden alle Klone auf Backbone Sequenzen überprüft. Das geschah mittels PCR unter Verwendung der in Abb. 2.5 gezeigten Primer.



**Abbildung 2.5: PCR Produkte und Primer, die zum Nachweis von Backbone Sequenzen verwendet**

**wurden.** Es wurden vier verschiedene Primerpaare verwendet um zu analysieren ob es sich bei der Backbone Integration lediglich um eine kurze, an die linke oder rechte Border gekoppelte Sequenz handelt, oder ob die vollständige Backbone Sequenz (Backbone junction) integriert wurde, was zur Integration eines 'Inverted Repeats' führen würde.

### 2.2.2.12 Segregationsanalyse

Das Ziel der Segregationsanalyse war es, in Hinblick auf das GOI homozygote Linien zu etablieren. Für weitere Untersuchungen wie Expressionsanalysen und Resistenztests, aber auch für die Kreuzungen war es von größter Wichtigkeit, dass die Nachkommenschaften nicht mehr segregierten, also in Bezug auf das Transgen homozygot waren.

Die Daten für die Segregationsanalyse wurden mittels PCR erhoben. Für die Berechnung des Homozygotiegrades, wurden die Ergebnisse der für die jeweiligen GOIs spezifischen PCRs herangezogen um die Weitergabe der rekombinanten Gene an die Nachkommenschaften zu verfolgen.

Die Wahrscheinlichkeit der Homozygotie einer Mutterpflanze wurde an der Anzahl der transgenen Nachkommen (K) gemessen. Diese Berechnung wurde nur für Mutterpflanzen

durchgeführt, in deren Nachkommenschaften keine Segregation mehr beobachtet werden konnte.

Die Kalkulation erfolgte nach folgender Formel, die der Dissertation von KIESECKER (2000) entnommen wurde:

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

K = Zahl der transgenen Nachkommen

Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %

### 2.2.2.13 Southern-Blot-Analyse

Zur Ermittlung integrierter T-DNA Kopien und zur Identifizierung unterschiedlicher transgener Linien aufgrund der Integrationsmuster wurde die Methode des Southern Blot (SOUTHERN 1975) angewendet.

#### Restriktionsverdau der genomischen DNA und anschließende Fällung der DNA

30 µg der genomischen Pflanzen DNA wurden mit 4 µl eines Restriktionsenzym (10 Units/µl) und Zugabe des entsprechenden Puffers über Nacht bei 37 °C fragmentiert. Zur Gewährleistung eines vollständigen Restriktionsverdaus wurden am nächsten Morgen erneut 20 Units des Enzyms hinzugefügt und weitere vier Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach einer Gesamtinkubationszeit von etwa 20 Stunden bei 37 °C wurde die DNA durch die Zugabe von 100 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>-acetat und 750 µl Ethanol<sub>absolut</sub> gefällt.

Nach der Pelletierung der DNA durch 10 minütige Zentrifugation bei 10.000 x g werden die Pellets mit 50 µl TE angelöst und mit 100 µl Ethanol<sub>absolut</sub> erneut präzipitiert. Nach einer erneuten Zentrifugation werden die Pellets getrocknet und über Nacht bei 4 °C in 40 µl TE Puffer gelöst.

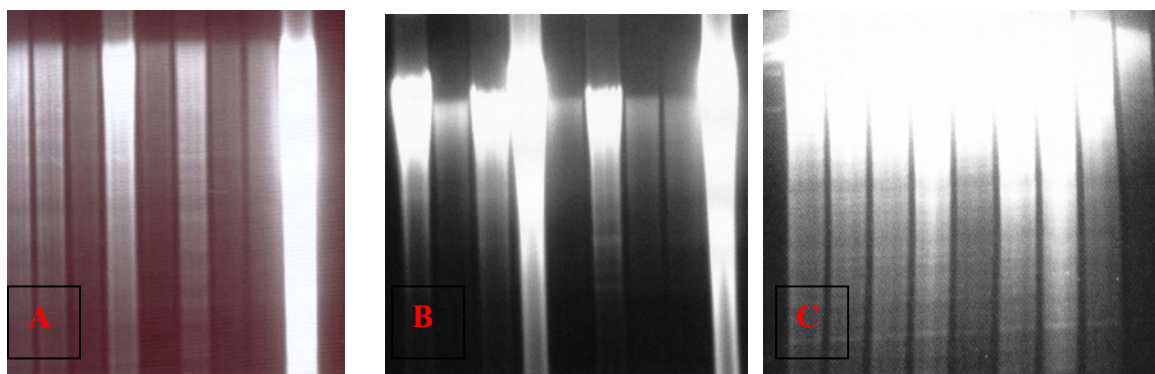
#### Southern Gel

Nach dem Verdau der genomischen DNA und der Fällung, wurde die DNA durch Erwärmung für 10 min bei 65 °C zur weiteren Analyse in Lösung gebracht. Nach Zugabe von je 8 µl 6 x

Probenpuffer (2.2.2.8) wurden die Proben auf ein 0,8 %iges Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2.8). Als Größenstandard wurden 10 µl des DIG Markers II von Roche mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel geladen.

Um eine gleichmäßige und vollständige Separation der relativ großen DNA-Fragmente durch die Elektrophorese zu erreichen, wurde sie für ca. 20 Stunden bei 30 Volt durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde die Separation der DNA-Fragmente im Gel kontrolliert. Zu diesem Zweck wurde eine Photodokumentation des Gels durchgeführt. Das Photo wurde jeweils zur Interpretation des eigentlichen Southern Ergebnisses herangezogen.



**Abb. 2.6 A bis C: Southerngele; A: Gleichmäßiger Verdau und Gellauf, aber sehr unterschiedliche DNA Mengen; B: Ungleichmäßiger Verdau und Gellauf und heterogene DNA Beladung; C: Gleichmäßiger Verdau, Gellauf und Beladung.**

Die Abbildung 2.6 A zeigt ein Southerngel, bei dem die einzelnen Proben sehr unterschiedliche DNA-Gehalte aufweisen. Der DNA-Verdau und der Gellauf sind gleichmäßig.

Abb. 2.6 B zeigt ein Gel, bei dem die DNA-Proben unvollständig verdaut wurden, und die Auftrennung zudem nicht gleichmäßig erfolgte. Ein solches Gel wurde nicht weiter verwendet, da die Interpretation eines Southern Ergebnisses auf Grundlage eines solchen Gels sehr schwierig ist. Auf dem Bild 2.6 C ist eine sehr gleichmäßiges Southerngel zu sehen. Der DNA Verdau war vollständig und die elektrophoretische Auftrennung der Fragment verlief gleichmäßig. In den Bahnen sind gleiche DNA-Mengen enthalten. Die Auftrennung kann hier besonders gut an der gleichen Größe einzelner polymorpher Banden erkannt werden, die durch den Verdau repetitiver Sequenzen zustande kommen.

Southern Transfer

Zur Vorbereitung der DNA für den Transfer wurde das Gel für 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt und die DNA damit teilweise depuriniert. Danach wurde die DNA durch 30-minütige (2 x 15 min) Inkubation des Gels in Denaturierungspuffer denaturiert, d.h. die Doppelstränge wurden aufgetrennt. Durch eine abschließende Inkubation des Gels in Neutralisierungspuffer (2 x 15 min) wurde die DNA neutralisiert.

Nun erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nitrocellulosemembran per Kapillarblot:

- ⇒ über eine mit 20 x SSC gefüllte Schale wurde eine Glasscheibe in Breite des Gels gelegt
- ⇒ eine Schicht getränkten Filterpapiers wurde so auf der Glasscheibe platziert, dass die Enden bis in die mit 20 x SSC gefüllte Wanne reichten und so eine Pufferbrücke bildeten
- ⇒ darauf folgten 3 Schichten getränkten Filterpapiers, die luftblasenfrei aufgelegt wurden
- ⇒ auf das Filterpapier wurde das Southerngel gelegt (luftblasenfrei)
- ⇒ die auf die Größe des Gels zugeschnittene Nitrocellulosemembran (positiv geladen) wurde zuvor in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  und 20 x SSC equilibriert und absolut luftblasenfrei auf dem Agarosegel platziert
- ⇒ auf die Membran wurden erneut 3 Lagen getränktes Filterpapier gelegt und darauf ein Stapel Papierhandtücher
- ⇒ den Abschluss bildete eine Glasplatte und darauf ein Gewicht von etwa 1 kg
- ⇒ nach etwa 14 Stunden war der Transfer der DNA abgeschlossen

**Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:**

<u>0,25 M HCl</u>		<u>Denaturierungspuffer</u>	
HCL (1M)	250 ml	NaOH	0,5 M
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	750 ml	NaCl	1,5 M
<u>Neutralisierungspuffer</u>		<u>20 x SSC (pH 7,5)</u>	
Tris HCl	0,5 M	NaCl	3 M
NaCl	3 M	Na-Citrat	0,3 M

Fixierung der DNA auf der Membran

Nach Abbau des Kapillar Blots wurden sowohl das Gel als auch die Membran auf dem UV Tisch kontrolliert. Das Gel sollte dabei nur noch Spuren von DNA enthalten. Wenn der Transfer der DNA erfolgreich verlaufen war, wurde die Membran zwischen zwei Filterpapieren in Alufolie eingewickelt und im Trockenschrank für 20 min bei 120 °C

inkubiert. Damit wurde die DNA auf der Membran fixiert. In dieser Form wurde die Membran und die darauf befindliche DNA bei Raumtemperatur trocken gelagert.

### Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde im Wesentlichen durchgeführt, wie es im *DIG Application Manual for Filter Hybridisation* der Firma Roche beschrieben wurde.

Die Membran wurde für 2 h zur Prähybridisierung im Glas-Hybridisierungsröhrchen mit ca. 30 ml DIG-Easy-Hybridisierungslösung bei 42 °C im Hybridisierungsofen mit Rotordrehung inkubiert. Die Hybridisierungslösung mit der markierten DNA (2.2.2.14) wurde für 10 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis schockgekühlt und danach auf die vorbereitete Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C über Nacht im Hybridisierungsofen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran folgendermaßen gewaschen:

⇒ 2 x 5 min mit 2 x SSC + 0,1 % SDS bei 42 °C

⇒ 2 x 15 min mit 0,5 x SSC + 0,1 % SDS bei 65 °C

⇒ 2 x 15 min mit 0,1 x SSC + 0,1 % SDS bei 65 °C

### Antikörperbindung

Nach Abschluss der Waschschrte wurde die Membran in Maleinsäurepuffer equilibriert und anschließend für mindestens eine Stunde in 1 % Blocking Lösung bei Raumtemperatur geschwenkt um in den nachfolgenden Schritten unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach diesem Schritt wurde die Membran für die Antikörperbindung an das DIG Molekül für 30 min mit Anti-DIG-AP-Lösung (Roche Diagnostics) in 1 % Blocking Lösung inkubiert (1:20000 Verdünnung des Anti-DIG-AP-Konjugates in Blocking Reagenz).

Die Membran wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mit Waschpuffer gespült und 2 x 15 min mit Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch angelagerte Antikörper zu entfernen.

### Detektion der Chemilumineszenz

Es folgte eine Equilibrierung der Membran in Detektionspuffer für 5 min. Es wurde eine Lösung aus 500 µl DEA und 5 µl CDP $star$  (Roche Diagnostics) hergestellt und auf eine Plastikfolie aufgetropft. Die Membran wurde nun mit der DNA Seite auf die Tropfen gelegt und mit einer zweiten Folie bedeckt. Die Lösung sollte luftblasenfrei zwischen Folie und Membran verteilt sein. Nach etwa 2 min wurde die überschüssige Lösung mit Papiertüchern seitlich zwischen den Folien herausgedrückt. Es wurde darauf geachtet, dass keine



Rückstände der Lösung auf der Folie verblieben, dies hätte zu Flecken auf dem Film geführt. In der Dunkelkammer wurde nun ein Biomax-Luminescence-Film (Kodak) auf die DNA Seite der Membran aufgelegt. Die Expositionszeit betrug je nach Stärke der Signale 20 bis 60 min. Danach wurde der Film entwickelt und fixiert.

**Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:**

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure 0,1 M  
NaCl 0,15 M  
pH 7,5

Blocking-Lösung

1 % Blocking-Lösung (Roche Diagnostics)  
angesetzt in Maleinsäurepuffer

Waschpuffer

Maleinsäurepuffer  
0,3 % (v/v) Tween 20

Detektionspuffer

Tris-Base 0,1 M  
NaCl 0,1 M  
pH 9,5

DEA Lösung

DEA 100 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1 mM

Stripping Puffer

NaOH 0,2 M  
SDS 0,1%

Entfernung der Sonden von den Membranen

Gerade bei der Charakterisierung der Hybriden war es nötig eine Membran mit mehreren Sonden zu hybridisieren. Zu diesem Zweck wurden die bereits detektierten Sonden mit folgenden Waschschrritten entfernt, was auch als 'Stripping' bezeichnet wird:

⇒ 2 x Waschen der Membran mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub>

⇒ 2 x 10 min Waschen mit Stripping Puffer bei 37 °C

⇒ 1 x Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub>

⇒ direkt im Anschluss Prehybridisierung mit DIG Easy Hyb und anschließende Hybridisierung mit einer Sonde  
oder

⇒ Lagerung der Membran in 2 x SSC bei 4°C bis zur weiteren Verwendung

**2.2.2.14 Herstellung DIG-markierter Sonden**

Die Herstellung DIG-markierter Sonden für das *vstI*-Gen, das *AdPGIP*-Gen und das *RiPGIP*-Gen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics) mittels PCR mit dem PCR DIG Labelling Mix.

In der Tabelle 2.6 wird der PCR Ansatz zur Herstellung DIG-markierter Sonden aufgelistet. Parallel zur Sonde wird eine Kontroll PCR durchgeführt.

**Tab. 2. 6 PCR Ansatz zur Herstellung DIG-markierter Sonden**

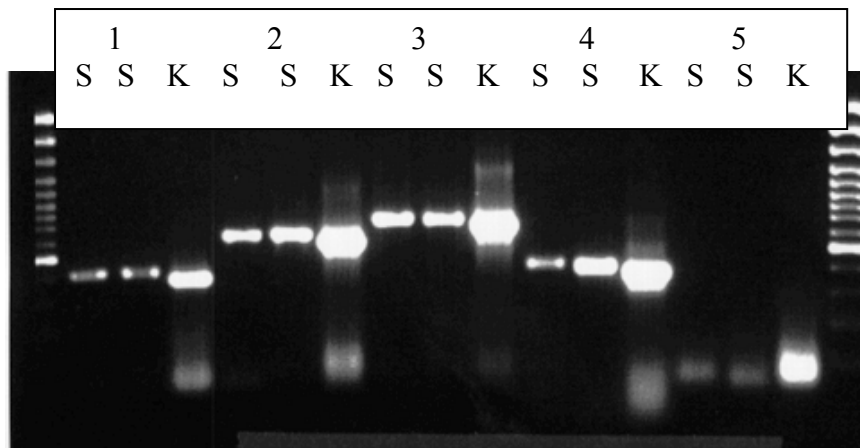
Konzentration der Komponenten	Sondenherstellung	Kontrolle
H <sub>2</sub> O reinst	36,6 µl	18,3 µl
Puffer 10 x	5 µl	2,5 µl
dNTPs 5 mM (pro Nucleotid)	0,25 µl	1 µl
10 pM forward Primer	2 µl	1 µl
10 pM reverse Primer	2 µl	1 µl
Plasmid	1 µl	1 µl
PCR DIG labelling Mix	2 µl	-
BioTherm Red	0,4 µl	0,2 µl

Folgendes PCR Programm wurde zur Herstellung der DIG-markierten Sonden verwendet (Tab.2.7):

**Tab. 2. 7 PCR-Bedingungen für die Herstellung einer DIG-markierten Sonde**

PCR Schritte	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	60	1
Denaturierung	94	60	40 x
Annealing	58	60	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	300	1
Kühlung nach Abschluss der PCR	4	∞	

Um den Erfolg der PCR zu kontrollieren, wurden jeweils 5 µl der PCR Ansätze für die Sonde und 20 µl der Kontroll PCR auf ein 1,5 % iges Agarosegel aufgetragen. Die Sonden sind im Vergleich zur Kontrolle durch die DIG-Markierung größer und lassen sich daher im Gel von der Kontrolle differenzieren (Abb.2.7)



**Abb. 2.7 Agarosegel DIG-markierter Sonden.**

Mittels PCR Labelling Mix (Roche Diagnostics) wurden PCR Produkte mit einer DIG Markierung versehen und als Sonden zur Hybridisierung verwendet. Zur Überprüfung der Markierung und der PCR wurde ein Teil der Sonde neben dem nicht markierten Kontrollprodukt auf einem Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. S = Sonde; K = Kontrolle

Die Abbildung 2.7 zeigt ein 1,5 % iges Agarosegel, in dem verschiedene Sonden (S; Doppelansatz) neben ihrer Kontrolle (K) aufgetragen wurden. Die PCR für die ersten vier verschiedenen Sonden war erfolgreich, während das PCR Produkt der fünften Sonde sehr schwach ist.

Nach der Kontrolle der PCR Produkte im Agarosegel wurden die restlichen PCR Ansätze in etwa 40 ml DIG Easy Hybridisierungslösung (Roche Diagnostics) überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Verstärkung der Signale wurden bis zu vier verschiedene Sonden für ein Gen generiert und gemeinsam in einer Hybridisierungslösung verwendet.

### **2.2.2.15 Transkriptionsanalyse mittels RT-PCR**

Die Transkription der Transgene wurde unter anderem mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Dazu wurde aus der isolierten Gesamt RNA (2.2.2.2) eine komplementäre DNA synthetisiert (2.2.2.3) und diese als Template in der PCR mit entsprechenden spezifischen Primern eingesetzt.

Die PCR mit der cDNA als Template erfolgte analog zur PCR mit isolierter DNA (2.2.2.7).

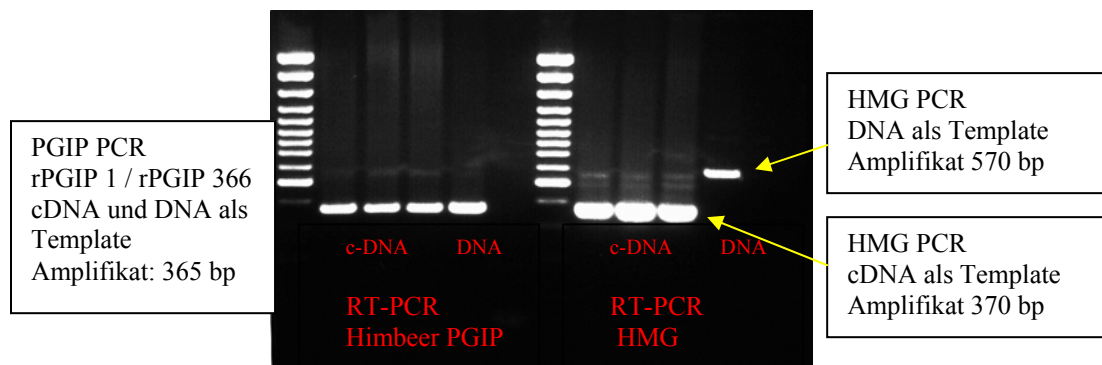
#### Einfluss von DNA Kontaminationen auf die RT-PCR

Bei der RT-PCR ergab sich durch das Fehlen von Introns in den GOIs die Problematik der DNA Konatminationen. Mit Ausnahme des *vstI*-Gens wird keines der antifungalen Gene durch ein Intron unterbrochen. Wenn bei der RNA-Isolierung zuviel DNA in der RNA

Lösung verblieb, führte das in jedem Fall zur Amplifikation der entsprechenden Gene, auch wenn keine Transkription stattfinden würde. Ob das entstandene Amplifikat auf die DNA Kontamination oder eine cDNA zurückgeht, konnte zunächst nicht unterschieden werden.

Um dieses Problem zu lösen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Ansätze durchgeführt:

1. Bei der finalen RT-PCR wurde sowohl die cDNA als auch die zugrundeliegende RNA als Template eingesetzt. Wenn es durch Zugabe von RNA als Template zu einer Amplifikation eines Produktes der entsprechenden Größe kam, konnte die entsprechende cDNA Probe nicht verwertet werden.
2. Es wurde ein Primerpaar für ein Haushaltsgen der Erbse (High mobility gene) generiert. Dieses Gen wird durch ein Intron unterbrochen. Die Position der Primer die generiert wurden, wurde so gewählt, dass sie das Intron flankieren. Wenn diese Primer in der RT PCR eingesetzt wurden, entstanden bei einer DNA-Kontamination zwei PCR Produkte mit einem Größenunterschied von 200 bp, der dem Betrag des Introns entspricht. Dies PCR wurde parallel zur eigentlichen GOI PCR durchgeführt um die Bewertung der RT-PCR Ergebnisse zu ermöglichen (Abb.2.8).



**Abb. 2.8 Agarosegel der RT PCR zum Nachweis von DNA Kontaminationen in der RNA.** Auf dem linken Abschnitt des Bildes wurde das Ergebnis der RT-PCR mit Primern für das PGIP Gen aufgetragen. Bei den ersten drei Proben wurde cDNA als Template verwendet, bei der vierten Probe genomische DNA. Die Größe des PCR Produktes beträgt unabhängig von der Art des Templates 365 bp, es kann anhand der Größe nicht unterschieden werden, ob das Amplifikat aufgrund von DNA oder cDNA entstanden ist. Im rechten Abschnitt des Bildes wurde das Ergebnis der HMG PCR aufgetragen. Als Template wurden dieselben Proben wie bei der PGIP PCR verwendet. Da die Primer in diesem Fall das Intron flankieren, kann bei dieser PCR aufgrund der Größe des Produktes unterschieden werden, ob das Amplifikat durch DNA (570 bp) oder cDNA (370 bp) gebildet wurde. Wie an den dünnen Banden im Bereich von 570 bp zu erkennen ist, sind zwar minimale DNA Kontaminationen enthalten, der Großteil des PCR Produktes wird aber auf Grundlage der cDNA synthetisiert. Man kann bei den vorliegenden Proben also von einer Transkription des PGIP Gens ausgehen.

3. Die beste Lösung zur Vermeidung von falsch positiven Transkriptionsergebnissen aufgrund von DNA Kontaminationen ist die Durchführung eines Northern Blot, der jedoch nur in Einzelfällen durchgeführt wurde. Da die Durchführung, die im nächsten Kapitel beschrieben wird, sehr aufwendig ist.

### 2.2.2.16 Northern-Blot-Analyse

Neben der RT-PCR wurde zum Nachweis der Transkription auch die Methode des Northern Blot durchgeführt. Die Methodik ist der beim Southern Blot sehr ähnlich. Alle verwendeten Lösungen wurden jedoch mit 0,1 % DEPC Wasser angesetzt.

#### Northern Gel

Es wurde zunächst eine denaturierende Agarosegelelektrophorese der RNA durchgeführt (2.2.2.9). Jeweils 15 µg und 30 µg der isolierten Gesamt-RNA wurden auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach Ablauf der Gelelektrophorese photographiert.

#### Northern Transfer

Da es sich bei dem Agarosegel bereits um ein denaturierendes Gel handelt, braucht es für den Transfer der RNA auf eine Membran nicht weiter behandelt zu werden. Das Gel wird lediglich in 20 x SSC equilibriert. Dann wird ein Kapillarblot über Nacht bei 4°C durchgeführt (Beschreibung unter 2.2.2.10)

#### Fixierung der RNA auf der Membran und Dokumentation des Transfers

Nach dem Transfer wird die RNA durch 20 minütige Inkubation bei 120 °C auf der Membran fixiert. Der vollständige Transfer der RNA wurde durch ein Photo unter UV Licht dokumentiert werden. Eine andere Methode zum Nachweis der RNA auf der Membran war die Färbung mit Methylblau und der anschließenden Entfärbung des Hintergrundes mit DEPC Wasser. Vor der weiteren Behandlung musste die Membran nach dieser Prozedur entfärbt werden.

**Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:**

<u>Methylenblau Färbung</u>		<u>Entfärbungs Lösung</u>	
Methylenblau	0,03 %	SSC	1 x
in Na-Acetat	3 M	SDS	1 %

### Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde im wesentlichen durchgeführt, wie es im *DIG Application Manual for Filter Hybridisation* der Firma Roche beschrieben wurde.

Die Membran wurde für 2 h zur Prähybridisierung im Glas-Hybridisierungsröhrchen mit ca. 30 ml DIG-Easy-Hybridisierungslösung bei 50 °C im Hybridisierungssofen mit Rotordrehung inkubiert. Die Hybridisierungslösung mit der markierten DNA (2.2.2.14) wurde für 10 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis schockgekühlt und danach auf die vorbereitete Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 50 °C über Nacht im Hybridisierungssofen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran folgendermaßen gewaschen:

⇒ 2 x 1 min mit 2 x SSC + 0,1 % SDS bei Raumtemperatur

⇒ 2 x 15 min mit 0,5 x SSC + 0,1 % SDS bei 68 °C

⇒ 2 x 15 min mit 0,1 x SSC + 0,1 % SDS bei 68 °C

Die restlichen Schritte entsprachen der Durchführung des Southern Blot (2.2.2.13)

Das ‘Stripping’ der Membran wurde jedoch bei 100 °C durchgeführt, da die DNA/RNA Bindung wesentlich stärker ist als die DNA/DNA Bindung.

## **2.2.3 Funktionale Charakterisierung der transgenen Pflanzen**

### **2.2.3.1 Extraktion des Pflanzenmaterials zur Durchführung des PGIP-Assays**

Da die verwendeten pgip-Gene durch einen doppelten 35S Promotor gesteuert wurden, war eine Induktion der transgenen Pflanzen vor der Extraktion nicht nötig.

Den Gewächshauspflanzen wurden 1 bis 2 Blätter (~ 200 mg) entnommen und durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Nach Zugabe von 1000 µl Extraktionspuffer wurden die Proben kräftig geschüttelt (Vortex) und für 2 h bei 4 °C auf einem Schüttler extrahiert. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min, 10.000 x g) wurden die groben Pflanzenbestandteile sedimentiert und der Extrakt in neue Reaktionsgefäße überführt.

Der Extrakt wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert oder sofort weiter analysiert.

**Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:**

<u>Extraktionspuffer</u>		<u>Na-Acetat-Puffer</u>	
Na-Acetat	25 mM	Na-Acetat	100 mM
NaCl	1 M	pH	4,6
pH	5,0		

### 2.2.3.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach Bradford

Der Gesamtproteingehalt der Pflanzenextrakte wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (BRADFORD 1976). Im Mittelpunkt dieser Methode stehen blaue Säurefarbstoffe (Coomassie-Brilliantblau). In Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie Brilliantblaus G 250 von 465 zu 595 nm. Der Grund dafür ist eine Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Bradford-Assay ist im Vergleich zum Lowry- oder BCA-Assay wesentlich sensitiver. Der Nachteil des Bradford-Assays besteht allerdings darin, dass gleiche Mengen an verschiedenen Standardproteinen zu unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten führen können (LOTTSPREICH UND ZORBAS 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde generell Rinderserumalbumin (BSA, MBI Fermentas) als Standard verwendet, so dass dieser Faktor für die hier vorgestellten Messungen der Pflanzenextrakte ausgeschlossen werden kann.

Zur Durchführung wurde eine 15 % ige (v/v) Bradford Gebrauchslösung aus der Stocklösung hergestellt und auf 4,9 ml Aliquots verteilt. Es wurde eine Eichreihe mit aufsteigender Konzentration (0; 10; 20; 50; 75; 100; 150 µg/ml) BSA angelegt. Jeweils 100 µl der Standards wurden zu den 4,9 ml Aliquots Bradford Lösung addiert und geschüttelt.

Die Pflanzenextrakte wurde mit Na-Acetat-Puffer 1/100 verdünnt und je 100 µl der Verdünnung mit der Bradford Lösung vermischt. Nach ca. 10 Minuten Inkubationszeit konnte die Absorption der Proben bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen werden.

Anhand der Eichkurve wurde der Proteingehalt der Proben aufgrund der Absorption ermittelt.

**Die verwendeten Lösung setzten sich wie folgt zusammen:**

#### Bradford Stock Lösung

Ethanol absolut	50 ml
Coomassie Brilliantblau G 250	100 mg
o-Phosphorsäure	100 ml

### 2.2.3.3 Agarose Diffusionstest zum Nachweis der PGIP Aktivität

Der Agarose Diffusionstest zur Messung der Polygalakturonase Aktivität wurde 1988 von TAYLOR UND SECOR veröffentlicht. Die Methode wurde an der Universität „La Sapienza“ in Rom, in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Guilia DeLorenzo etabliert und optimiert. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, die Methode im Labor von Frau DeLorenzo zu erlernen und am LGM Hannover zu etablieren.

### Herstellung der Platten

Für den Assay wurde ein Medium hergestellt, welches in 100 mM NaAcetat Puffer mit pH 4,6 (2.2.3.1) gepuffert wurde. Das Medium enthielt 0,8 % Agarose und 0,5 % Polygalakturonsäure aus Citrus (Sigma P 3850). Es wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung wurden je 45 ml in quadratische Petrischalen ausgegossen. Nachdem das Medium ausgehärtet war, wurden mit einem Korkbohrer Löcher mit einem Durchmesser von etwa 4 mm in den Agar gestanzt.

### Durchführung des Tests

Die Proben wurden in die Löcher pipettiert. Dazu wurden die Pflanzenextrakte mit Na-Acetat Puffer auf einen bestimmten Gesamtproteingehalt (2000 ng; 1000 ng) eingestellt und jeweils die gleiche Menge an pilzlichen Polygalakturonasen zugegeben. Als Kontrolle wurde in die erste Vertiefung einer jeden Platte nur die pilzliche Polygalakturonase pipettiert und anschließend der Pflanzenextrakt einer nicht-transgenen Kontrollpflanze versetzt mit der pilzlichen Polygalakturonase. Anschließend wurden die verschiedenen Proben, ebenso versetzt mit der pilzlichen PG aufgetragen.

Die Platten wurden nun, abhängig von der Aktivität der Polygalakturonase, 12 bis 48 h bei 27°C inkubiert.

### **2.2.3.4 Auswertung des Agarose Diffusionstests – Bestimmung der inhibitorischen Aktivität**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten mit 6M HCl überschichtet und für ca. 2 min inkubiert. Bei erfolgreicher Durchführung wurden in dieser Zeit Höfe rund um die Vertiefungen sichtbar, die Salzsäure wurde dann wieder abgegossen und die Platten ausgewertet. Die Höfe rund um die Vertiefungen zeigten die Aktivität der pilzlichen Polygalakturonasen. Je größer der Hof, desto höher die Aktivität der PG's. Wurde die Aktivität der verwendeten PG's durch die Zugabe der Pflanzenextrakte gehemmt, war dies an einer reduzierten Hofgröße oder bei vollständiger Inhibierung am Ausbleiben des Hofes zu erkennen. Zur Auswertung wurden die Durchmesser der Höfe mit Hilfe einer Schieblehre vermessen und, soweit möglich, statistisch bewertet.

Die Berechnung der Hemmung aufgrund reduzierter Hofgröße erfolgte immer im Vergleich zur Hofgröße der nicht-transgenen Kontrolle. Zur Berechnung wurde der Durchmesser des ausgestanzten Loches (4 mm) von dem Durchmesser des Hofes abgezogen.



Berechnung der inhibitorischen Aktivität:

$$100 - \left[ \frac{\text{Durchmesser Hof Extrakt Transgene Pflanze in mm}}{\text{Durchmesser Hof Extrakt Kontroll Pflanze in mm}} \right] \times 100 = \text{Inhibitorische Aktivität in \%}$$

### 2.2.3.5 Durchführung des PGIP Assays nach Induktion der Blätter mit UV-Licht

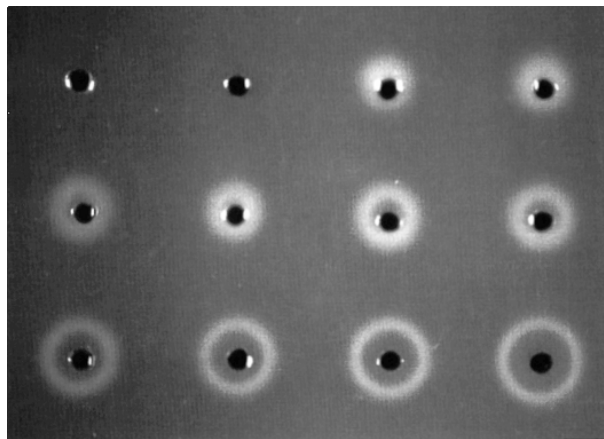
Um die maximale Expression endogener PGIPs in den nicht transgenen Pflanzen zu induzieren, wurden die Pflanzen mit UV-Licht bestrahlt. Dazu wurden die Blätter möglichst schonend von Gewächshauspflanzen geerntet und auf Wasseragar aufgelegt. Zur Induktion wurden die Blätter 5 min mit UV-Licht bestrahlt und danach für unterschiedlich lange Zeit bei 21 °C und 16/8 h Belichtung inkubiert. Die anschließende Extraktion der Blätter und die Durchführung des PGIP-Tests erfolgte wie unter 2.2.3.1 bis 2.2.3.4 beschrieben.

### 2.2.3.6 Isolierung von Polygalakturonasen aus *Aphanomyces euteiches*

1. Anzucht des *Aphanomyces euteiches* Stamm ATCC 201684 (Dänemark) auf Corn Meal Agar bei 21°C
2. Überführung des Myzels (ca. 10 Stücke a 1 cm<sup>2</sup> pro Petrischale) in Flüssigmedium und Kultivierung für ca. zehn Tage bei 21°C.
3. Überführung des Myzels in Mangelmedium (gefiltertes, autoklaviertes Flusswasser)
4. Inkubation für 24 Stunden bei 21 °C. In diesem Zeitraum wurden bewegliche Zoosporen vom Myzel in das umgebende Medium freigesetzt.
5. Abgießen des Mediums mit den darin enthaltenen Sporen in ein Gefäß
6. Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000 x g
7. Abgießen des Überstandes
8. Die pelletierten Zoosporen wurden durch Zugabe von wenig Quarzsand aufgeschlossen und nach Zugabe von 100 mM Natriumacetat (pH 5,0) wurde das Gemisch für 2 Stunden bei 4°C extrahiert
9. Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000x g
10. Transfer des Überstandes in neue Reaktionsgefäße

### 11. Aufkonzentration des Überstandes über 10000 Dalton Amicon Filter

Im Anschluss an die Herstellung des Zoosporenextraktes, wurde ein Agarose Diffusionstest (2.2.3.3) mit den gewonnenen Extrakten durchgeführt, um ihre Aktivität zu prüfen. Abbildung 2.9 zeigt das Ergebnis eines Tests mit aufsteigender Menge des extrahierten Zoosporenextrakt. Die Vertiefungen enthielten jeweils 0; 0,5; 0,75; 1; 2 und 4  $\mu\text{l}$  des Zoosporenextraktes. Es wurden je Volumen zwei Wiederholungen durchgeführt. Die Platte wurde für 18 h bei 27 °C inkubiert.



**Abb. 2.9** Agarose Diffusionstest zum Test der PG Aktivität des Zoosporenextraktes aus *Aphanomyces euteiches* ATCC 201684. Es wurden aufsteigende Volumina des extrahierten Zoosporenextraktes aufgetragen: je 2 Proben a 0; 0,5  $\mu\text{l}$ ; 0,75  $\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}$ ; 2  $\mu\text{l}$  und 4  $\mu\text{l}$ .

#### 2.2.3.7 Resveratrolnachweis in Pflanzen mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) – Extraktion des Pflanzenmaterials

Die Entwicklung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) in den 70er Jahren brachte wichtige Fortschritte bezüglich der Schnelligkeit und des Auflösungsvermögens. Sie ist mittlerweile die wichtigste chromatographische Methode (LOTTSPREICH UND ZORBAS 1998).

Da das *vst1*-Gen durch den eigenen wund- und elicitorinduzierbaren Promotor gesteuert wird, wurden die untersuchten Pflanzen oder Pflanzenteile mittels UV Bestrahlung induziert. Dazu wurde Gewächshauspflanzen möglichst schonend Blattmaterial entnommen. Die Blätter wurden in Schalen mit Wasseragar platziert und kopfüber für 5 Minuten auf einem UV Tisch (240 nm) inkubiert. Nach dieser Induktion wurden sie für mindestens 24 h bei 21 °C und Belichtung (16 h) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff aufgenommen und mit Hilfe eines Mörsers pulverisiert. Die Extraktion des

Blattmaterial erfolgte durch Zugabe eines Extraktionsmittels (1000 µl Extraktionsmittel auf 1 g Pflanzenmaterial), welches sich aus 80 % Methanol und 20 % Wasser zusammensetzte. Die Proben wurden bei leichtem Schütteln für 2 h bei RT unter Ausschluss von Licht extrahiert. Die festen Pflanzenbestandteile wurden durch einen sich anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min 10.000 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde zur restlosen Entfernung aller festen Bestandteile filtriert (Sterilfilter 0,22 µm) und in neue Reaktionsgefäße überführt.

Die Proben wurden zunächst bei -80 °C gelagert und anschließend zur weiteren Analyse in Trockeneis nach Karlsruhe zu Priv.-Doz. Dr. K. Briviba gesandt.

#### **2.2.3.8 Resveratrolnachweis mittels HPLC – Chromatographiebedingungen**

Die HPLC Analyse wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. K. Briviba, Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe durchgeführt.

Dabei wurden die polyphenolischen Verbindungen mittels Reversed-Phase Chromatographie bestimmt. Bei der Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) findet eine hydrophobe Wechselwirkung des Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren wässrigen Lösungsmittel statt. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines unpolaren organischen Lösungsmittels, das mit dem adsorbierten Molekül um die Bindungsstelle konkurriert (LOTTSPREICH UND ZORBAS 1998). Als stationäre Phase wurde eine Nova-Pak-C18 Säule (4µm, 4,6 x 250 mm; Waters) verwendet. Die Analyse erfolgte mit einem Photodiodendetektor (Shimadzu) bei 320 nm und einem binären Gradienten. Die Proben wurden 1:1 mit der mobilen Phase versetzt (Lösung A: 2/2/96 CH<sub>3</sub>OH / CH<sub>3</sub>CN / 1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O [v/v/v]) und für 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. 100 µl dieses Ansatzes wurde zur HPLC verwendet. Im Gradientenverlauf wurde durch Zumischen eines organischen Lösungsmittels zur wässrigen Phase die Polarität verringert und somit die Elutionskraft erhöht. Der lineare Gradient wurde progressiv durch eine Erhöhung des Anteils der Lösung B (100 % CH<sub>3</sub>CN) verändert. Von 0 % nach 0 min bis auf 5 % nach 5 min. Der Gradient von 5 % der Lösung B wurde bis zur 25 min gehalten, danach wurde der Gradient progressiv auf 20 % der Lösung B nach 40 min erhöht. Dieser Gradient wurde für 10 min gehalten und von 20 % nach 50 min bis auf 100 % der Lösung B nach 55 min erhöht. Danach wurde der Anteil der Lösung B auf 0 % reduziert. Die Identifizierung der polyphenolischen Bestandteile erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten sowie der UV-Spektren mit denen der Standardlösungen.

### 2.2.3.9 Resveratrolnachweis mittels HPLC – Saure Hydrolyse

Zur Durchführung einer sauren Hydrolyse wurden 100 µl der bereits aufbereiteten Proben mit 800 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl HCl (32 %) gemischt. Nach 2 h Inkubation bei 70 °C wurden 100 µl entnommen und mit 400 µl Fließmittel (Lösung A) versetzt. Zur HPLC Analyse wurden 100 µl eingespritzt.

Die entstandenen Chromatogramme und deren Interpretation wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. K. Briviba für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3.10 Funktionstest des *bar*-Gens – Leaf Paint Test

Der qualitative Nachweis des *bar*-Gens erfolgte durch das Bestreichen der Blätter mit Phosphinothricin-Lösung (600 mg/L), das gegenständige Blatt wurde markiert. Die Auswertung erfolgte nach einer Woche. Der Leaf Paint Test wurde als negativ bewertet, wenn das Blatt welk wurde und das *bar*-Gen damit keinen Effekt zeigte. Der Leaf Paint galt als positiv, wenn das Blatt keinerlei oder nur sehr geringe Nekrosen zeigte. Bei einigen Pflanzen, erwies sich die Auswertung des Leaf-Paints als schwierig, da nur der Blattrand oder Teile des Blattes welk waren, in diesen Fällen wurde das Ergebnis als indifferent (+/-) vermerkt und teilweise mittels PAT Test überprüft.



+



+/-



-

**Abb. 2.10 Leaf Paint Test Ergebnisse.** Mögliche Ergebnisse des Leaf Paint Tests. Der LP Test wurde als positiv gewertet, wenn das Blatt eine Woche nach auftragen der BASTA-Lösung unversehrt war. Wenn das Blatt vollständig verwelkt war, wurde der Test als negativ bonitiert. Bei Ausbildung partieller Nekrosen wurde das Testergebnis als indifferent eingestuft.

### 2.2.3.11 Funktionstest des *bar*-Gens – Phosphinotricin-Acetyltransferase-Test

Die Aktivität der Phosphinotricin-Acetyltransferase kann nach einem Protokoll von BROER (1989) auch enzymatisch nachgewiesen werden.

1. Homogenisieren von ca. 50 mg Blattmaterial in Extraktionspuffer (1 µl Puffer/ 1mg Blattmaterial); eventuell Zugabe von Quarz
2. Zentrifugation 5 min bei 4 °C und 10 000 x g
3. Der Überstand wurde in neues Reaktionsgefäß überführt
4. Ein Teil des Rohextraktes wurde 1/50 verdünnt und mittels Bradford Messung wurde (2.2.3.2) der Gesamtproteingehalt der Proben bestimmt
5. Reaktionsansatz:
  - 20 µl Rohextrakt
  - 2 µl Glufosinat Ammonium (BASTA 1/10 Verdünnung)
  - 3 µl <sup>14</sup>C-Acetyl CoA (spez. Aktivität 51 mCi/mmol)
6. Inkubation der Reaktionsansätze für 45 min bei 37 °C
7. Zentrifugation für 1 min bei 10 000 x g
8. 3 – 6 µl des Überstandes wurden auf Kieselgelplatte aufgetragen (in 1 µl Schritten)
9. Die Dünnschichtchromatographie lief für zwei bis drei Stunden in der Chromatographiekammer, danach wurden die Platten aus der Kammer genommen und getrocknet (eventuell fönen)
10. Die Dünnschichtplatte wurde in Saranfolie eingewickelt, ein Film (Kodak Biomax ML) wurde aufgelegt und in der -80 °C Truhe aufbewahrt.
11. Autoradiographie für 12 h bis vier Tage
12. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde der Film entwickelt, die Dünnschichtplatte wurde im Isotopenlabor bei -20 °C gelagert.

**Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:**

Extraktionspuffer

50 mM TRIS-HCl pH 7,5  
150 mg/L PMSF (Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid)  
3 g/L BSA  
2 mM Na-EDTA  
300 mg/l Dithiothreitol

Laufmittel

1-Propanol                      3 Volumenteile  
NH<sub>4</sub>OH Lösung (25%)      2 Volumenteile

## 2.2.4 Resistenztestung der transgenen Pflanzen

Die Begutachtung des Resistenzverhaltens der transgenen Pflanzen stellte einen sehr wichtigen Punkt der Charakterisierung dar. Die Testung konnte aufgrund fehlender Ausstattung und Erfahrung nicht am LGM Hannover durchgeführt werden. Die Tests wurden freundlicherweise von Dr. Diego Rubiales am Institut für Landwirtschaft (CSIC) in Cordoba, Spanien durchgeführt und die Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 2.2.4.1 Test auf Mehlttauresistenz (*Erysiphe pisi*)

#### **Inokulation**

Die Inokulation der transgenen Erbsen mit *Erysiphe pisi* wurde mit einem „Infektions-Turm“ durchgeführt. Die Inokulumdichte betrug ca. 5 Konidien pro mm<sup>2</sup>. Zur Inokulation wurde jeweils das zweitjüngste Blatt einer Pflanze mit fünf Blättern entnommen und auf fungizidhaltige (Benzimidazol 62,5 mg/l) Agarplatten überführt. Die Petrischalen wurden bei 20 °C in einem 12 h Licht /12 h Dunkel Rythmus kultiviert. Zur histologischen Analyse wurden je Linie und Wiederholung ein Blatt zwei Tage nach Inokulation und ein weiteres drei Tage nach Inokulation fixiert. Die restlichen Blätter wurden 7 Tage nach Inokulation fixiert.

#### **Histologische Auswertung**

Nach Fixierung und Färbung der Blätter wurde für jedes Blatt die Keimrate der Konidien bestimmt, indem 100 Konidien auf die Anwesenheit eines Keimschlauches hin untersucht werden. Im Hinblick auf die Weiterentwicklung des Pilzes wurden die Konidien auf die Bildung eines Appressoriums, sekundärer Hyphen oder daraus resultierender Kolonien und Haustorien untersucht.

Als Ergebnis der Resistenztests wird der Anteil sporenbildender Einheiten in % angegeben.

#### 2.2.4.2 Test auf Rostresistenz (*Uromyces pisi*)

##### **Inokulation**

Zunächst wurde ein Einzelsporisolat von *Uromyces pisi* (aus Cordoba, Spanien) auf anfälligen Erbsensorten angezogen. Zur Inokulation der Blätter wurde jeweils 1 mg Uredosporen (verdünnt mit Talk) auf die Blätter aufgetragen, was einer Sporendichte von 10 Sporen pro mm<sup>2</sup> entsprach (SILLERO und RUBIALES, 2002). Direkt nach der Inokulation wurden die Explantate für 24 h bei 20 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Blätter bei 20 °C und 14 h Licht / 10 h Dunkel kultiviert.

##### **Histologische Auswertung**

Die Fixierung und Färbung der Blattstücke (SILLERO und RUBIALES, 2002) erfolgte zwei und fünf Tage nach Inokulation. Evaluiert wurde die Anzahl der Haustorien pro Kolonie, Kolonien ohne Haustorienausbildung. Ausserdem wurde der Nekrotisierungsgrad der Wirtszellen erhoben. Mithilfe eines Mikroskopes mit Phasenkontrast wurde die Koloniegroße (CS) gemessen.

Als Ergebnis der Resistenztests wird der Prozentsatz an sporenbildenden Einheiten angegeben.

#### 2.2.5 Statistische Auswertung

Mit Ausnahme der Resistenztests ließen die Anzahl und Struktur der Daten keine schließende Statistik zu, deshalb wurde lediglich deskriptive Statistik eingesetzt. Es wurden Absolutwerte graphisch dargestellt oder Mittelwerte unter Angabe der Standardabweichung.

Für die Resistenztests wurde eine Varianzanalyse durchgeführt und Mittelwertvergleiche nach Dunnett ( $P < 0,05$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Molekulare Analysen der Elternpflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst transgene Erbsenlinien charakterisiert, die jeweils ein rekombinantes antifungales Gen in ihr Genom integriert hatten. Auf der Basis dieser Charakterisierung wurden einige der Linien als Kreuzungseltern ausgewählt.

Im Weiteren werden nun zunächst die Ergebnisse der molekularen und funktionellen Charakterisierung der potentiellen Elternlinien dargestellt, da sie die Basis für die darauf folgenden Kreuzungen bildeten.

Es wurden jeweils mehrere Linien mit demselben Konstrukt analysiert. Die Ergebnisse werden deshalb nach Konstrukten gegliedert dargestellt.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden alle Pflanzen mittels PCR auf Backbone-Integrationen untersucht (Material und Methoden 2.2.2.8). Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Pflanzen verwendet, bei denen keine Backbone-Sequenzen nachgewiesen werden konnten.

#### 3.1.1 Analyse der *Ri* PGIP-Klone

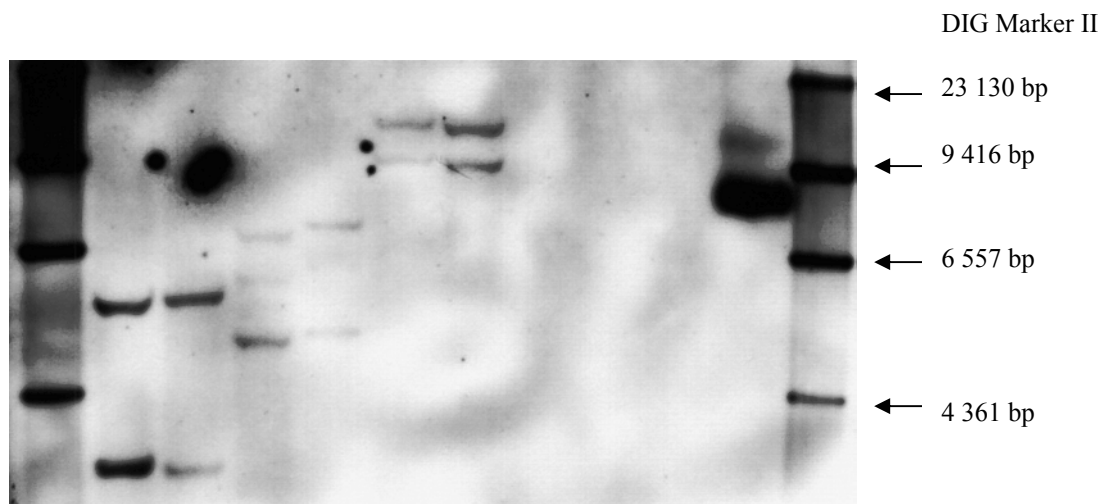
In den Transformationsexperimenten 98-19 und 98-52 wurde das Konstrukt pSCP1 verwendet (2.1.7.3.1). Dieses Konstrukt beinhaltet das Markergen *bar* und das Gen für das Polygalakturonase-inhibierende Protein der Himbeere (*Ri* PGIP).

Auf DNA Ebene wurden die potentiell transgenen Klone zunächst mittels PCR untersucht. Um die PCR-getesteten, transgenen Klone hinsichtlich der Integration der T-DNA ins Pflanzengenom zu charakterisieren und die Anzahl der integrierten T-DNA Kopien in das Genom zu ermitteln, wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Anhand der Integrationsmuster wurde eine Linienidentifizierung vorgenommen.

##### 3.1.1.1 Southern-Blot-Analyse der *Ri* PGIP-Klone

Die Abbildung 3.1 zeigt einen Southern Blot mit DNA von *Ri* PGIP-Pflanzen. Der Verdau der genomischen DNA wurde mit Xba I durchgeführt. Auf der T-DNA des Konstruktes befindet sich keine Schnittstelle für XbaI. In Tabelle 3.1 wird der Probenauftrag des Southern erläutert.





**Abb. 3.1: Southern-Blot-Analyse der *Ri* PGIP Klone 98-19-1,9 (1,2); 98-52-2,5 (3;4); 98-52-5,4 (5, 6).**

Der Restriktionsverdau wurde mit *Xba*I durchgeführt. Nach Hybridisierung mit einer *Ri* PGIP Sonde konnten zwei Banden für 98-19-1,9, drei Banden für 98-52-2,5 und zwei Banden für 98-52-5,4 detektiert werden. In Bahn 7 befindet sich die DNA einer nicht transgenen Kontrollpflanze.

Detaillierter Probenauftrag in Tab. 3.1.

**Tab. 3.1 Probenauftrag Southern-Blot-Analyse der *Ri* PGIP Klone 98-19-1,9; 98-52-2,5; 98-52-5,4.**

Probennr.	Pflanze	Generation	Kopien
1	98-19-1,9-5-4	T 2	2
2	98-19-1,9-5-1-4-2-6	T 5	2
3	98-52-2,5-1	T 1	3
4	98-52-2,5-1-2-12-1	T 4	3
5	98-52-5,4-12-1	T 2	2
6	03/284-1 (RK 98-52-5,4-1-12-8 x Baroness)	RK Rückkreuzung	2
7	Baroness		

Es wurden drei unabhängige Klone mit dem *pgip*-Gen aus der Himbeere identifiziert (Abb. 3.1). Der Klon **98-19-1,9** zeigte **zwei Kopien**, die auch in der getesteten T 5-Pflanze stabil integriert waren. Da die beiden Kopien stabil in die Nachkommenschaften vererbt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sie sehr eng gekoppelt vorliegen.

Bei der **98-52-2,5** waren mindestens **drei Kopien** zu erkennen. Auch diese Integrationen wurden stabil in die Nachkommenschaften vererbt, da die T 1-Pflanze und die Pflanze aus der T 4 das gleiche Integrationsmuster aufwiesen.

In den Spuren 5 und 6 des Southern Blot sind jeweils zwei Banden zu erkennen, was darauf hindeutet, dass der Klon **98-52-5,4** **zwei Kopien** der T-DNA stabil integriert hat.

### 3.1.1.2 Linienetablierung der *Ri* PGIP-Klone – PCR Daten und Segregationsanalyse

Anhand der PCR-Daten wurde eine Segregationsanalyse der Nachkommenschaften durchgeführt. In den Tabellen 3.2; 3.3 und 3.4 werden die Ergebnisse für die Etablierung der drei *Ri*PGIP- Linien aufgeführt.

**Tab. 3.2 Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Klones 98-19-1,9.**

Pflanze	Generation	PCR GOI	Wahrscheinlichkeit der Homozygotie	Samen
98-19-1,9	T 0	+	0 % Hemizygot	5
98-19-1,9-1	T 1	-		
98-19-1,9-2	T 1	+	0 % Hemizygot	9
98-19-1,9-3	T 1	-		
98-19-1,9-4	T 1	-		
98-19-1,9-5	T 1	+	95,5 %	13
98-19-1,9-5	T 2	+ 13x	99,92 %	115
98-19-1,9-5	T3	+ 27 x	99,97 %	209
98-19-1,9-5	T4	+ 31 x	nicht bestimmt	

Die T 0 ist definitionsgemäß hemizygot. In der T 1 wurde eine Aufspaltung von 2:3 (Transgene: nicht Transgene) beobachtet. Während die neun Nachkommen der 98-19-1,9-2 erneut segregierten, zeigten die 13 Nachkommen der 98-19-1,9-5 keine Aufspaltung. Es handelte sich also zu 95,9 % um eine homozygote T 1 Pflanze. Die Analyse der T 2 und T 3 bestätigte dies. Somit konnte für den Klon 98-19-1,9 in der T 3-Generation zu 99,97 % eine homozygote Linie etabliert werden. Die Nachkommen dieser Linie wurden für weitere Analysen verwendet.

**Tab. 3.3 Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Klones 98-52-2,5.**

\* die Anzahl der gebildeten Samen und der analysierten Pflanzen kann sich unterscheiden, da nicht immer alle Samen gekeimt sind. Die Anzahl der gebildeten Samen ist in Klammern vermerkt.

<b>Pflanze</b>	<b>Generation</b>	<b>PCR GOI</b>	<b>Wahrscheinlichkeit der Homozygotie</b>	<b>Samen</b>
98-52-2,5	T 0	nicht untersucht		2
98-52-2,5-1	T 1	+	98,9 %	18 (19)*
98-52-2,5-2	T 1	+		-
98-52-2,5-1	T 2	+ 18 x	99,97 %	224
98-52-2,5-1	T 3	+ 31 x	nicht bestimmt	286

Wie man der Tabelle 3.3 entnehmen kann, wurde die T 0-Pflanze des Klons 98-52-2,5 nicht untersucht. Beide T 1-Pflanzen hatten das GOI integriert, jedoch gelangte eine der Pflanzen nicht zur Samenreife. Von den 19 T 2 Samen keimten 18. Die Analyse dieser Nachkommenschaft zeigte, dass alle Pflanzen das GOI integriert hatten. Daraus ergab sich ein Homozygotiegrad von 98,9 % für die T 1-Mutterpflanze. Die Annahme der Homozygotie wurde durch die Analyse der T 3 bestätigt. Hierbei zeigten alle 31 getesteten Pflanzen die Integration des *Ri pgip*-Gens. Der Homozygotiegrad der T 2 Mutter lag somit bei 99,97 %, womit die Linienetablierung als erfolgreich angesehen wurde.

**Tab. 3.4 Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Klones 98-52-5,4.**

<b>Pflanze</b>	<b>Generation</b>	<b>PCR GOI</b>	<b>Wahrscheinlichkeit der Homozygotie</b>	<b>Samen</b>
98-52-5,4	T 0	nicht untersucht		2
98-52-5,4-1	T 1	+	95,5 %	13
98-52-5,4-2	T 1	+		-
98-52-5,4-1	T 2	+ 13 x	99,97 %	133
98-52-5,4-1	T 3	+ 31 x	nicht bestimmt	237

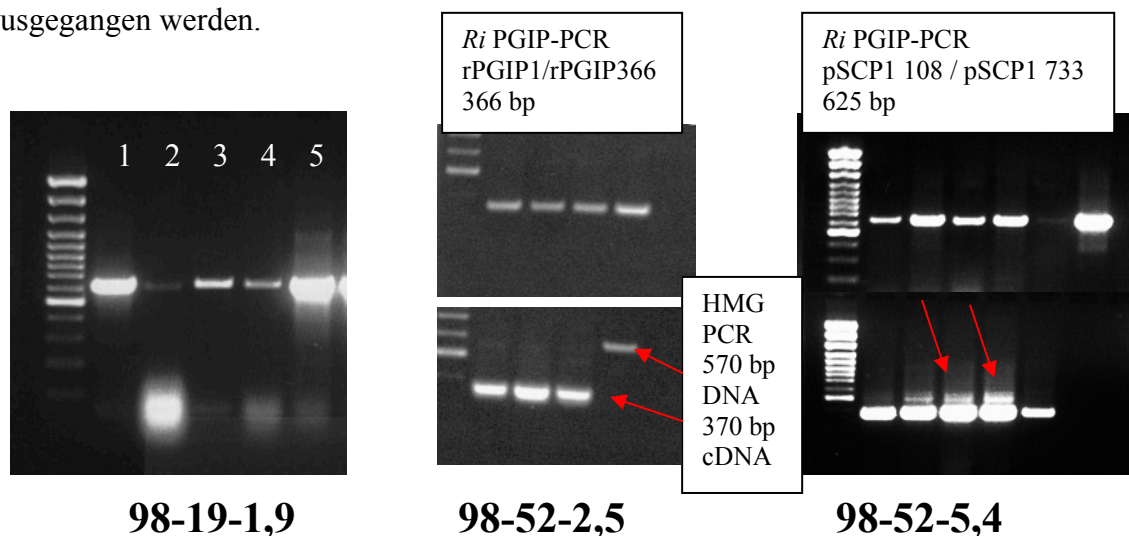
Analog zu den vorangegangenen Ergebnissen konnte durch die Analyse von 31 T 3- Pflanzen ein Homozygotiegrad von 99,97 % berechnet werden. Also konnte auch hier die Linienetablierung erfolgreich abgeschlossen werden.

### 3.1.1.3 Transkriptionsanalyse der *Ri* PGIP-Linien

#### RT – PCR

Um erste Hinweise auf die Expression zu erhalten, wurde pflanzliche RNA isoliert, und eine reverse Transkription durchgeführt.

Bei der Linie **98-19-1,9** wurde die Transkription des *pgip*-Gens in Spross und Wurzel getestet (Abb. 3.2). In der Bahn 1 und 3 wurde jeweils die RT PCR der cDNA aufgetragen. In Bahn 5 befindet sich die Plasmidkontrolle. In Bahn 2 und 4 wurde das Ergebnis der RT-PCR der RNA aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die DNA Kontamination in der RNA unterschiedlich stark war. Während in der Bahn 2 (RNA Spross) nur ein sehr schwaches Produkt erkennbar ist, sieht man in der Bahn 4 (RNA Wurzel) deutlich ein Amplifikat. Da das Produkt in Bahn 3 deutlich stärker ist, kann von einer Transkription in der Wurzel ausgegangen werden.



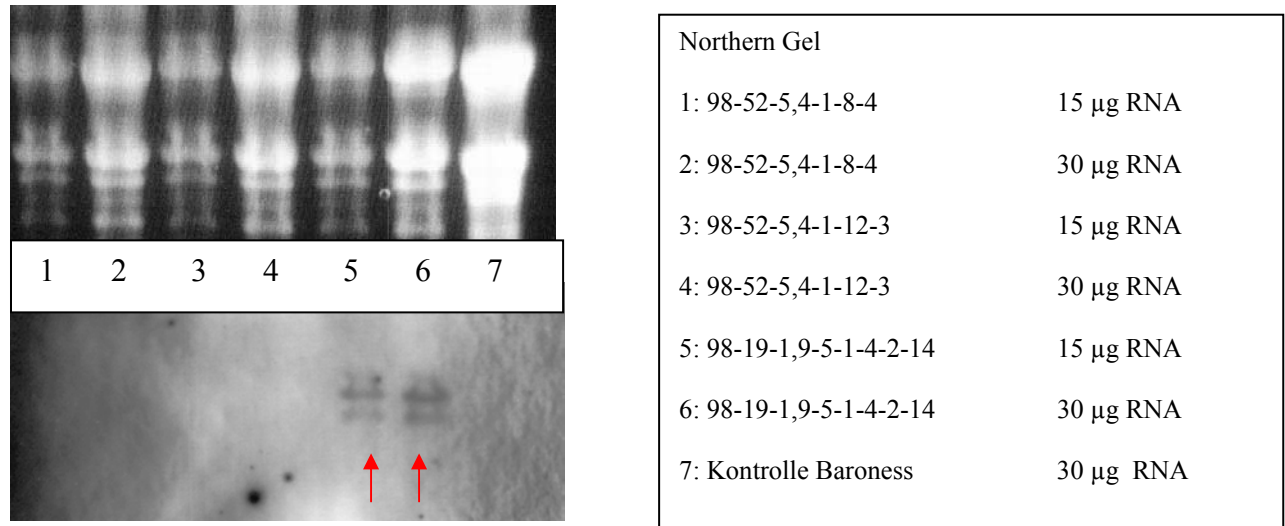
**Abb. 3.2** Kontrollgele der RT-PCR der *Ri* PGIP-Linien: 98-19-1,9; 98-52-2,5; 98-52-5,4.

Bei der Linie 98-19-1,9 wurde sowohl die Transkription des Sprosses (1) als auch der Wurzel (3) untersucht. Zum Test auf DNA Kontaminationen wurde eine RT-PCR mit der cDNA (1,3) und der RNA (2,4) durchgeführt. Bei den Linien 98-52-2,5 und 98-52-5,4 wurde die Transkription drei bzw. vier verschiedener Sprosse untersucht. Als Test auf DNA Kontaminationen wurde die unter 2.2.2.15 HMG PCR durchgeführt. Als Marker ist jeweils der 100 bp plus aufgetragen.

Die RNA der Linien 98-52-2,5 und 98-52-5,4 wurde mittels HMG-PCR auf DNA Kontaminationen getestet (2.2.2.15). Bei der Linie 98-52-2,5 sind keine DNA Kontaminationen und bei der 98-52-5,4 nur wenige DNA Kontaminationen erkennbar, die mit roten Pfeilen gekennzeichnet wurden. Wie man auf den Abbildungen erkennen kann, konnte bei allen drei Linien mittels PCR eine Transkription nachgewiesen werden.

### Northern-Blot-Analyse

Um die Ergebnisse der RT-PCR zu überprüfen, wurde mit Proben der Linien 98-19-1,9 und 98-52-5,4 eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt.



**Abb. 3.3 Northern-Blot-Analyse: Gel und Blot der Linien 98-19-1,9 (5,6) und 98-52-5,4 (1-4) und einer nicht transgenen Kontrollpflanze (7).** Auf dem oben abgebildeten Gel ist die Auftrennung und Menge der Gesamt RNA zu sehen. Unten ist der Northern-Blot nach der Hybridisierung mit einer *Ri* PGIP Sonde zu erkennen. Nur für die Linie 98-19-1,9 konnten Signale detektiert werden. Sie wurden mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Bei der Linie 98-19-1,9 konnte sowohl mittels RT-PCR als auch durch die Northern-Blot-Analyse die Transkription des *pgip*-Gens nachgewiesen werden.

Bei der Linie 98-52-5,4 konnte zwar mittels RT-PCR eine Transkription nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch die Northern-Blot-Analyse jedoch nicht bestätigt. Das könnte auf ein ‘posttranskriptionales Gene Silencing’ (PTGS) hinweisen.

#### 3.1.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularen Analyse: *Ri* PGIP-Linien

Es konnten drei Linien mit dem PGIP aus Himbeere etabliert werden. Alle Linien enthalten mehr als eine Kopie des Transgens, da jedoch keine Segregation der Kopien beobachtet werden konnte, müssen die Integrationen sehr eng gekoppelt vorliegen. Mittels RT-PCR konnte zunächst in allen drei Linien eine Transkription nachgewiesen werden. Für die Linie 98-19-1,9 konnte dies durch die Northern-Blot-Analyse bestätigt werden. Die Linie 98-52-2,5 wurde nicht im Northern getestet. Die Linie 98-52-5,4 hingegen zeigte kein Transkript in der

Northern-Blot-Analyse, dies könnte ein Hinweis auf einen sehr raschen Abbau der RNA in der Pflanzenzelle und somit auf posttranskriptionales Gene Silencing (PTGS) sein.

Zur Kreuzung würde eine Linie mit möglichst wenigen Kopien der T-DNA ausgewählt werden, die eine Transkription des GOI zeigt. Es müssen jedoch auch die weiteren Analysen einbezogen werden.

**Tab. 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekulare Charakterisierung der *Ri* PGIP-Linien**

<b>Linie</b>	<b>Sorte</b>	<b>Kopienzahl</b>	<b>Transkription</b>	<b>Homozygotie- Grad</b>	<b>Generation</b>
98-19-1,9	‘Baroness’	2 Kopien	RT PCR + Northern +	99,97 %	T 3
98-52-2,5	‘Baroness’	3 Kopien	RT PCR +	99,97 %	T 2
98-52-5,4	‘Baroness’	2 Kopien	RT PCR + Northern -	99,97 %	T 2

### 3.1.2 Analyse der *Ad* PGIP-Klone

In den Transformationsexperimenten 98-29, 99-55 und 99-63 wurde das Konstrukt pSCP2 verwendet (2.1.7.3.2). Dieses Konstrukt beinhaltet das Markergen *bar* und das *pgip*-Gen der Kiwi (*Ad* PGIP).

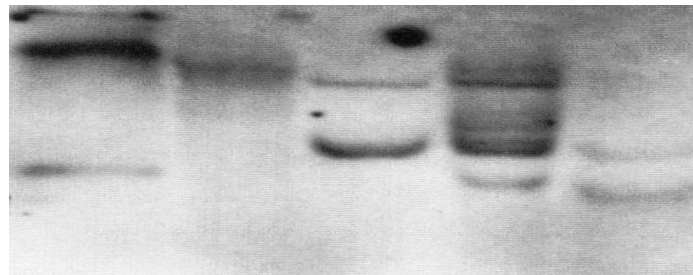
#### 3.1.2.1 Southern-Blot-Analyse der *Ad* PGIP-Klone

Bei der Southern-Blot-Analyse der T 1 Pflanzen des Klones 98-29-1,4 (Abb. 3.4) konnte die Segregation multipler Kopien des Transgens beobachtet werden. Der Restriktionsverdau genomischer DNA von vier verschiedenen T 1 Pflanzen (98-29-1,4-1 bis -4) wurde mit dem Restriktionsenzym Sac I durchgeführt. Auf der T-DNA des Plasmids pSCP2 (2.1.7.3.2) befindet sich eine Schnittstelle für das Enzym.

DIG Marker II

23 130 bp

9 416 bp



DIG	98-29-1,4	98-29-1,4	98-29-1,4	98-29-1,4
Marker	1	2	3	4
III				

**Abb. 3.4 Southern-Blot-Analyse der Nachkommenschaft des Klones 98-29-1,4.** Nach der Hybridisierung der DNA mit einer *Ad* PGIP Sonde konnten für die vier T 1 Pflanzen unterschiedliche Integrationsmuster detektiert werden. Der Restriktionsverdau der DNA wurde mit *Sac* I durchgeführt.

Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse der T1-Pflanzen zeigte eine Segregation der multiplen T-DNA Insertionen. Das Integrationsmuster des Klones 98-29-1,4-1 ließ auf ein bis zwei Insertionen schließen, die Klone 98-29-1,4-2 und -4 zeigten je zwei T-DNA Kopien die jedoch unterschiedlich positioniert sind. Der Klon 98-29-1,4-3 zeigte multiple Insertionen.

Dieses Ergebnis konnte auch in Versuchen mit anderen Restriktionsenzymen wie *Bam*H I bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Der Klon **98-29-1,4-1** wurde für die Etablierung einer homozygoten Linie und zur Durchführung der weiteren Charakterisierung verwendet.

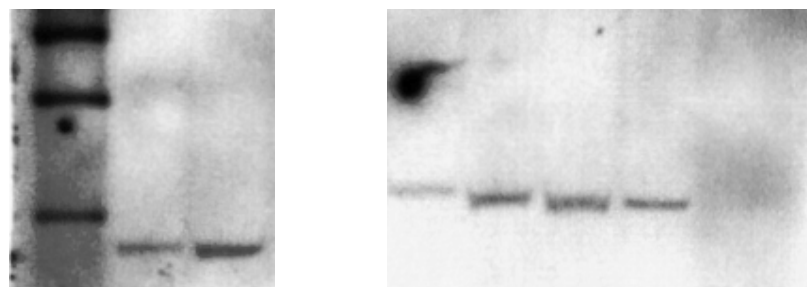
Um die stabile Integration der T-DNA des Klones 98-29-1,4-1 zu prüfen, wurden weitere Southern-Blot-Analysen von T 4 Pflanzen durchgeführt (Abb. 3.5). Der Verdau der genomischen DNA wurde mit *Bam*HI durchgeführt.

DIG Marker II

9 416 bp

6 557 bp

4 361 bp



DIG	1	2
Marker		
II		

**Abb. 3.5 Southern-Blot-Analyse von zwei Individualpflanzen der T 4 Generation des Klones 98-29-1,4-1 (1 und 2) und von vier Individualpflanzen der T 2 Generation des Klones 99-63-38,1 (3 bis 6).**

In der Bahn 7 ist die DNA einer nicht transgenen Kontrollpflanzen aufgetragen. Der Restriktionsverdau wurde mit *Bam*H I durchgeführt. Probenauftrag im Detail in Tabelle 3.6.

**Tab. 3.6** Probenauftrag Southern Blot *Ad* PGIP: 98-29-1,4 T 4 Pflanzen; 99-63-38,1 T 2 Pflanzen Abb. 3.8.

<u>Southern Probe</u>	<u>Generation</u>	<u>Anzahl Banden</u>
Probe 1: 98-29-1,4-1-1-1-1	T 4	1
Probe 2: 98-29-1,4-1-1-2-1	T 4	1
Probe 3: 99-63-38,1-1-10	T 2	1
Probe 4: 99-63-38,1-1-11	T 2	1
Probe 5: 99-63-38,1-1-2	T 2	1
Probe 6: 99-63-38,1-1-24	T 2	1
Probe 7: Baroness nicht transgen		

In Abb. 3.4 wurde die Segregation der T 1-Pflanzen des Klones 98-29-1,4 gezeigt. Die Pflanze 98-29-1,4-1 zeigte die Integration einer Kopie der T-DNA. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden für weitere Analysen Nachkommen dieses Klones verwendet. Wie in den Bahnen 1 und 2 der Abb. 3.5 zu erkennen ist, konnte das Integrationsmuster für Pflanzen der T4-Generation bestätigt werden. Die **98-29-1,4-1** zeigten nach der Segregation in der T 1 die stabile Integration einer Kopie der T-DNA und wurde somit für weitere Untersuchungen verwendet.

Als zweiter *Ad* PGIP Klon wurde **99-63-38,1** zur Southern-Blot-Analyse herangezogen. Die DNA vier verschiedener T 2-Pflanzen wurde mit dem Enzym BamH I fragmentiert und in die Bahnen 3 bis 6 (Abb. 3.5) aufgetragen. Die T 2-Pflanzen wiesen alle das gleiche Integrationsmuster auf, sie zeigten die Integration einer Kopie der T-DNA. Das Restriktionsfragment, welches die T-DNA enthielt hatte eine Größe von etwa 4500 bp.

Der Klon **99-55-1,2** stellte den dritten getesteten PGIP-Klon mit *Ad* PGIP dar. Der Restriktionsverdau der genomischen DNA einer Individualpflanze der T 1-Generation (99-55-1,2-3) erfolgte mit BamH I. Die getestete Pflanze zeigte eine Kopie der T-DNA als Integration. Dieses Integrationsmuster konnte auch für Pflanzen der Nachkommenschaft des Klones 99-55-1,2 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



### 3.1.2.2 Linienetablierung der *Ad* PGIP-Klone – PCR Daten und Segregationsanalyse

Aufgrund der PCR Daten wurde eine Segregationsanalyse der Nachkommenschaften durchgeführt. In den Tabellen 3.7 ; 3.8 und 3.9 werden die Ergebnisse für die drei *Ad* PGIP Klone aufgeführt.

**Tab. 3.7 Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Klones 98-29-1,4-1.**

\* die Anzahl der gebildeten Samen und der analysierten Pflanzen kann sich unterscheiden, da nicht immer alle Samen gekeimt sind. Die Anzahl der gebildeten Samen ist in Klammern vermerkt.

Pflanze	Generation	PCR GOI	Wahrscheinlichkeit der Homozygotie	Samen
98-29-1,4	T 0	+	0 % Hemizygot	4
98-29-1,4-1	T 1	+	95,46 %	13
98-29-1,4-2	T 1	+	0 % Hemizygot	14
98-29-1,4-3	T 1	+	78,93 %	7(10)*
98-29-1,4-4	T 1	+	98,89 %	18(19)*
98-29-1,4-1	T 2	+ 13 x	99,96 %	160
98-29-1,4-1	T 3	+ 30 x	nicht bestimmt	378

Aufgrund der Southern-Blot-Analyse (Abb. 3.7) wurde der Klon 98-29-1,4-1 zur weiteren Analyse ausgewählt. Bei der Analyse der 13 T 2-Pflanzen dieses Klones zeigten alle Pflanzen die Integration des GOI. Daraus ergab sich für die T 1-Mutterpflanze mit einer Wahrscheinlichkeit von 95,4 % eine Homozygotie. Auch die T 3 Nachkommenschaft bestätigte dieses Ergebnis und lieferte einen Homozygotiegrad von 99,96 % für die T 2 Mutterpflanze.

**Tab. 3.8 Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Klones 98-55-1,2.**

\* die Anzahl der gebildeten Samen und der analysierten Pflanzen kann sich unterscheiden, da nicht immer alle Samen gekeimt sind. Die Anzahl der gebildeten Samen ist in Klammern vermerkt.

Pflanze	Generation	PCR GOI	Wahrscheinlichkeit der Homozygotie	Samen
99-55-1,2	T 0	+	0 % Hemizygot	4
99-55-1,2-1	T 1	-	-	-
99-55-1,2-2	T 1	+		11
99-55-1,2-3	T 1	+	99,9 %	27(29)*
99-55-1,2-4	T 1	+		8
99-55-1,2-3	T 2	+ 27 x	89,9 %	247
99-55-1,2-3	T 3	+ 10 x	96,6 %	95
99-55-1,2-3	T 4	+ 14 x	99,99 %	149
99-55-1,2-3	T 5	+ 45 x	nicht bestimmt	168

Von dem Klon 99-55-1,2 konnte bereits die T 0 Pflanze analysiert werden. Sie zeigte erwartungsgemäß die Integration des *pgip*-Gens, auch bei drei der vier T 1-Nachkommen konnte das Transgen nachgewiesen werden. In der T 2 konnten aufgrund der sehr guten Samenproduktion der Pflanze 99-55-1,2-3 bereits 27 Pflanzen untersucht und als positiv befunden werden. Somit konnte bereits in der T 1 Mutterpflanze zu 99,9 % von einer Homozygotie ausgegangen werden. Dieses Ergebnis wurde durch weitere Analysen in den folgenden Generationen bestätigt.

**Tab. 3.9 Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Klones 99-63-38,1.**

<b>Pflanze</b>	<b>Generation</b>	<b>PCR GOI</b>	<b>Wahrscheinlichkeit der Homozygotie</b>	<b>Samen</b>
99-63-38,1	T 0		0 % Hemizygot	15
99-63-38,1-1	T 1	+	0 % Hemizygot	24
99-63-38,1-2	T 1	+		23
99-63-38,1-3	T 1	+		16
99-63-38,1-4	T 1	+		-
99-63-38,1-5	T 1	-		-
99-63-38,1-6	T 1	-		19
99-63-38,1-7	T 1	+		13
99-63-38,1-8	T 1	+		6
99-63-38,1-9	T 1	+		7
99-63-38,1-10	T 1	-		9
99-63-38,1-11	T 1	+		15
99-63-38,1-12	T 1	+		9
99-63-38,1-13	T 1	+		6
99-63-38,1-14	T 1	-		9
99-63-38,1-1	T 2	+ 21 x		401
99-63-38,1-1	T 2	-- 2 x		39

Bei diesem Klon bildete die T 0- Pflanze mit 15 Samen ausserordentlich viele Samen. Davon konnten 14 T 1-Pflanzen analysiert werden. Das Verhältnis transgener- zu nicht transgenen Pflanzen in der T 1-Generation war 10: 4, was einer erwarteten Aufspaltung von 3:1 nach Mendel sehr nah kommt. Auch die T 2-Nachkommenschaft der Pflanzen 99-63-38,1-1 spaltete in 21 transgene und zwei nicht transgene Pflanzen auf. Das bedeutet, dass auch die T1-Mutterpflanze hemizygot war. Für den Klon 99-63-38,1 konnte bisher keine homozygote Linie etabliert werden.

### 3.1.2.3 Transkriptionsanalyse der *Ad* PGIP Linien

Um einen ersten Hinweis auf die mögliche Expression des *Ad* PGIP Gens zu bekommen, wurde RNA von den transgenen Pflanzen isoliert und eine RT-PCR durchgeführt.

**Tab. 3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der *Ad* PGIP-Linien.**

Es wurde von verschiedenen Individualpflanzen der *Ad* PGIP Linien eine Reverse Transkription durchgeführt. Die cDNA wurde als Template zur *Ad* PGIP PCR und zur *bar* PCR eingesetzt. Die Ergebnisse sind zusammengefasst in der Tabelle dargestellt.

Linie	RT-PCR <i>Ad</i> PGIP	RT-PCR <i>bar</i>
98-29-1,4-1	+	+
99-55-1,2	+	+
99-63-38,1	-	+

Wie die Ergebnisse in Tabelle 3.10 zeigen, konnte für alle untersuchten Pflanzen eine Transkription des *bar*-Gens nachgewiesen werden, dies war auch bei Pflanzen der Fall, die herbizidsensitiv waren (3.2.1.1). Für die 99-63-38,1 konnte keine Transkription des *pgip*-Gens detektiert werden, dieselben Proben jedoch enthielten ein Transkript des *bar*-Gens. Es könnte sich in diesem Fall also um ein ‘transkriptionales Gene Silencing’ (TGS) des *Adpgip*-Gens handeln. Für die Linien 98-29-1,4-1 und 99-55-1,2 konnte sowohl eine Transkription des *bar*-Gens als auch des *pgip*-Gens mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

### 3.1.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularen Analyse: *Ad* PGIP-Linien

Durch die Southern-Blot-Analysen konnten drei unabhängige Klone mit jeweils einer Kopie des *Ad pgip*-Gens identifiziert werden. Die Linienetablierung gelang jedoch bisher nur bei zwei der drei Klone. Die Transkriptionsanalyse mittels RT-PCR zeigte, dass das *pgip*-Gen im Klon 99-63-38,1 nicht abgelesen wird, während die Transkription bei den Linien 98-29-1,4-1 und 99-55-1,2 nachgewiesen werden konnte. Damit schied der Klon 99-63-38,1 als Elternlinie für die anstehenden Kreuzungen aus.

Tab. 3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekulare Charakterisierung der *Ad* PGIP-Linien

Linie	Sorte	Kopienzahl	Transkription des GOI	Homozygotie- Grad	Generation
98-29-1,4-1	'Baccara'	1 Kopie	RT-PCR +	99,96 %	T 3
99-55-1,2	'Baroness'	1 Kopie	RT-PCR +	99,99 %	T 5
99-63-38,1	'Baroness'	1 Kopie	RT-PCR -	Hemizygot	T 2

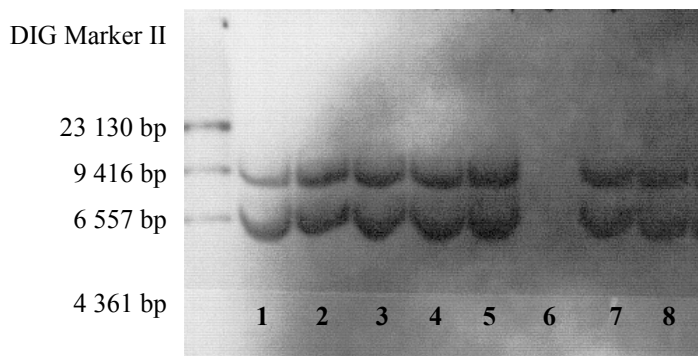
### 3.1.3 Analyse der *Vst1*-Klone

Das Plasmid pHKvst wurde für zwei Transformationsexperimente 98-48 und 99-67 verwendet (2.1.7.3.3). Es beinhaltet das Markergen *bar* und das *vst1*-Gen aus der Weinrebe, welches für die Stilbensynthese codiert.

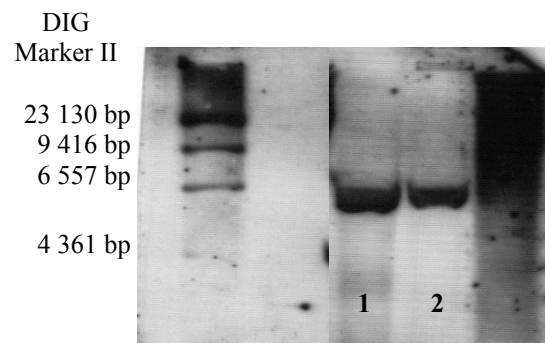
#### 3.1.3.1 Southern-Blot-Analyse der *Vst1*-Klone

Es wurde von jedem der zwei Transformationsexperimente zunächst ein Klon zur molekularen Charakterisierung herangezogen. Zur Southern-Blot-Analyse des Klones 98-48-8,2 wurde die genomische DNA von acht T 2-Pflanzen (98-48-8,2-3-1 bis -8) mit dem Restriktionsenzym *EcoR* I fragmentiert. Auf der T-DNA befindet sich eine singuläre Schnittstelle für das Enzym vor dem *Vst1*-Promotor. Für die Southern-Blot-Analyse des Klones 99-67-8,1 wurde die genomische DNA zweier T 2-Pflanzen (99-67-8,1-7-3 und -8-6) mit dem *BamH* I fragmentiert.

Die Abbildungen 3.6 und 3.7 zeigen die Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen. In den Bahnen 1 bis 5 und 7 und 8 zeigten die T 2-Pflanzen des Klons 98-48-8,2 die Integration zweier Kopien der T-DNA die wiederum eng gekoppelt sind, da keinerlei Segregation der Kopien beobachtet werden konnte. In der Bahn 6 ist kein Signal erkennbar, die entsprechende Pflanze (98-48-8,2-3-6) lieferte auch in der PCR negative Ergebnisse und wurde als isogene Negativkontrolle eingesetzt.



**Abb. 3.6** Southern-Blot-Analyse von acht T 2-Pflanzen des Klones 98-48-8,2. Restriktionsverdau mit EcoR I.



**Abb. 3.7** Southern-Blot-Analyse von zwei T 2-Pflanzen des Klones 99-67-8,1 (BamH I).

Die beiden T 2-Pflanzen der Linie 99-67-8,1 zeigten in der Southern-Blot-Analyse Einzelkopien des Transgens. Die Integrationsmuster beider Klone konnten in weiteren Analysen der Nachkommenschaften reproduziert werden.

### 3.1.3.2 Linienetablierung der Vst1-Klone - PCR Daten und Segregationsanalyse

Aufgrund der PCR Daten wurde eine Segregationsanalyse der Nachkommenschaften durchgeführt. In den Tabellen 3.12 und 3.13 werden die Ergebnisse für die zwei Vst1-Linien aufgeführt.

**Tab. 3.12** Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Klones 98-48-8,2

Pflanze	Generation	PCR GOI	Wahrscheinlichkeit der Homozygotie	Samen
98-48-8,2	T 0	+	0 % Hemizygot	3
98-48-8,2-1	T 1	--		-
98-48-8,2-2	T 1	--		-
98-48-8,2-3	T 1	+	0 % Hemizygot	12
98-48-8,2-3-3	T 2	+ 9 x - 2 x	99,16 %	203
98-48-8,2-3-2	T 3	+ 14 x		12
98-48-8,2-3-3	T 3	+ 19 x	99,99 %	180
98-48-8,2-3-3	T 4	+ 39 x	100 %	625
98-48-8,2-3-3	T 5	+ 78 x	nicht bestimmt	394

Von dem Klon 98-48-8,2 konnte bereits die T 0 Pflanze analysiert werden. Sie zeigte die Integration des *vst*-Gens und produzierte drei Samen. Von den drei T 1-Nachkommen konnte das Transgen nur in einer Pflanze nachgewiesen werden. In der T 2 wurden elf Pflanzen untersucht und neun davon als positiv befunden. Bei der T 1-Pflanze handelte es sich demnach um eine hemizygoten Pflanze. Die Analyse von 19 T 3-Pflanzen ergab für alle Pflanzen eine Integration der T-DNA wodurch ein Homozygotiegrad von 99,16 % für die T 2 Mutterpflanze (98-48-8,2-3-3) berechnet werden konnte. Die Annahme der Homozygotie wurde durch die Analyse der T 4 und T 5 Nachkommenschaften (39 Pflanzen bzw. 78 Pflanzen) bestätigt, so dass die Etablierung der Linie 98-48-8,2 als erfolgreich angesehen werden kann.

**Tab. 3.13 Segregationsanalyse der Nachkommenschaft des Klones 99-67-8,1.**

<b>Pflanze</b>	<b>Generation</b>	<b>PCR GOI</b>	<b>Wahrscheinlichkeit der Homozygotie</b>	<b>Samen</b>
99-67-8,1	T 0	nicht untersucht	0 % Hemizygot	1
99-67-8,1-1	T 1	+ 1 x	0 % Hemizygot	12
99-67-8,1-1-1	T 2	-		7
99-67-8,1-1-2	T 2	+		10
99-67-8,1-1-3	T 2	+		12
99-67-8,1-1-4	T 2	+		9
99-67-8,1-1-5	T 2	+		8
99-67-8,1-1-6	T 2	-		9
99-67-8,1-1-7	T 2	+	83,31%	8
99-67-8,1-1-8	T 2	+		14
99-67-8,1-1-9	T 2	+		12
99-67-8,1-1-10	T 2	+		12
99-67-8,1-1-11	T 2	-		12
99-67-8,1-1-12	T 2	+		12
99-67-8,1-1-7	T 3	+ 8 x	98,89 %	30
99-67-8,1-1-7	T 4	+ 18 x	99,16 %	109
99-67-8,1-1-7	T 5	+ 19 x	nicht bestimmt	13

Die T 0 Pflanze des Klones 99-67-8,1 wurde nicht untersucht, da sie zu klein war. Sie bildete einen Samen. In der daraus resultierenden Pflanze konnte das Transgen nachgewiesen werden. Sie bildete zwölf Samen, so dass zwölf Pflanzen der T 2-Generation analysiert werden konnten. Es ergab sich ein Verhältnis von 9:3 Transgenen zu nicht-transgene Pflanzen, dies entsprach einer 3:1 Segregation. Bei der T 1-Mutterpflanze handelte es sich demnach um eine hemizygote Pflanze. Durch die Analyse der T 3, T 4 und T 5 Nachkommenschaften der Pflanze 99-67-8,1-1-7 konnte ein Homozygotiegrad von 99,16 % festgestellt werden. Es kann also auch hier von einer Linienetablierung ausgegangen werden.

### 3.1.3.3 Transkriptionsanalyse der *Vst1*-Linien

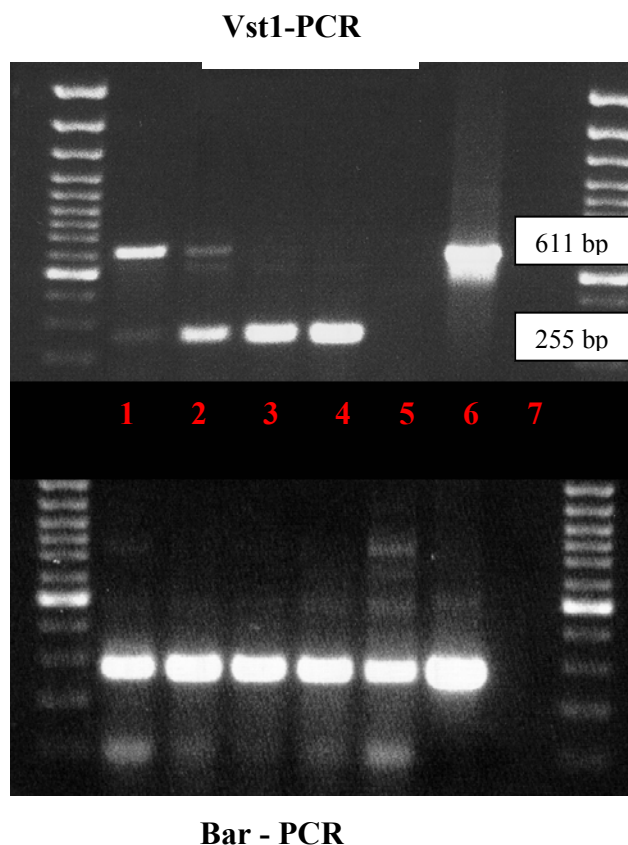
Da das *vst1*-Gen ein Intron enthält, ist die Interpretation der RT-PCR sicherer. Das unter 2.2.2.15 beschriebene Problem der DNA Kontamination stellte sich hier nicht, da bei der RT-PCR zwischen Produkten, die aufgrund von DNA Kontaminationen amplifiziert wurden und Abschriften des Transkripts unterschieden werden konnte. Es wurden Primer für die RT-PCR verwendet, die das Intron flankieren, so ergaben sich für die Produkte eine unterschiedliche Größen (cDNA 255 bp; DNA 611 bp).

Das *vst1*- Gen wurde durch den eigenen wundinduzierbaren Promotor reguliert. Die Pflanzen, aus denen die RNA zum Nachweise der Transkription isoliert wurden, mussten zuvor induziert werden. Dies geschah auf unterschiedliche Weise, z.B. durch Verletzung mit einer Pinzette oder durch UV-Licht.

Um die Effekte der unterschiedlichen Induktionsmethoden zu testen, wurde der folgende Versuch durchgeführt (Abb.3.8):

Die Probe 1 wurde nicht induziert, die Probe 2 wurde mit einer Pinzette verletzt und danach eine Stunde inkubiert, die Probe 3 wurde 5 Minuten mit UV-Licht bestrahlt und danach 1 Stunde inkubiert. Die Probe 4 wurde 5 Minuten mit UV- Licht bestrahlt und danach 2 Stunden inkubiert.

Parallel zur *Vst1*-PCR wurde eine *Bar*-PCR durchgeführt. Das *bar*-Gen wird von dem konstitutiven Nopalinsynthase-Promotor reguliert.



**Tab. 3.14** Probenauftrag der RT-PCR 98-48-8,1 zum Einfluss unterschiedlicher Induktionsmethoden

Nr	Probe	Leaf Paint	PAT Assay
1	98-48-8,2-3-3-17-4	-+	+
2	98-48-8,2-3-3-17-5	-+	+
3	98-48-8,2-3-3-17-6	++	+
4	98-48-8,2-3-3-17-7	-+	+
5	- vst Kontrolle		
6	+ Kontrolle (Plasmid)		
7	- Kontrolle (nicht transgene Kontrollpflanze)		

**Abb. 3.8** Einfluss unterschiedlicher Induktionsmethoden auf die Transkription des *vstI*-Gens (oben) und des *bar*-Gens (unten). RT-PCR von Pflanzen der Linie 98-48-8,2, die unterschiedlich induziert wurden: **1** ohne Induktion; **2** Verletzung mit Pinzette, 1 h Inkubation; **3** 5 min UV-Licht, 1 h Inkubation; **4** 5 min UV Licht, 2 h Inkubation; **5** Kontrollpflanze ohne vst; **6** vst Plasmid; **7** H<sub>2</sub>O.

Es wurden jeweils 5 µg RNA zur cDNA Synthese eingesetzt und gleiche cDNA Mengen zur RT-PCR. Bei der Vst1-PCR (obere Abb. 3.8) nimmt die Menge des Amplifikates von der Probe 1 bis zur Probe 4 kontinuierlich zu. Die unterschiedlichen Induktionsarten und die Inkubationszeit hatten also einen Einfluss auf die Transkriptmenge. Bei der Bar-PCR hingegen sind die Signale sehr homogen (untere Abb. 3.8). Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurde für weitere Untersuchungen eine Induktion der Pflanzen mit UV Licht durchgeführt.

### 3.1.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularen Analyse: Vst1-Linien

Durch die Southern-Blot-Analysen konnten zwei unabhängige Klone identifiziert werden. Die 98-48-8,2 enthielt zwei Kopien der T-DNA, während es sich bei dem Klon 99-67-8,1 um einen „Single-Copy“ Klon handelte. Die Linienetablierung wurde für beide Klone erfolgreich



durchgeführt. Die Transkriptionsanalyse mittels RT-PCR zeigte, dass das *vst1*-Gen bei beiden Linien erfolgreich abgelesen wird. Es wurden also beide Linien für Kreuzungen vorgesehen, wobei 99-67-8,1 als Einzelkopie tragende Linie bevorzugt eingesetzt wurde.

**Tab. 3.15 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekulare Charakterisierung der *Vst1*- Linien**

<b>Linie</b>	<b>Sorte</b>	<b>Kopienzahl</b>	<b>Transkription</b>	<b>Homozygotie- Grad</b>	<b>Generation</b>
98-48-8,2	‘Baccara’	2 Kopien	RT-PCR +	100 %	T 5
99-67-8,1	‘Baroness’	1 Kopie	RT-PCR +	99,16 %	T 4

## 3.2 Funktionale Analyse der Elternlinien

### 3.2.1 Expressionsanalyse des *bar* Gens

Wie unter 2.1.7.3 bereits beschrieben, trugen alle zur Transformation verwendeten Konstrukte das *bar*-Gen als selektives Markergen. Die mittels Leaf-Paint-Test und PAT-Assay erhobenen Expressionsdaten des *bar*-Gens werden im folgenden Kapitel nach Konstrukten gegliedert dargestellt.

#### 3.2.1.1 Leaf-Paint-Test der Erbsenlinien

Bei der Durchführung des Leaf-Paint-Tests (LP) wurden die Blätter von Pflanzen im Gewächshaus mit einer verdünnten BASTA Lösung bestrichen und das jeweils gegenständige Blatt markiert. Die Evaluierung erfolgte ca. eine Woche nach Durchführung des Tests. Bei Welke der Blätter wurde der LP als negativ gewertet und wenn das Herbizid keine sichtbare Wirkung auf das Blatt hatte, wurde dies als positiver LP bonitiert. Blätter mit Blattrandnekrosen wurden als indifferent (+-) eingeordnet und der LP wurde wiederholt (2.2.3.9).

Die Pflanzen die zum Leaf-Paint-Test herangezogen wurden, waren mittels PCR getestet und als transgen eingestuft.

**RiPGIP-Linien****Tab. 3.16 Leaf Paint Ergebnisse der RiPGIP-Linien.**

Parallel zu den Segregationsanalysen der verschiedenen Linien wurden LP-Daten der nachweislich transgenen Pflanzen erhoben. Die Ergebnisse, die in der Tabelle angegeben sind, geben einen Überblick über Expressionstabilität des *bar*-Gens im Laufe der Generationen.

Ergebnisse: ++ positiver LP; +- indifferenten LP, -- negativer LP.

<b>Generation</b>	<b>98-19-1,9 (2 Kopien)</b>	<b>98-52-2,5 (3 Kopien)</b>	<b>98-52-5,4 (2 Kopien)</b>
T 0	+	nicht untersucht	+-
T 1	++	++	--
T 2	++ 13x	++ 18x	++ 1 x +- 7 x -- 5 x
T3	++ 25 x +- 2 x	++ 5 x +- 5 x -- 21 x	++ 5 x +- 12 x -- 14 x
T4	++ 27 x +- 3 x -- 1 x		
T 5	++ 13 x +- 9 x -- 3 x		

Wie die Ergebnisse in der Tabelle 3.16 zeigen, war der Anteil herbizidsensitiver Pflanzen bei den Linien 98-52-2,5 und 98-52-5,4 wesentlich höher als bei der Linie 98-19-1,9. Besonders bei der Linie 98-52-5,4 trat die Instabilität der Expression des *bar*-Gens sehr früh, nämlich schon in der T 1 auf (in der T 0 indifferenten LP). Unter den Pflanzen der Linie 98-19-1,9 hingegen war erst in der T 4-Generation eine deutlich herbizidsensitive Pflanze detektierbar. Dieses Phänomen nahm in den nachfolgenden Nachkommenschaften jedoch zu. Es schien sich dabei nicht um einen irreversiblen Mechanismus zu handeln, da unter den Nachkommen der sensitiven Pflanzen auch wieder BASTA<sup>®</sup> resistente Pflanzen beobachtet wurden.

**Ad PGIP-Linien****Tab. 3.17 Leaf Paint Ergebnisse der Ad PGIP-Linien.**

Parallel zu den Segregationsanalysen der verschiedenen Linien wurden LP-Daten der nachweislich transgenen Pflanzen erhoben. Die Ergebnisse, die in der Tabelle angegeben sind, geben einen Überblick über Expressionstabilität des *bar*-Gens im Laufe der Generationen.

Ergebnisse: ++ positiver LP; +- indifferenter LP, -- negativer LP.

<b>Generation</b>	<b>98-29-1,4-1 (1 Kopie)</b>	<b>99-55-1,2 (1 Kopie)</b>	<b>99-63-38,1 (1 Kopie)</b>
T 0	+	+	nicht untersucht
T 1	++	++	++
T 2	++ 13 x	++ 22 x +- 3 x -- 2 x	++ 6 x +- 5 x -- 10 x
T 3	++ 30 x	++ 5 x +- 5 x	
T 4		++ 1 x +- 1 x -- 12 x	
T 5		++ 2 x +- 24 x -- 19 x	

Die untersuchten Ad PGIP-Linien unterschieden sich sehr stark in der Aktivität des *bar*-Gens. Es gab Linien, die keinerlei Einschränkungen in der Aktivität des *bar*-Gens zeigten (98-29-1,4-1), aber auch Linien, bei denen mehr als ein Drittel der Pflanzen herbizidsensitiv waren (99-63-38,1). Bei den Voruntersuchungen zu dieser Arbeit konnten auch Linien detektiert werden, bei denen das *bar* Gen zu 100 % inaktiv war (Daten nicht gezeigt), dies war jedoch in den meisten Fällen mit einem Transfer von Vektorsequenzen und einer Integration multipler Kopien korreliert. Bei der Linie 99-55-1,2 wurden mit den fortschreitenden Nachkommenschaften immer häufiger herbizidsensitive Pflanzen detektiert. Während in der T 2-Generation noch zwei herbizidsensitive Pflanzen von 27 getesteten Pflanzen beobachtet wurden, zeigten in der T 5-Generation bereits 19 von 45 Pflanzen eine Stilllegung des *bar*-Gens und bei 24 Pflanzen konnte eine instabile Expression des *bar*-Gens beobachtet werden, so dass die Leaf-Paint-Ergebnisse indifferent ausfielen.

## Vst1-Linien

**Tab. 3.18 Leaf Paint Ergebnisse der Vst1-Linien.**

Parallel zu den Segregationsanalysen der verschiedenen Linien wurden LP-Daten der nachweislich transgenen Pflanzen erhoben. Die Ergebnisse, die in der Tabelle angegeben sind, geben einen Überblick über Expressionstabilität des *bar*-Gens im Laufe der Generationen.

Ergebnisse: ++ positiver LP; +- indifferenten LP, -- negativer LP.

<b>Generation</b>	<b>98-48-8,2 (2 Kopien)</b>	<b>99-67-8,1 (1 Kopie)</b>
T 0	++ 1x	nicht untersucht
T 1	++ 1x	+ - 1x
T 2	++ 9x	++ 3x + - 4x -- 2x
T 3	++ 30x + - 3x	++ 0x + - 3x -- 5x
T 4	++ 19x + - 16x -- 4x	++ 0x + - 6x -- 12x
T 5	++ 61x + - 13x -- 4x	++ 1x + - 7x -- 11x

Bei der Linie 98-48-8,2 konnten insgesamt nur wenige herbizidsensitive Pflanzen detektiert werden. Deren Zahl nahm aber auch hier in den nachfolgenden Generationen weiter zu. Die Leaf-Paint-Ergebnisse der Linie 99-67-8,1 waren individuell sehr unterschiedlich und zeigten von der T1-Generation an starke Expressionsinstabilitäten des *bar*-Gens. Deshalb wurde der PAT-Assay als zusätzliche Kontrolle der Expression des Markergens herangezogen.

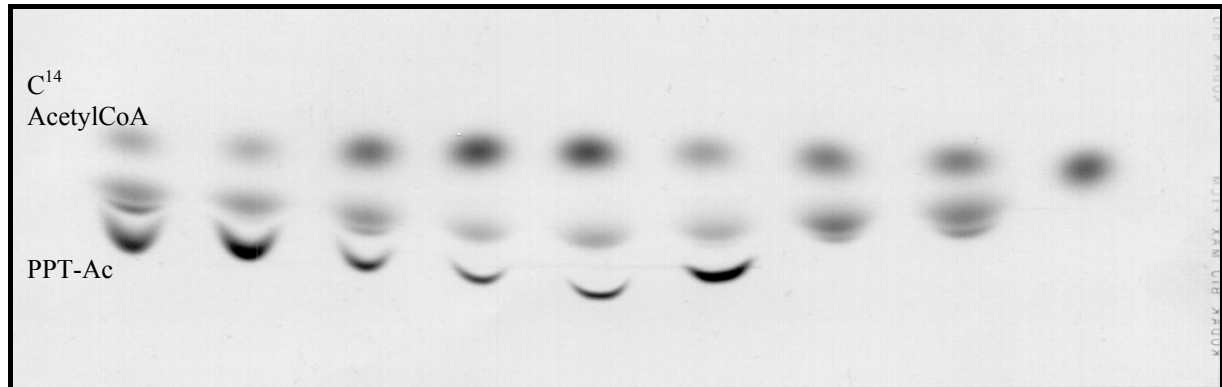
### 3.2.1.2 PAT-Assay der Erbsenlinien

Zur Bestätigung des Leaf-Paint-Tests wurde ein Enzymtest zur Bestimmung der PAT-Aktivität mit anschließender Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Durch die gemeinsame Inkubation des Extraktes einer herbizidresistenten Pflanze, des Herbizides und von  $C^{14}$  markiertem Acetyl CoA, kam es dabei zu einer Acetylierung des Phosphinothricins welches mit einer Einlagerung des  $C^{14}$  einherging. Dieses Umsetzungsprodukt (PPT-Ac) ist nach der Dünnschichtchromatographie als leicht gebogene Bande zu erkennen und kennzeichnet einen positiven PAT-Assay.

Der Gesamtproteingehalt der Proben, die für den PAT-Assay verwendet wurden, wurde mittels Bradford Assay ermittelt und im Einzelfall zur Interpretation des PAT-Assay herangezogen.

Auf den folgenden Abbildungen (3.9 - 3.11) werden die Leaf-Paint-Ergebnisse den Ergebnissen des PAT-Assays gegenübergestellt.

#### Ri PGIP-Linien



	98-19-1,9-5-1-4-2-					98-52-5,4	98-52-5,4	Baroness	$C_{14}$ Acetyl CoA
	3	4	5	6	7	1-8-1	1-12-2		
LP	+	+	+	+	+	+	-	-	
PAT	+	+	+	+	+	+	-	-	-

**Abb. 3.9 PAT Assay von Pflanzen der RiPGIP-Linien.**

Die obere Abbildung zeigt das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie nach dem PAT-Assay. Bei der Umsetzung des Herbizids PPT zeigt sich im unteren Bereich der Platte das acetylierte PPT (PPT-Ac) als leicht gebogene Bande (+). Bei Ausbleiben der Bande ist nicht von einer Umsetzung des PPT auszugehen (-). In der darunter liegenden Tabelle sind die aufgetragenen Proben angegeben und die Ergebnisse des LP- und des PAT-Assays.

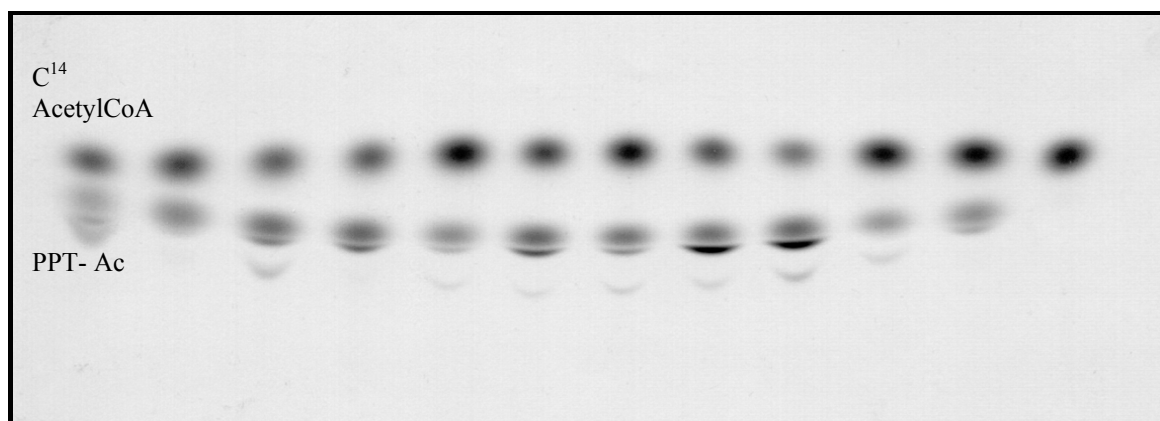
Der enzymatische Nachweis der PAT-Aktivität spiegelte die Ergebnisse des Leaf Paint exakt wieder und erhärtete so die Annahme einer Stilllegung des *bar*-Gens bei einigen Pflanzen der Linie 98-52-5,4. Die Proben der Linie 98-19-1,9 waren durchgängig positiv im LP-Test, dies wurde durch die Ergebnisse des PAT-Assay bestätigt.

### **Ad PGIP-Linien**

Die Pflanzen der *Ad* PGIP-Linien wurden stichprobenartig untersucht, da die Leaf Paint Ergebnisse relativ eindeutig ausfielen. So wurden Pflanzen der Linie 98-29-1,4-1 nicht getestet, da die Leaf-Paint-Ergebnisse durchgängig positiv waren. Die Ergebnisse für die Stichproben einzelner Pflanzen der Linien 99-55-1,2 und 99-63-38,1 entsprachen den Leaf-Paint-Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

### **Vst1-Linien**

#### **98-48-8,2**



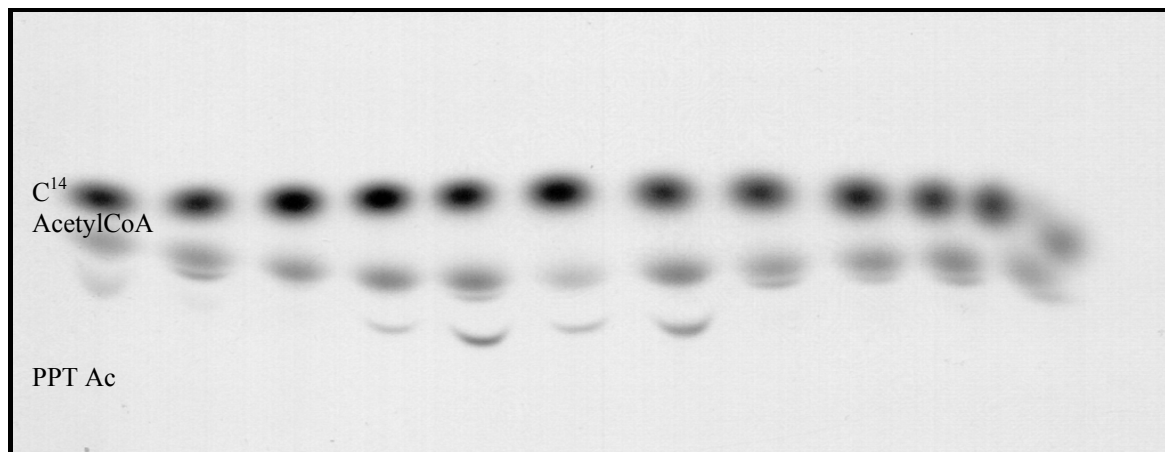
	98-48-8,2-3-3-17										Baccara	Acetyl
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kontrolle	CoA
LP	++	+-	++	+-	+-	++	+-	+-	+	-	-	
PAT	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

**Abb. 3.10 PAT Assay von Pflanzen der Vst1-Linie 98-48-8,2.**

Die obere Abbildung zeigt das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie nach dem PAT-Assay. Bei der Umsetzung des Herbizids PPT zeigte sich im unteren Bereich der Platte das acetylierte PPT (PPT-Ac) als leicht gebogene Bande (+). Bei Ausbleiben der Bande ist nicht von einer Umsetzung des PPT auszugehen (-). In der darunter liegenden Tabelle sind die aufgetragenen Proben angegeben und die Ergebnisse des LP und des PAT Assays.

Die Ergebnisse für die Pflanzen der Linie 98-48-8,2 bestätigten in den meisten Fällen (neun von zehn) die Leaf-Paint-Ergebnisse. Wobei die Ergebnisse des PAT-Assay bei indifferentem Leaf Paint (+-) z.T. positiv, z.T. negativ ausfielen. Hierbei könnte es sich um eine dosisabhängige Wirkung der PAT handeln, die von dem jeweiligen physiologischen Zustand des untersuchten Blattes und der entsprechenden Pflanze abhängig ist. Damit ist auch das Ergebnis der Probe Nr. 10 interpretierbar, welche im Leaf-Paint-Assay negativ getestet wurde, im PAT-Assay jedoch eine schwache Bande PPT-Ac zeigte.

### 99-67-8,1



	99-67-8,1-1-4-										Baccara	Acetyl
	1	2	4	5	6	7	8	1-7-2-1	1-7-7-1	1-7-7-3	Kontrolle	CoA
LP	+-	--	--	+	+	+-	+	-	-	-		
PAT	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-

**Abb. 3.11 PAT Assay von Pflanzen der Vst1-Linie 99-67-8,1.**

Die obere Abbildung zeigt das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie nach dem PAT-Assay. Bei der Umsetzung des Herbizids PPT zeigte sich im unteren Bereich der Platte das acetylierte PPT (PPT-Ac) als leicht gebogene Bande (+). Bei Ausbleiben der Bande ist nicht von einer Umsetzung des PPT auszugehen (-). In der darunter liegenden Tabelle sind die aufgetragenen Proben angegeben und die Ergebnisse des LP und des PAT Assays.

Mit dem PAT-Assay konnten die LP-Ergebnisse bestätigt werden, die Umsetzung des Acetyl CoA war jedoch wesentlich geringer als bei anderen Linien. Dementsprechend fielen die Banden für das PPT-Ac durchgängig sehr schwach aus. Bei einigen Pflanzen (99-67-8,1-1-7-2-1; 1-7-7-1;-1-7-7-3) fand keine Umsetzung statt, dies korrelierte mit negativen LP-Ergebnissen. Die aufgetragenen Proteinmengen lagen mit 20-25 µg im Rahmen der anderen PAT Assays, hier ist die Ursache für die schwächere Umsetzung also nicht zu suchen.

### 3.2.2 Expressionsanalyse des *pgip*-Gens mittels

#### Polygalakturonase-Inhibierungstests

Als funktioneller Test zum Nachweis der rekombinanten Polygalakturonase-inhibierenden Proteine aus Himbeere und Kiwi wurde ein PG Inhibierungstest (TAYLOR UND SECOR, 1988) durchgeführt. Dazu wurden Rohextrakte der transgenen Pflanzen und der entsprechenden nicht transgenen Kontrollpflanzen hergestellt und ihr Effekt auf verschiedene pilzliche Polygalakturonasen untersucht (Material und Methoden 2.2.3.1 bis 2.2.3.5)

#### 98-19-1,9 (*RiPGIP*, zwei Kopien)

Um die PGIP Expression innerhalb einer Linie zu testen, wurden Rohextrakte von Blättern und Wurzeln 8 verschiedener Individualpflanzen der T 5-Generation extrahiert. Es wurden jeweils 2000 ng Gesamtprotein zum PG Inhibierungstest eingesetzt. Die Rohextrakte wurden gegen Polygalakturonasen aus *Colletotrichum acutatum* und aus *Aphanomyces euteiches* getestet. In den mit **PG** gekennzeichneten Vertiefungen befinden sich jeweils die Polygalakturonasen ohne Zusatz von pflanzlichen Rohextrakten und in den mit **Kon** gekennzeichneten Vertiefungen, befinden sich die Rohextrakte von Kontrollpflanzen (nicht transgen) mit den entsprechenden Polygalakturonasen. Die zu testenden Extrakte der transgenen Pflanzen befinden sich in den nicht beschrifteten Vertiefungen.

#### PG *Colletotrichum acutatum*

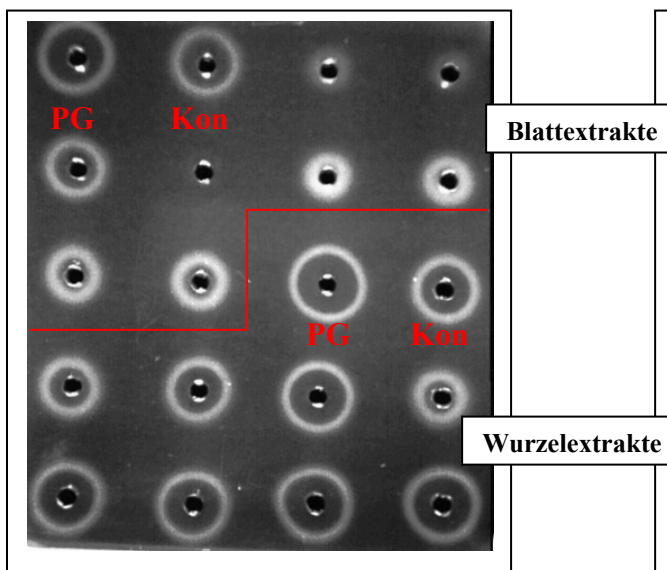


Abb. 3.12 PG Inhibierungstests

PG *Colletotrichum*

#### PG *Aphanomyces euteiches*

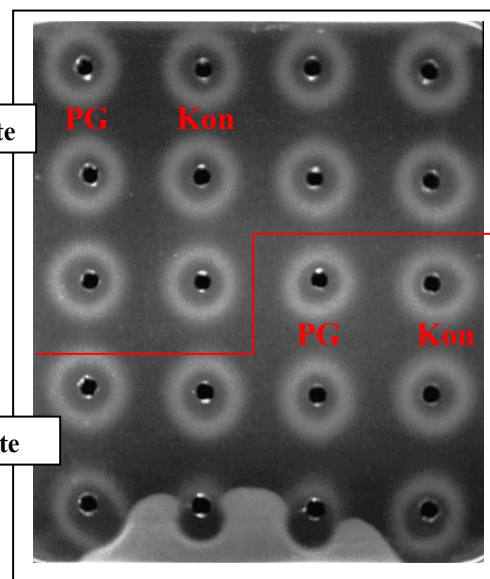


Abb. 3.13 PG Inhibierungstest

PG *Aphanomyces euteiches*

Ergebnisse der Agarose-Diffusionstest mit Polygalakturonasen aus *Colletotrichum* und *Aphanomyces*.



In der Abbildung 3.12 ist erkennbar, dass die Rohextrakte der Individualpflanzen einer Linie unterschiedlich starke Effekte auf die Polygalakturonase von *Colletotrichum acutatum* hatten. Dies gilt sowohl für die Blattextrakte als auch für die Rohextrakte aus den Wurzeln der Pflanzen. Zudem ist erkennbar, dass die Rohextrakte der Wurzeln generell eine geringere inhibierende Wirkung auf die Polygalakturonasen zeigten. Während die Inhibierungsaktivität der Blattextrakte auf *Colletotrichum acutatum* bei durchschnittlich 63,2 % lag, war die Inhibierungsleistung der Wurzelextrakte mit 10,2 % deutlich geringer.

Dieselben Blatt- und Wurzelextrakte zeigten im Test mit Polygalakturonasen, die aus *Aphanomyces euteiches* gewonnen wurden, keinen Effekt im Vergleich zur Kontrollpflanze (Abb. 3.13).

Anschließend wurde der Effekt der Blattextrakte dreier Individualpflanzen (A, B, C) einer homozygoten Nachkommenschaft (T 5) der Linie 98-19-1,9 auf drei verschiedene pilzliche Polygalakturonasen getestet.

Die Ergebnisse der Versuche mit den Polygalakturonasen von *Botrytis cinerea*, *Stenocarpella maydis* und *Colletotrichum acutatum* werden in der Tabelle 3.19 dargestellt.

**Tab. 3.19 PG Inhibierungstest der Blattextrakte dreier Individualpflanzen des Klones 98-19-1,9 gegenüber PG *Botrytis*; PG *Stenocarpella*; PG *Colletotrichum***

	PG Botrytis		PG Stenocarpella		PG Colletotrichum	
	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
98-19-1,9-A	2000	0 %	2000	0 %	2000	0 %
	200	0 %	200	0 %	200	0 %
	50	0 %	50	0 %	50	0 %
98-19-1,9-B	2000	100 %	2000	80 %	2000	43 %
			1000	76,7 %	1000	29 %
98-19-1,9-C	2000	100 %	2000	100 %	2000	100 %
			1000	100 %	1000	100 %
			500	100 %	500	100 %

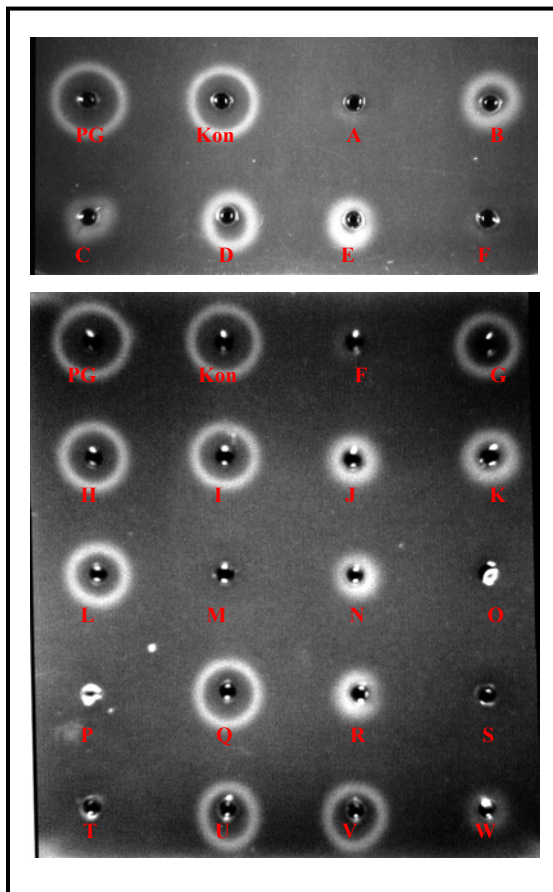
Die Ergebnisse für die drei Pflanzen fielen sehr unterschiedlich aus. Während der Extrakt aus Pflanze A keine Hemmung auf die drei getesteten Polygalakturonasen zeigte, wurden durch den Extrakt der Pflanze C alle drei PGs zu 100 % in ihrer Aktivität gehemmt und das auch noch bei einer auf 500 ng reduzierten Proteinmenge. Die Ergebnisse für den Extrakt der

Pflanze B lagen dazwischen, die PGs von *Botrytis* wurden bei 2000 ng zu 100 % inhibiert, während *Stenocarpella* und *Colletotrichum* zu 80 % bzw. 43 % gehemmt wurden.

### PGIP Assay mit Blattextrakten von 23 Individualpflanzen

Um die zuvor gezeigten Ergebnisse zu erhärten, wurden 23 Individualpflanzen einer Nachkommenschaft von 98-19-1,9 (T 7) zum PG Inhibierungstest herangezogen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Aussaat auf ihre Inhibierungsaktivität hin untersucht. Es wurden jeweils 2000 ng des Rohextraktes eingesetzt.

#### 6 Wochen nach Aussaat



#### 10 Wochen nach Aussaat

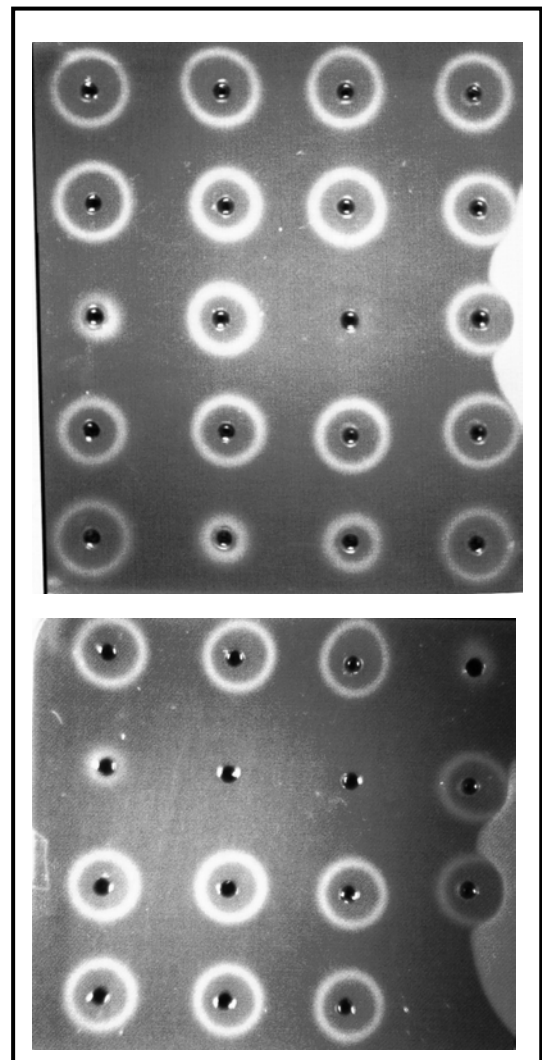
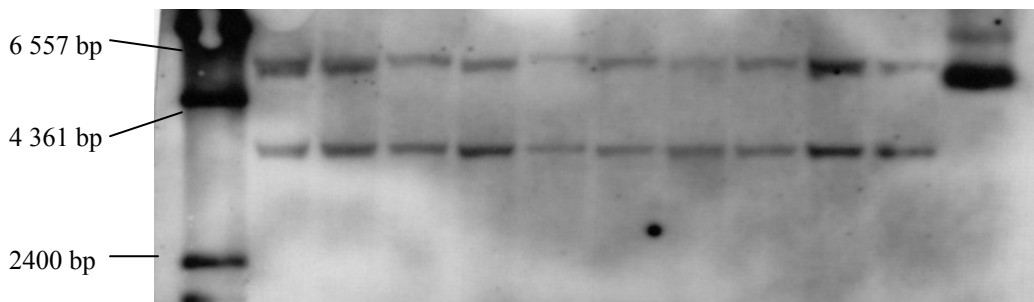


Abb. 3.14 und 3.15 PG-Inhibierungstest von Individualpflanzen A bis W der Linie 98-19-1,9 gegenüber PG *Colletotrichum acutatum*. Die Entnahme der Blätter und die Extraktion fand 6 Wochen (Abb. 3.14) und 8 Wochen (Abb. 3.15) nach Aussaat statt. PG= nur pilzliche PGs; Kon= PG mit Extrakt nicht-transgener Kontrollpflanzen; A-W= PG mit Blattextrakten der Linie 98-19-1,9.

Die Abbildungen 3.14 und 3.15 zeigen den Effekt der Blattextrakte auf die Polygalakturonase von *Colletotrichum acutatum*. Auch bei diesem PG Inhibierungstest ist die Varianz der Individualpflanzen einer Linie deutlich an der unterschiedlichen Größe der Höfe erkennbar. Zudem zeigen die Blattextrakte mit zunehmendem Alter der Pflanzen eine geringere Inhibierungsaktivität. Da es sich um Individualpflanzen einer Linie handelte wurde vorausgesetzt, dass die genetische Ausstattung in Bezug auf das Transgen identisch ist. Um diese Voraussetzung zu überprüfen wurde von zehn (A bis J) der oben gezeigten 23 Pflanzen eine DNA-Isolierung und eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 3.16). Die Analyse wies erwartungsgemäß für alle 10 getesteten Pflanzen das gleiche Integrationsmuster auf, welches mit dem Charakterisierungsergebnis der Linie 98-19-1,9 (3.1.1.2) übereinstimmte.



**Abb. 3.16 Southern-Blot-Analyse der Individualpflanzen A bis J der Linie 98-19-1,9.**

Der Restriktionsverdau wurde mit Xba I durchgeführt, es wurden zwei *Ri* PGIP Sonden zur Detektion verwendet.

Wie unter 2.2.3.4 beschrieben lässt sich anhand der Größe der Höfe um die Vertiefungen in den Agaroseplatten, die inhibitorische Wirkung der Pflanzenextrakte auf die Polygalakturonasen im Vergleich zur Kontrollpflanze prozentual berechnen. Diese Berechnung wurde für die in Abb. 3.14 und 3.15 gezeigten Proben vorgenommen und in den Abb. 3.17 und 3.18 graphisch dargestellt.

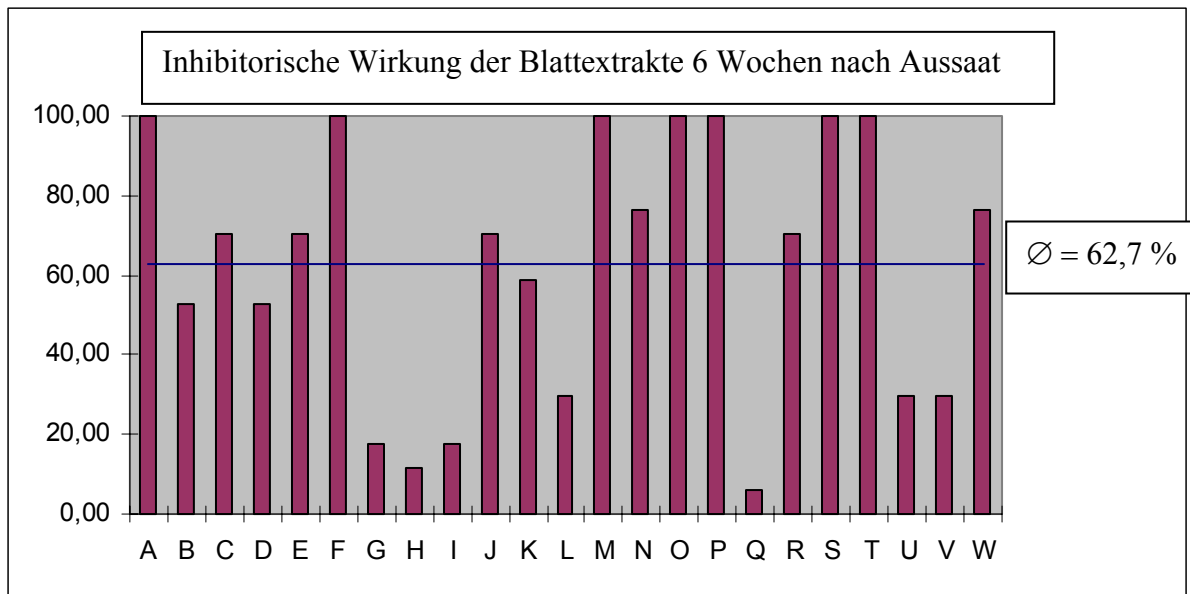


Abb. 3.17 Inhibierungsaktivität der Individualpflanzen 98-19-1,9 A bis W; 6 Wochen nach Aussaat

Wie der Graphik 3.17 zu entnehmen ist, lag die durchschnittliche Inhibierungsaktivität der Nachkommenschaft bei 62,7 %. Die Ergebnisse der Einzelpflanzen zeigten jedoch eine sehr hohe Varianz und lagen in einem Bereich von 5,8 % (Q) bis zu 100 % Inhibierung (A, F, M, O, P, S, T).

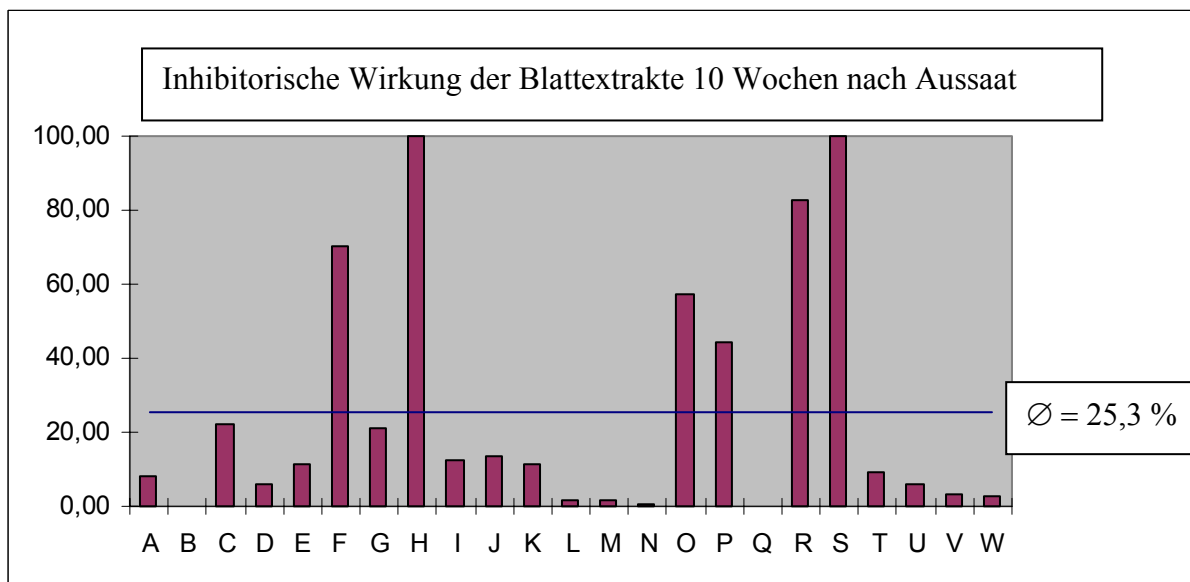


Abb. 3.18 Inhibierungsaktivität der Individualpflanzen 98-19-1,9 A bis W; 10 Wochen nach Aussaat

Vier Wochen nach der ersten Untersuchung wurden Rohextrakte derselben Pflanzen (A bis W) hergestellt um ihre inhibitorische Wirkung erneut zu testen. Wie schon auf Abb. 3.15 sichtbar, zeigte sich ein deutlich verändertes Bild. Die durchschnittliche Inhibierungsaktivität

in der Nachkommenschaft war mit 25,3 % im Vergleich zum ersten Termin (62,7 %) deutlich reduziert (Abb. 3.18).

Bei den 23 untersuchten Pflanzen war die Inhibierungsaktivität von 17 Pflanzen zehn Wochen nach Aussaat deutlich reduziert im Vergleich zur ersten Untersuchung (sechs Wochen nach Aussaat). Bei fünf Pflanzen verschob sich die Inhibierungsaktivität nur um etwa 10 %, was als natürliche Streuung akzeptiert, da Vorversuche ergaben, dass auch Kontrollpflanzen eine Inhibierungsaktivität bis zu 10 % aufwiesen. Lediglich bei einer Pflanze (H) konnte eine deutliche Zunahme der Aktivität von 11,8 % auf 100 % verzeichnet werden.

Es kann also generell von einem Verlust der Inhibierungsaktivität mit zunehmender Entwicklungsdauer der Pflanzen ausgegangen werden.

Parallel zur Ernte der Pflanzen, zwölf Wochen nach Aussaat, wurden Rohextrakte der Wurzeln hergestellt und auf ihre Inhibierungsaktivität hin untersucht. Hierbei lag die durchschnittliche Inhibierungsaktivität bei 12,7 % (Standardabw. 8,8). Auch dieses Ergebnis bestätigte die bereits in Abb.3.12 gezeigten Ergebnisse. Die Wurzeln zeigten im Vergleich zu den Blättern eine wesentlich geringere Inhibierungsaktivität.

#### **PG Inhibierungstest – 98-52-2,5 (Ri PGIP, drei Kopien)**

Von der Linie 98-52-2,5 wurden acht Individualpflanzen im Hinblick auf ihre Wirkung gegenüber der Polygalakturonase aus *Colletotrichum acutatum* untersucht, keiner der Extrakte zeigte einen Effekt im Vergleich zur Kontrollpflanze.

#### **PG Inhibierungstest – 98-52-5,4 (Ri PGIP, zwei Kopien)**

Es wurden zwei Individualpflanzen der Linie 98-52-5,4 mittels PG Inhibierungstest untersucht. Getestet wurde der Effekt auf Polygalakturonasen von *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* und *Stenocarpella maydis*. Die Extrakte zeigten für keine dieser Polygalakturonasen eine inhibitorische Aktivität.

## PG Inhibierungstest – *Ad* PGIP-Linien

**Tab. 3.20 PG Inhibierungstest *Ad* PGIP-Linien PG *Botrytis*; PG *Stenocarpella*; PG *Colletotrichum***

Blattextrakte verschiedener Pflanzen der *Ad* PGIP Linien wurden mit unterschiedlichen Gesamtproteingehalten auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber oben genannten Polygalakturonasen getestet.

Pflanze	PG <i>Botrytis</i>		PG <i>Stenocarpella</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
98-29-1,4-1-1-1 (eine Kopie)	2000	0 %	2000	0 %	2000	0 %
	200	0 %	200	0 %	200	0 %
	50	0 %	50	0 %	50	0 %
98-29-1,4-1-1-2-7 (eine Kopie)	2000	0 %	2000	0 %	2000	0 %
	200	0 %				
99-55-1,2-3-20-2-4 (eine Kopie)	2000	0 %	2000	0 %	2000	0 %
	200	0 %	200	0 %	1000	0 %
	50	0 %	50	0 %	500	0 %
99-63-38,1-2 (eine Kopie)	2000	0 %	2000	0 %	2000	0 %
	200	0 %				

Es wurden Extrakte von drei verschiedenen transgenen Linien mit dem *Ad* PGIP auf Effekte gegenüber pilzlichen Polygalakturonasen getestet. Keiner der Blattextrakte zeigte eine hemmende Wirkung auf die getesteten PGs.

### 3.2.3 Expressionsanalyse des *vst1*-Gens mittels HPLC

Zum Nachweis der Expression der Stilbensynthese und der daraus resultierenden Bildung von Resveratrol wurden einige Pflanzen beider transgener Linien induziert, Extrakte erstellt und mittels HPLC Analyse auf ihren Resveratrolgehalt hin untersucht.

Die Induktion der Pflanzen fand durch 5-minütige UV Bestrahlung statt. Um die Entwicklung der Resveratrolproduktion zu verfolgen, wurde zunächst eine Kinetik gestartet, bei der die Pflanzen unterschiedlich lange Zeit nach der fünfminütigen UV-Bestrahlung inkubiert wurden, um die Resveratrolsynthese stattfinden zu lassen. Dazu wurde je Linie eine Pflanze

eine Pflanze direkt nach der Induktion extrahiert und die übrigen Pflanzen wurden nach der Induktion 1 Stunde, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden inkubiert bevor sie extrahiert wurden.

### Kinetik der Linie 98-48-8,2

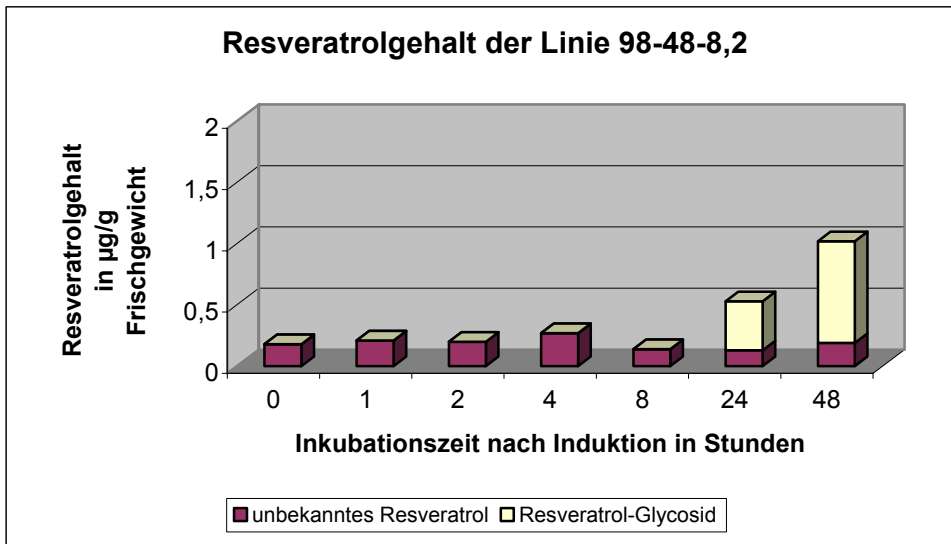


Abb. 3.19 Ermittelte Resveratrolgehalte für Individualpflanzen der Linie 98-48-8,2 nach Durchführung einer Kinetik. Die einzelnen Proben wurden mit UV Licht induziert, von 0 bis 48 Stunden inkubiert und anschließend extrahiert.

### Kinetik der Linie 99-67-8,1

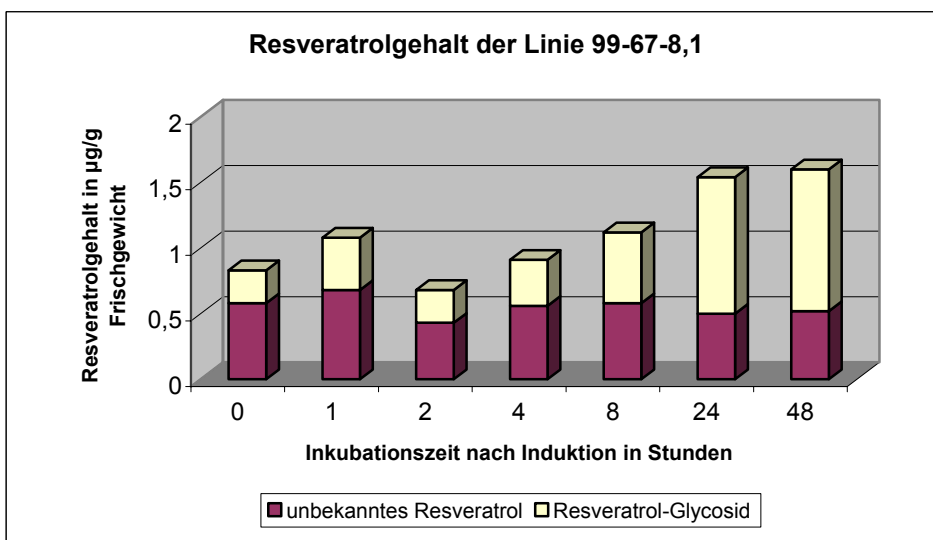


Abb. 3.20 Ermittelte Resveratrolgehalte für Individualpflanzen der Linie 99-67-8,1 nach Durchführung einer Kinetik. Die einzelnen Proben wurden mit UV Licht induziert, anschließend von 0 bis 48 Stunden inkubiert und extrahiert.

Die HPLC Analyse der Extrakte ergab, dass das Resveratrol in den Erbsenpflanzen nicht frei vorliegt, sondern in den Pflanzen beider Linien als Resveratrol-Glycosid.

Ausserdem setzte sich das Resveratrol aus zwei Fraktionen mit unterschiedlichen Retentionszeiten zusammen. Eine Fraktion konnte bereits in transgenen Äpfeln mit dem Vst1-Konstrukt nachgewiesen werden (SZANKOWSKI 2003). Diese Fraktion stieg mit zunehmender Inkubationszeit nach der Induktion an (Abb. 3.19 und 3.20). Zusätzlich konnte in den transgenen Erbsen ein weiteres Resveratrol Derivat detektiert werden, was bisher nicht näher charakterisiert wurde. Wie in den Abbildungen 3.19 und 3.20 erkennbar ist, wird es in den Pflanzen der Linie 98-48-8,2 schwächer exprimiert (0,13 bis 0,27 µg/g), als in den Pflanzen der Linie 99-67-8,1 (0,50 bis 0,68 µg/g). In den Abbildungen ist erkennbar, dass die Induktion und die Dauer der Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Bildung des unbekanntes Resveratrolderivates hatte. Die ermittelten Werte für die einzelnen Proben sind der Tabelle 3.21 zu entnehmen.

**Tab. 3.21 Resveratrolgehalte, die mittels HPLC in Pflanzen der Linien 98-48-8,2 und 99-67-8,1 detektiert wurden.** Die Extraktion der Pflanzen erfolgte direkt nach der Induktion (0 h) und nach 1, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden Inkubationszeit.

Inkubationszeit	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Resveratrol-Glycosid 98-48-8,2	-	-	-	-	-	0,40 µg/g	0,83 µg/g
Resveratrolderivat 98-48-8,2	0,18 µg/g	0,21 µg/g	0,20 µg/g	0,27 µg/g	0,14 µg/g	0,13 µg/g	0,19 µg/g
Resveratrol-Glycosid 99-67-8,1	0,25 µg/g	0,40 µg/g	0,25 µg/g	0,35 µg/g	0,54 µg/g	1,04 µg/g	1,08 µg/g
Resveratrolderivat 98-67-8,1	0,58 µg/g	0,68 µg/g	0,43 µg/g	0,56 µg/g	0,58 µg/g	0,50 µg/g	0,52 µg/g

### 98-48-8,2

Für die Proben der Linie 98-48-8,2 ergaben sich direkt nach Induktion (0) und 1, 2, 4 und 8 Stunden nach Induktion Werte um 0,20 µg Gesamt-Resveratrol pro g Frischgewicht. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit der induzierten Blätter stieg der Gehalt an Resveratrol auf 0,53 µg pro g Frischgewicht an. Durch Verdoppelung der Inkubationszeit auf 48 Stunden konnte auch eine Verdoppelung des Resveratrolgehaltes auf 1,02 µg pro g Frischgewicht



erreicht werden. Dieser Anstieg resultierte aus der Bildung des bereits bekannten Resveratrol-Glycosids, das 24 Stunden nach Induktion erstmals in den Pflanzen nachgewiesen werden konnte (0,40 µg/g). 48 Stunden nach Induktion war der Gehalt des Resveratrols in den Pflanzen verdoppelt. Zusätzlich zu den Ergebnissen der Kinetik, wurden einige Ergebnisse von Einzelproben gewonnen. Die Proben wurden 24 Stunden nach der Induktion extrahiert. Für die Linie 98-48-8,2 ergaben sich 1,42 und 3,32 µg Gesamt-Resveratrol pro g Frischgewicht.

### **99-67-8,1**

Bei den Pflanzen der Linie 99-67-8,1 ergab sich ein etwas anderes Bild (Abb. 3.20). Bei den Pflanzen ohne Induktion und bis zu 8 Stunden Inkubationszeit nach Induktion wurden Werte von 0,68 bis 1,13 µg Resveratrol pro g Frischgewicht gemessen. Vergleichbare Werte wurden bei der Linie 98-48-8,2 erst nach 48-stündiger Inkubationszeit erreicht (Abb. 3.19). Der verstärkende Effekt durch die Inkubation nach Induktion äußerte sich bei dieser Linie nicht so stark. Der Resveratrolwert stieg nach 24-stündiger Inkubationszeit auf 1,54 µg Resveratrol pro g Frischgewicht an, was einer Steigerung um 36 % im Vergleich zur 8 h Probe (1,13µg) entspricht (Tab. 3.21). Die erweiterte Inkubationszeit auf 48 h ergab lediglich eine Erhöhung des Wertes auf 1,60 µg pro g Frischgewicht.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Expressionsrate des *vst1*-Gens in der Linie 99-67-8,1 generell höher lag als die Expression der Linie 98-48-8,2. Dafür sprechen auch einige Ergebnisse, die zusätzlich zu den Ergebnissen der Kinetik, durch einige Einzelproben gewonnen wurden. Die Proben wurden 24 Stunden nach der Induktion extrahiert. Für die Linie 99-67-8,1 ergaben sich Werte von 2,19; 5,21; 3,56 und 5,09 µg Gesamt-Resveratrol pro g Frischgewicht. Auch hier war eine hohe Varianz der Einzelwerte zu verzeichnen, die eventuell einen Hinweis auf eine unterschiedliche Expression in Einzelpflanzen geben könnte. Um dies näher zu untersuchen, müssten jedoch eingehende Analysen durchgeführt werden.

### 3.3 Resistenztestung der Elternlinien

Die Resistenztestung der Pflanzen wurde am Institut für Landwirtschaft in Cordoba, Spanien von Herrn Dr. Diego Rubiales durchgeführt. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Rubiales für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Tests wurden mit den Pathogenen *Erysiphe graminis* und *Uromyces pisi* durchgeführt. Die Prozentzahlen bezeichnen den Anteil der sporenbildenden Einheiten (SF in %) auf den Blättern. Es wurde jeweils 20 Pflanzen in 5 Wiederholungen ausgezählt. Die Ergebnisse werden in den Tabellen 3.22 bis 3.24 jeweils im Vergleich zur nicht transgenen Kontrollpflanze dargestellt.

#### 3.3.1 Resistenztestung der *Ri* PGIP-Linien

Tab. 3.22 Resistenztestung der *Ri*PGIP Linie 98-19-1,9 mit *Erysiphe graminis* und *Uromyces pisi*

	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe pisi</i> )	Rost ( <i>Uromyces pisi</i> )
‘Baroness’ nicht transgen	75 %	3,5 %
98-19-1,9-5-1-4-3 22 Pflanzen	63,61 %	1,86 %
98-19-1,9-5-1-4-6 29 Pflanzen	68,13 %	2,87 %

Die Ergebnisse der Resistenztests zeigen, dass die transgenen Pflanzen der Linie 98-19-1,9 tendenziell einen geringeren Befallsgrad aufwiesen, als die Kontrollpflanzen. Bei den Tests mit *Uromyces pisi* konnte der Befall sogar von 3,5 % auf 1,86 % bzw. 2,87 % reduziert werden. Dies ließ sich statistisch jedoch nicht absichern, da der Stichprobenumfang zu gering und die Varianz der Einzelpflanzen zu hoch waren.

### 3.3.2 Resistenztestung der *Ad* PGIP-Linien

Tab. 3.23 Resistenztestung der *Ad* PGIP-Linien 98-29-1,4-1 und 99-55-1,2 mit *Erysiphe graminis* und *Uromyces pisi*

	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe pisi</i> )	Rost ( <i>Uromyces pisi</i> )
‘Baccara’ nicht transgen	78,35 %	1,95 %
98-29-1,4-1-1-3 und 6 19 Pflanzen	80 %	11,25 %
‘Baroness’ nicht transgen	75 %	3,5 %
99-55-1,2-3-20-6 und 8 22 Pflanzen	72,19 %	7,43 %

Die Resistenztests der *Ad*PGIP-Linien lieferten sehr überraschende Ergebnisse. Gegenüber Echtem Mehltau zeigten die transgenen Pflanzen keine deutlich anderen Reaktionen als die Kontrollpflanzen. Die Pflanzen der Linien 98-29-1,4-1 zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine leicht erhöhte Anfälligkeit, während die Pflanzen der Linie 99-55-1,2 eine leicht geringere Anfälligkeit zeigten. Beide Unterschiede ließen sich statistisch nicht absichern.

Bei den Resistenztests mit *Uromyces pisi* hingegen zeigten alle transgenen Pflanzen eine deutlich höhere Anfälligkeit als die nicht transgenen Kontrollpflanzen. Bei der Linie 99-55-1,2 war die Anfälligkeit etwa doppelt so hoch wie die der Kontrolle. Bei der Linie 98-29-1,4-1 war der Befall mit Rostpilzen sogar sechs mal höher als bei den nicht transgenen Kontrollen, dies konnte statistisch auch abgesichert werden (Test nach Dunnett  $p < 0,05$ ).

Die höhere Anfälligkeit der Pflanzen durch die rekombinanten PGIPs, könnte eventuell auf die Stilllegung endogener PGIPs zurückzuführen sein und wird noch diskutiert.

### 3.3.3 Resistenztestung der Vst1-Linien

Tab. 3.24 Resistenztestung der *vst*-Linien 98-48-8,2 und 99-67-8,1 mit *Erysiphe graminis* und *Uromyces pisi*

	Echter Mehltau ( <i>Erysiphe pisi</i> )	Rost ( <i>Uromyces pisi</i> )
‘Baccara’ nicht transgen	78,35 %	1,95 %
98-48-8,2	77,14%	5,17 %
‘Baroness’ nicht transgen	75 %	3,5 %
99-67-8,1	70 %	3,0 %

Die Resistenztestung der Pflanzen der Linie 98-48-8,2 ergab für Echten Mehltau einen sehr geringen Unterschied zwischen den transgenen Pflanzen und den nicht transgenen Kontrollpflanzen von 77,14 % zu 78,35 %. Dies lag im Bereich der normalen Streuung. Das *vst1*-Gen zeigte in dieser Linie also keinen Effekt auf die Reaktion gegenüber Mehltau. Die Anfälligkeit für Rost wurde durch die Integration des *vst1*-Gens in der Linie 98-48-8,2 mit Werten von 1,95 % bei den Kontrollpflanzen auf 5,17 % bei den transgenen Pflanzen mehr als verdoppelt.

Die Linie 99-67-8,1 zeigte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen eine leicht reduzierte Anfälligkeit gegenüber Mehltau und Rost.

### 3.4 Auswahl der Elternlinien

Aus dem Bestand der zuvor molekular und funktional charakterisierten Linien wurden nun die Kreuzungseltern ausgewählt. Sie sollten folgende Kriterien erfüllen:

- keine Integration von Vektorsequenzen über die T-DNA hinaus
- Integration möglichst weniger Kopien der T-DNA, im Idealfall einer Kopie
- die Expression des antifungalen Gens sollte nachgewiesen sein
- es sollte sich um eine etablierte homozygote Linie handeln
- im Idealfall sollten Resistenzdaten erhoben worden sein

In der Tabelle 3.25 werden alle als Kreuzungseltern verwendeten Linien und die Ergebnisse der Charakterisierung aufgeführt.

**Tab. 3.25 Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularen und funktionalen Charakterisierung der potentiellen Kreuzungseltern.**

<b>Linie</b>	<b>Sorte</b>	<b>GOI</b>	<b>Kopien- zahl</b>	<b>Expression des GOI</b>	<b>Homozygotie- Grad</b>	<b>Resistenzdaten</b>
98-19-1,9	Baroness	Ri PGIP	2 Kopien	RNA + PGIP Assay +	T 4 / 99,97 %	leichte Hemmung von Mehltau und Rost
99-55-1,2	Baroness	AdPGIP	1 Kopie	RNA + PGIP Assay -	T 5 / 99,99 %	keinen Effekt auf Mehltau, größere Anfälligkeit gegenüber Rost
99-67-8,1	Baroness	Vst	1 Kopie	RNA + HPLC +	T 5 / 99,16 %	leichte Hemmung von Mehltau und Rost

Unter Berücksichtigung aller erhobenen Daten konnten lediglich die Linien 98-19-1,9 und 99-67-8,1 als aussichtsreiche Kreuzungseltern bezeichnet werden. Da die Werte für die Linie 99-55-1,2 jedoch ebenfalls sehr interessant erschienen, wurde ein geringerer Anteil der Kreuzungen auch mit diesen Linien als Kreuzungseltern durchgeführt.

Der Hauptanteil der Kreuzungen lag jedoch bei der Kombination von Pflanzen der Linien 98-19-1,9 und 99-67-8,1.

## 3.5 Molekulare Analyse der Hybriden und deren Nachkommenschaften

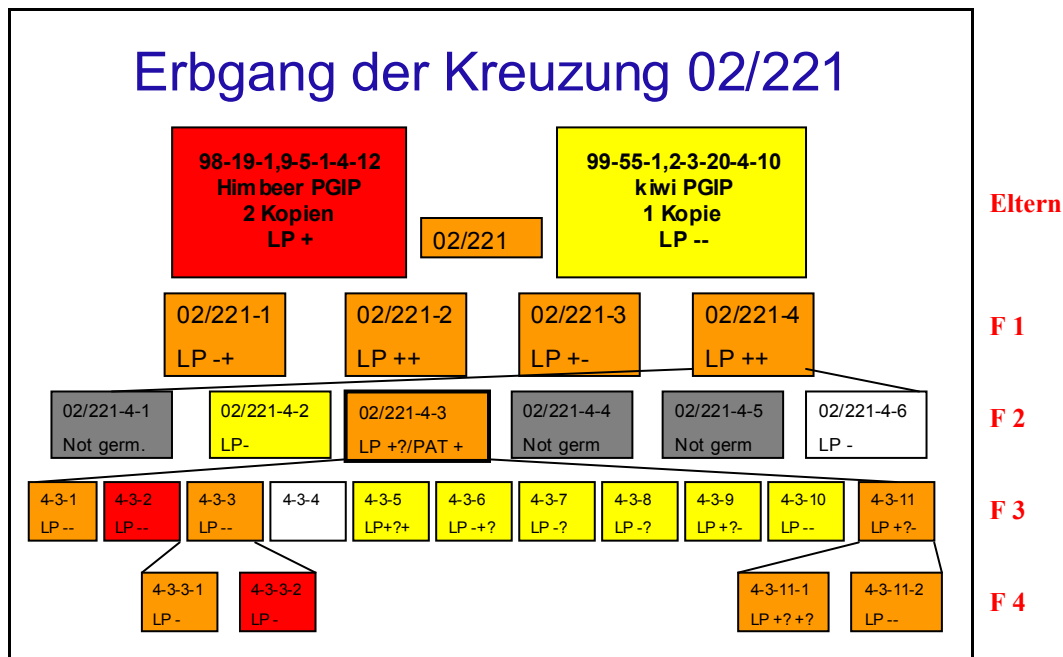
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die zuvor charakterisierten transgenen Erbsen miteinander gekreuzt, um durch Kombination verschiedener antifungaler Konstrukte eine erhöhte Pilzresistenz gegen ein möglichst breites Spektrum an Pilzen zu erlangen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse der Hybridpflanzen in Form von Organigrammen dargestellt. Die Kreuzungseltern werden dabei ganz oben in der Abbildung aufgeführt, die linke Pflanze ist jeweils die Empfängerpflanze, die rechte Pflanze ist die Spender Pflanze und die untersuchten Nachkommenschaften darunter. Die Farben geben dabei die Integration der jeweiligen antifungalen Gene wieder. Wenn es sich um Pflanzen handelt die nur eins der beiden Gene integriert hatten, haben sie die Farbe der entsprechenden Elternlinie. Bei Integration beider GOIs erhalten die entsprechenden Kästchen eine Mischfarbe aus beiden Eltern. Zusätzlich sind in den Kästen die Ergebnisse der Leaf-Paint-Assays aufgeführt. Weiße Kästchen stellen nicht transgene Pflanzen dar, also Pflanzen in denen keines der beiden Transgene nachgewiesen werden konnte. Grau unterlegte Kästchen stehen für nicht gekeimte Pflanzen.

### 3.5.1 Kombination von *Ri* PGIP und *Ad* PGIP

Durch die Kombination zweier *pgip*-Gene könnte eine Erweiterung des Wirkspektrums auf Pilze erreicht werden. Zudem könnte die Kombination ein interessantes Objekt für die Analyse von Gene Silencing-Mechanismen sein. Aufgrund der Homologie der *pgip*-Gene untereinander, und auch zum endogenen Erbsen *pgip*-Gen könnten die entsprechenden Mechanismen forciert werden. Hinzu kommt, dass beide Pflanzen vom 35S Promotor reguliert werden. Im Hinblick darauf wurden Pflanzen der *Ri*PGIP-Linien mit *Ad*PGIP-Pflanzen gekreuzt und die resultierenden Hybriden mittels PCR, Leaf-Paint-Assay und PGIP Assay analysiert.

Es werden die Kreuzungen 02/221, 02/234 und 02/425 dargestellt. Es handelt sich bei allen Hybridpflanzen um Kreuzungen der Linien 98-19-1,9 und 99-55-1,2.



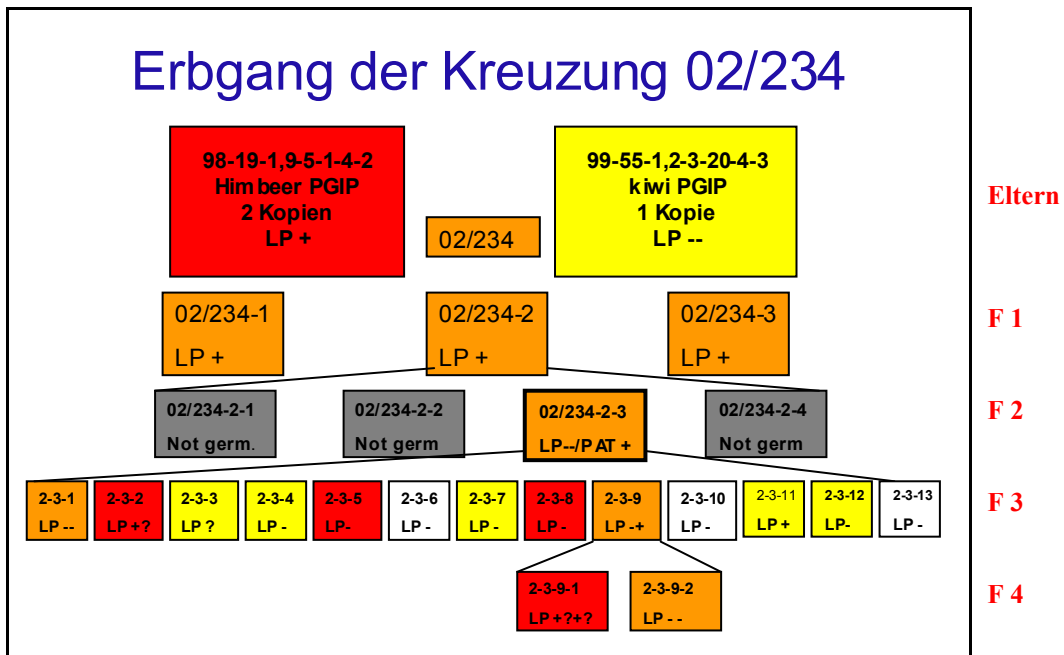
**Abb. 3.21 Organigramm der Kreuzung 02/221**

Das Organigramm (Abb.3.21) zeigt, dass die Kreuzung 02/221 vier Nachkommen lieferte. Die F 1 war hemizygot für beide *pgip*-Gene. Bei der weiteren Analyse der F2 zeigte lediglich eine Pflanze von sechs Nachkommen die Integration beider Gene. Für diese Pflanze (02/221-4-3) wurde die Inhibierungsaktivität im PGIP-Assay bestimmt (Tab. 3.26). Mittels Leaf-Paint-Test und PAT-Assay konnte die Aktivität des *bar*-Gens für die Pflanze 02/221-4-3 nachgewiesen werden. Die Segregation der F 3 zeigt, dass es sich um eine hemizygoten Pflanze handelt. Bei der Pflanze 02/221-4-3-11 könnte es sich eventuell um eine homozygote Pflanze handeln, da beide Nachkommen die Integration beider Gene zeigen. Dies muss jedoch durch die Analyse der Nachkommenschaften geprüft werden.

**Tab. 3.26 Ergebnisse des PGIP-Assays der Hybridpflanze 02/221-4-3**

Pflanze	PG <i>Botrytis</i>		PG <i>Stenocarpella</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
02/221-4-3	2000 ng	100 %	2000	80 %	2000	28,6 %
			1000	66,7 %	1000	25 %
			500	42,9 %	500	12,5 %

Das Ergebnis des PGIP-Assays zeigt eine 100 % ige Hemmung der Polygalakturonase aus *Botrytis cinerea* und eine 80 % ige Hemmung der PG aus *Stenocarpella* beim Einsatz von 2000 ng Gesamtprotein. Die Hemmung der Polygalakturonase aus *Colletotrichum* ist mit 28,6 % vergleichsweise gering.



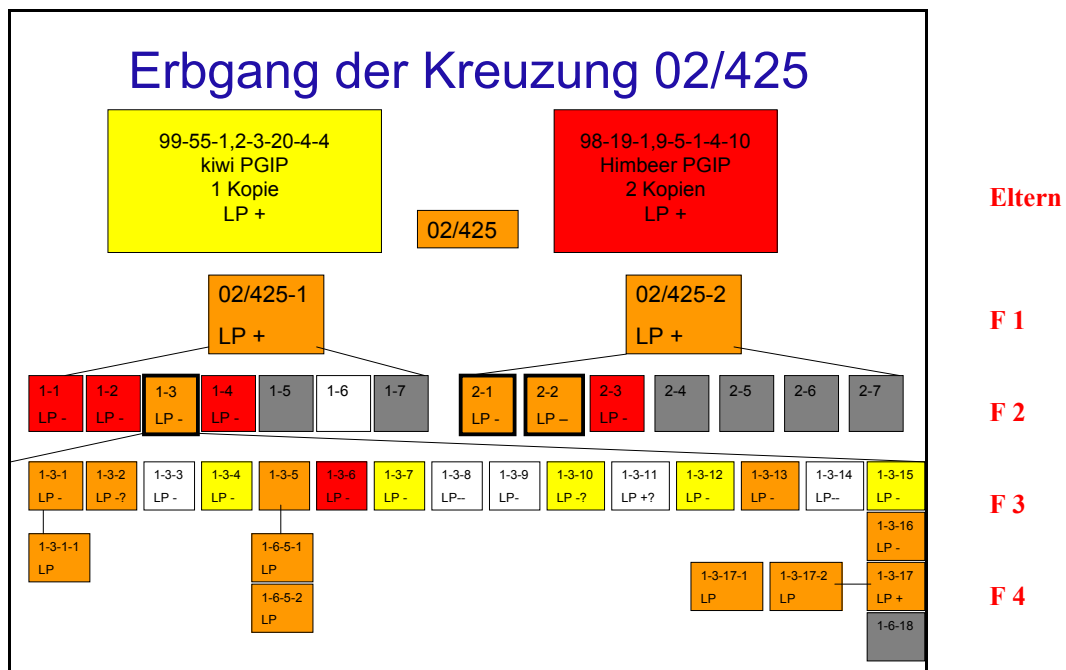
**Abb. 3.22 Organigramm der Kreuzung 02/234**

Die Kreuzung 02/234 lieferte drei Hybridpflanzen, von denen jedoch nur die Pflanze 02/234-2 einen Nachkommen in der F 2 lieferte, der beide *pgip*-Gene integriert hatte (02/234-2-3). Wie die Aufspaltung der Nachkommen in der F 3 zeigt, handelte es sich um eine für beide *pgip*-Gene hemizygoten Pflanze. Die Ergebnisse des PGIP-Assays (Tab. 3.27) zeigten eine 100 % ige Inhibierung der drei geprüften Polygalakturonasen, beim Einsatz von 2000 ng Gesamtprotein. Die Etablierung einer für beide *pgip*-Gene homozygoten Linie konnte bisher nicht realisiert werden.

**Tab. 3.27 Ergebnisse des PGIP-Assays der Hybridpflanze 02/234-2-3**

Pflanze	PG <i>Botrytis</i>		PG <i>Stenocarpella</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
02/234-2-3	2000 ng	100 %	2000	100 %	2000	100 %
			1000	83,3 %	1000	75 %
			500	71,4 %	500	25 %





**Abb. 3.23 Organigramm der Kreuzung 02/425**

Die Kreuzung 02/425 lieferte zwei Hybridpflanzen. Für beide Pflanzen konnten in der F 2 Nachkommen mit beiden *pgip*-Genen detektiert werden (02/452-1-3; 02/452-2-1; 02/425-2-2). Diese drei F 2 Pflanzen wurden mittels PGIP-Assay untersucht. Sie zeigten durchweg eine Inhibierungsaktivität von nahezu 100 % für alle drei getesteten Polygalakturonasen (Tab. 3.28). Der Leaf-Paint-Test der drei Pflanzen war negativ. Die Segregationsanalyse der F 3 zeigte, dass es sich bei der 02/425-1-3 um eine hemizygoten Pflanze handelte. In der F 4 wurden bisher nur wenige Pflanzen getestet, doch alle zeigten die Integration beider *pgip*-Gene. Die Analyse der Nachkommen könnte hier die Etablierung einer homozygoten Kombinationslinie bestätigen.

**Tab. 3.28 Ergebnisse des PGIP Assays der Hybridpflanzen 02/425-1-3, 02/425-2-1 und 02/425-2-2**

Pflanze	PG <i>Botrytis</i>		PG <i>Stenocarpella</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
02/425-1-3	2000	100 %	2000	~ 90%	2000	100 %
	2000	+				
	200	+				
02/425-2-1	2000 ng	100 %	2000	80 %	2000	85,7 %
			1000	66,7 %	1000	25 %
			500	28,6 %	500	12,5 %
02/425-2-2	2000 ng	100 %	2000	100 %	2000	100 %

Insgesamt zeigten die Kombinationspflanzen aus den beiden PGIP-Linien sehr gute Ergebnisse im PGIP-Assay. Dies gibt Anlass zur Annahme, dass die Integration der zwei rekombinanten *pgip*-Gene aus Kiwi und Himbeere in einer Pflanze nicht grundsätzlich zum Verlust der PGIP Aktivität führt. Die hohe PGIP Aktivität der Hybride ist aufgrund der bereits gezeigten Ergebnisse der Elternpflanzen auf die Eigenschaften der Linie 98-19-1,9 zurückzuführen.

### **3.5.2 Kombination von *Ad* PGIP mit Vst1**

Die Kreuzung von Pflanzen der *Ad* PGIP-Linie 99-55-1,2 mit der Vst1-Linie 98-48-8,2 kann als Gegenversuch der Kombination beider PGIP-Linien angesehen werden. Da die Pflanzen der Vst1-Linien keinerlei Wirkung im PGIP-Assay erzielen (Daten nicht dargestellt), müsste eine eventuelle Inhibierungsaktivität einer Hybride aus *Ad* PGIP und Vst1-Pflanzen zwangsläufig auf die *Ad* PGIP-Linie zurückzuführen sein. Für die Pflanzen dieser Linien konnte bisher jedoch keinerlei Inhibierungsaktivität gezeigt werden.

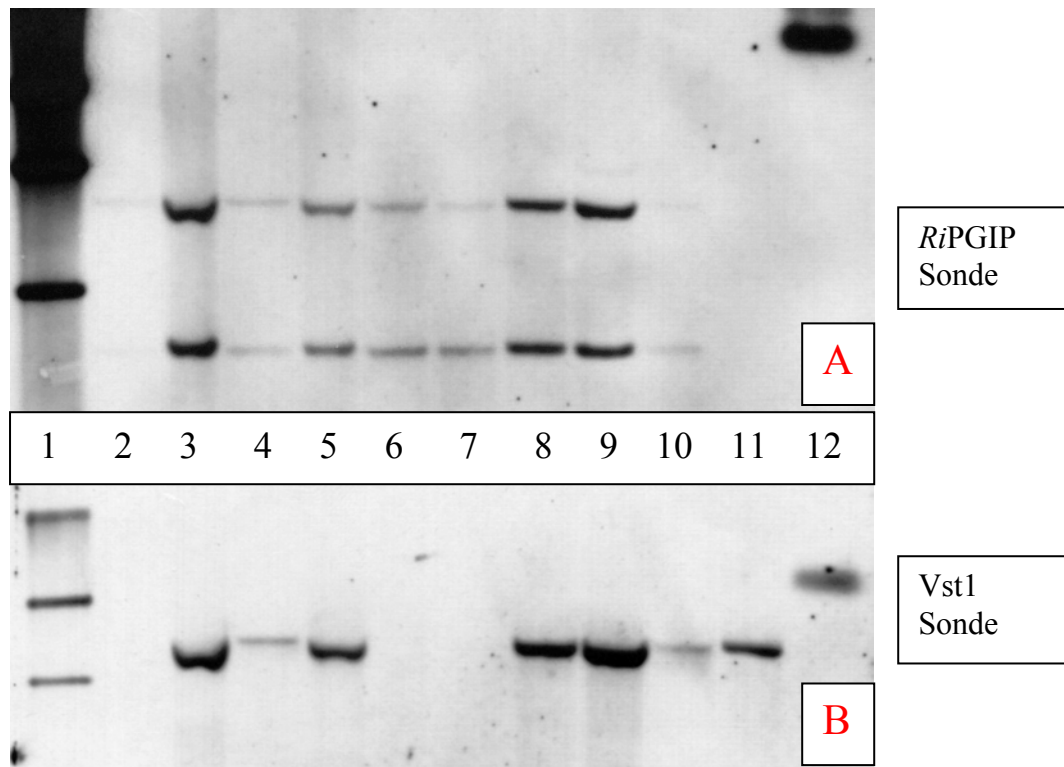
Auch hier bestätigen die gewonnenen Ergebnisse für die Hybridpflanzen und deren Nachkommen die der Elternpflanzen. Es konnte keine hemmende Wirkung auf die verwendeten Polygalakturonasen beobachtet werden.

### **3.5.3 Kombination von *Ri* PGIP mit Vst1**

Bei der Kombination der *Ri* PGIP Linie 98-19-1,9 mit der Vst1-Linie 99-67-8,1 handelt es sich um die aussichtsreichste Kreuzung. Zum einen, weil die Ergebnisse der Charakterisierung beider Elternlinien durchweg positive Ergebnisse erzielten, und zum anderen weil es sich hierbei um die Kombination zwei unterschiedlicher Wirkmechanismen zur Bekämpfung von phytopathogenen Pilzen in einer Pflanze handelt.

Die Charakterisierung der Pflanzen auf DNA-Ebene wurde analog zu der Analyse der Elternlinien durchgeführt. Die Vererbung der rekombinanten Gene in die Nachkommenschaften wurde mittels PCR analysiert. Zusätzlich wurden teilweise Southern-Blot-Analysen angefertigt, um die Stabilität der Linien auf DNA-Ebene zu prüfen. Die Abbildungen 3.24 A und B zeigen das Southern-Blot Ergebnis einiger Hybridpflanzen (F 3). Der Restriktionsverdau der genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Xba I

durchgeführt. Abb. 3.24 A zeigt die Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für das *Ri* PGIP Gen, während Abb. 3.24 B dieselbe Membran nach Hybridisierung mit einer *Vst1*-spezifischen Sonde zeigt. Der Probenauftrag kann der Tab. 3.30 entnommen werden.



**Abb. 3.24** Southern-Blot-Analyse der F3-Nachkommen der Hybridpflanze 02/457-1.

Der Restriktionsverdau der DNA wurde mit *Xba* I durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen *Ri* PGIP Sonde (A) und einer Sonde für das *vst1*-Gen (B).

**Tab. 3.29** Probenauftragsprotokoll der Southern-Blot-Analyse der F3 Nachkommen der Kreuzung 2/457.

Probennr.	Pflanze	<i>Ri</i> PGIP	<i>Vst</i>
1	DIG Marker II		
2	98-19-1,9 Elternpflanze	+	-
3	02/457-1-4-1	+	+
4	02/457-1-4-4	+	+
5	02/457-1-4-5	+	+
6	02/457-1-9-2	+	-
7	02/457-1-9-3	+	-
8	02/457-1-10-1	+	+
9	02/457-1-10-2	+	+
10	02/457-1-11-2	+	+
11	99-67-8,1 Elternpflanze	-	+
12	Positivkontrolle RiPGIP/vst	+	+

Die Abbildung 3.24 zeigt, dass in der Mehrzahl der analysierten Pflanzen (sechs von acht) mit beiden Sonden Genkopien detektiert werden konnten. Es sind also beide rekombinanten Gene integriert. Zudem wurde durch die Southern-Blot-Analyse die Stabilität der transgenen Elternlinien und deren Integrationsmuster bestätigt. Mit der *Ri* PGIP Sonde konnten erwartungsgemäß zwei Banden detektiert werden, während sich bei Hybridisierung mit der *Vst1*-Sonde nur eine Bande zeigte. Zur Kontrolle wurde die DNA je einer Elternlinie an Stelle 2 und 11 aufgetragen.

Die oben gezeigten Southern-Blot-Ergebnisse sind stellvertretend für alle nachfolgend gezeigten Hybriden. Sie alle resultierten aus Kreuzungen derselben Linien.

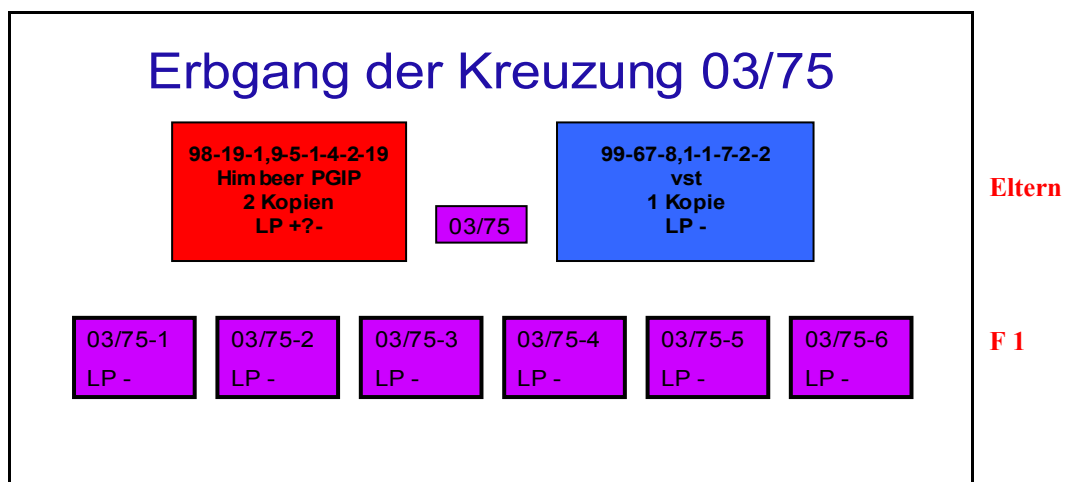


Abb. 3.25 Organigramm der Kreuzung 03/75

Die Kreuzung 03/75 führte zu sechs F 1 Pflanzen (Abb. 3.25), die erwartungsgemäß beide GOIs trugen. Das Ergebnis des Leaf-Paint-Tests war für alle F 1-Pflanzen negativ. Die Ergebnisse des PGIP-Assays der mit allen F 1-Pflanzen durchgeführt wurde, können der Tabelle 3.30 entnommen werden. Zwei der F 1-Pflanzen (03/75-1 und 03/75-2) wurden mittels RT-PCR auf die Transkription des *Vst1*-Gens hin untersucht. Die RT-PCR zeigte für die beiden Pflanzen 03/75-1 und 03/75-2 eine Transkription des *vst1*-Gens (Tab. 3.30).

Tab. 3.30 Ergebnisse der molekularen und funktionalen Analyse der F1-Hybridpflanzen 03/75-1 bis 6

Pflanze	PCR vst	PCR RiPGIP	Leaf Paint	RT-PCR vst	PG <i>Aphanomyces</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
					Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung Der PG in %
03/75-1	+	+	-	+	2000	0 %	2000	100 %
							1000	22,2 %
03/75-2	+	+	-	+			2000	100 %
							1000	77,8 %
03/75-3	+	+	-	n.d.			2000	100 %
							1000	66,7 %
03/75-4	+	+	-	n.d.			2000	87,5 %
							1000	33,3 %
03/75-5	+	+	-	n.d.	2000	0 %	2000	75 %
							1000	22,2 %
03/75-6	+	+	-	n.d.			2000	100 %
							1000	100 %

Der PGIP-Assay wurde mit den Polygalakturonasen aus *Aphanomyces euteiches* und *Colletotrichum acutatum* durchgeführt. Die Extrakte aus beiden getesteten Pflanzen (03/75-1 und 03/75-5) zeigten keinerlei inhibierende Wirkung auf die Polygalakturonase aus *Aphanomyces euteiches*, während die PG aus *Colletotrichum* von den Rohextrakten nahezu aller F1-Pflanzen bei der Verwendung von 2000 ng Gesamtprotein vollständig inhibiert wurden. Nur die Pflanzen 03/75-4 und 03/75-5 zeigten mit 87,5 % und 75 % keine vollständige Hemmung. Beim Einsatz von 1000 ng des Rohextraktes waren die Ergebnisse des Tests nicht so homogen. Die Inhibierungsaktivität reicht von 22,2 % bei den Pflanzen 03/75-1 und 03/75-5 bis hin zu 100 % bei der Pflanze 03/75-6. In diesem Zusammenhang kann festgestellt werden, dass sich die Hemizygotie der Pflanzen in Bezug auf das *Ri pgip*-Gen positiv auswirkte. Durch die Analysen der Nachkommenschaften soll in Zukunft der Einfluss der Verdoppelung des Transgens, also der angestrebte Zustand der Homozygotie untersucht werden.

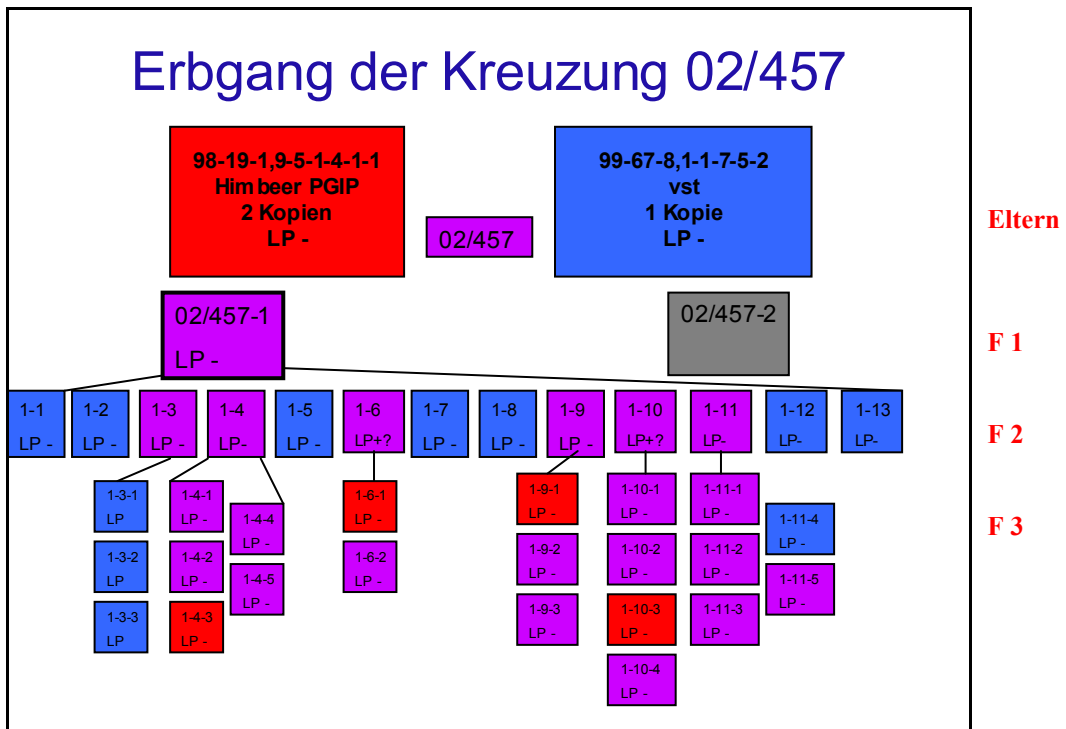


Abb. 3.26 Organigramm der Kreuzung 02/457

Die Kreuzung 02/457 ergab lediglich eine F1-Hybridpflanze (02/457-1). Diese Pflanze zeigte ein negatives Leaf-Paint-Ergebnis. Die Ergebnisse des PGIP- Assays für die Pflanze 02/457-1 können der Tabelle 3.31 entnommen werden. Der Rohextrakt der hemizygoten Hybridpflanze zeigte beim Einsatz von 2000 ng Gesamtprotein eine vollständige Hemmung aller drei getesteten Polygalakturonasen. Auch beim Einsatz von 1000 ng und 500 ng Gesamtprotein konnte bei PG *Stenocarpella* noch eine Hemmung von ca. 85 % erreicht werden und bei PG *Colletotrichum* blieb die 100% ige Hemmung erhalten.

Tab. 3.31 Ergebnisse des PGIP-Assays der F1-Hybridpflanze Pflanze 02/457-1.

Pflanze	PG <i>Botrytis</i>		PG <i>Stenocarpella</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
02/457-1	2000	100 %	2000	100 %	2000	100 %
			1000	83,3 %	1000	100 %
			500	85,7 %	500	100 %

In der F2 konnten bei sechs von 13 Nachkommen beide rekombinanten Gene detektiert werden (Tab. 3.32). Die Leaf-Paint-Ergebnisse für die F2-Pflanzen waren in der Mehrzahl

negativ. Dies galt in noch stärkerem Maße für die F 3-Pflanzen. Von 22 untersuchten F 3-Pflanzen konnten bei 14 Pflanzen beide Transgene nachgewiesen werden. Ausserdem wurde ein PGIP-Assay für sämtliche Pflanzen in der F 3 durchgeführt, die Ergebnisse können der Tabelle 3.32 entnommen werden.

**Tab. 3.32 Ergebnisse der molekularen und funktionalen Analyse der F 3-Pflanzen der Kreuzung 02/457.**

Pflanze	Samen	PCR vst	PCR RiPGIP	Leaf Paint	PG <i>Aphanomyces</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
					Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
02/457-1-4-1	12	+	+	-	2000	0 %	2000	100 %
02/457-1-4-2		+	+	-			2000	100 %
02/457-1-4-3		-	+	-			2000	22,2 %
02/457-1-4-4	9	+	+	-	2000	0 %	2000	66,6 %
02/457-1-4-5	12	+	+	-			2000	100 %
02/457-1-6-1		-	+	-			2000	16,7 %
02/457-1-6-2		+	+	-			2000	100 %
02/457-1-9-1		-	+	-	2000	0 %	2000	11,1 %
02/457-1-9-2	15	+	+	-	2000	0 %	2000	44,4 %
02/457-1-9-3	16	+	+	-	2000	0 %	2000	100 %
02/457-1-10-1	5	+	+	-			2000	66,7 %
02/457-1-10-2	5	+	+	-			2000	55,6 %
02/457-1-10-3		-	+	-			2000	100 %
02/457-1-10-4		+	+	-			2000	77,8 %
02/457-1-11-1		+	+	-			2000	100 %
02/457-1-11-2	12	+	+	-			2000	100 %
02/457-1-11-3		+	+	-			2000	16,7 %
02/457-1-11-4		+	-	-			2000	27,8 %
02/457-1-11-5		+	+	-			2000	100 %

Die Pflanzen der F 3-Generation zeigten, mit Ausnahme weniger Pflanzen sehr ähnliche Werte in Bezug auf die Hemmung der PGs. Im Test gegen PG aus *Aphanomyces euteiches* konnte keine Hemmung erreicht werden. Im Test gegen PG aus *Colletotrichum acutatum* zeigten beim Einsatz von 2000 ng Gesamtprotein acht von 14 getesteten Pflanzen eine vollständige Inhibierung der Polygalakturonase. Weitere fünf Pflanzen inhibierten die Polygalakturonase im Bereich von 44 % bis 77,8 %. Nur die Inhibierungsaktivität der Pflanze 02/457-1-11-3 lag mit 16,7 % weit unterhalb der anderen Werte. Inwieweit auch hier Hemizygotie und Homozygotie einen Effekt auf die Aktivität des PGIP Gens haben, soll anhand fortlaufender Segregationsanalysen untersucht werden. Ein Teil der F 4-Pflanzen befindet sich zurzeit zur Analyse im Gewächshaus. Sobald eine homozygote Linie mit beiden GOIs etabliert werden kann, sollen weitere Untersuchungen in Bezug auf die Expressionsstabilität des *pgip*-Gens und des *vst1*-Gens folgen.

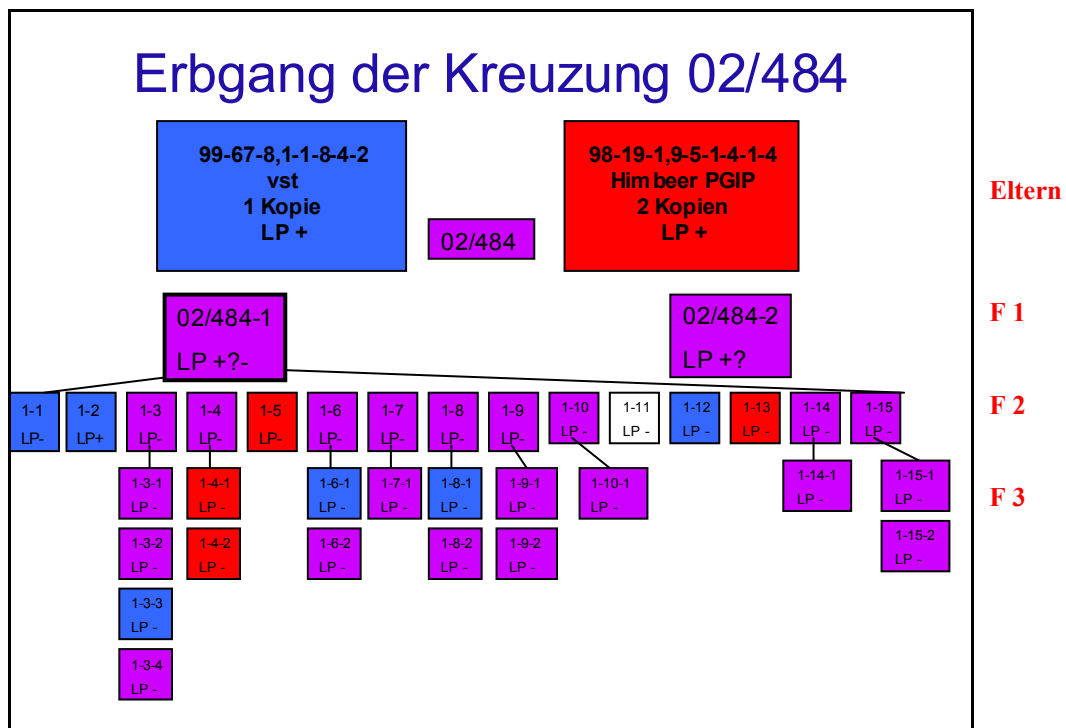


Abb. 3.27 Organigramm der Kreuzung 02/484; 02/484-1

Bei der Kreuzung 02/484 handelt es sich um eine reziproke Kreuzung der 02/457. In diesem Ansatz stellte die Pflanze der Linie 99-67-8,1 die Empfängerpflanze, während die Pflanze der Linie 98-19-1,9 der Pollendonator war. Es resultierten zwei hemizygote F 1-Pflanzen aus der Kreuzung, deren Analyse in den Abbildungen 3.27 (02/484-1) und 3.28 (02/484-2) dargestellt wird. Die Leaf-Paint-Ergebnisse beider F 1 Pflanzen waren indifferent.

Die Pflanze 02/484-1 wurde zum PGIP-Assay mit verschiedenen Polyglakturonasen herangezogen, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.33 aufgeführt. Beim Einsatz von 2000 ng Gesamtprotein wurde gegen alle drei getesteten Polygalakturonasen eine Inhibierung von 100 % erreicht. Auch mit 1000 ng und 500 ng wurde die Polygalakturonase aus *Colletotrichum* noch zu 100 % gehemmt. PG *Stenocarpella* wurde beim Einsatz von 1000 ng Protein ebenfalls zu 100 % gehemmt und beim Einsatz von 500 ng noch zu 87,5%.

Tab. 3.33 Ergebnisse des PGIP Assays der F 1 Hybridpflanze 02/484-1

Pflanze	PG <i>Botrytis</i>		PG <i>Stenocarpella</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
02/484-1	2000	100 %	2000	100%	2000	100 %
			1000	100 %	1000	100 %
			500	85,7 %	500	100 %



Mittels PCR Analyse konnten in neun der 15 F<sub>2</sub>-Nachkommen beide Transgene nachgewiesen werden. Drei der F<sub>2</sub> Pflanzen enthielten nur das *vstI*-Gen, während in zwei Pflanzen nur das *pgip*-Gen nachgewiesen werden konnte. Eine der untersuchten F<sub>2</sub>-Pflanzen zeigte weder die Integration des einen, noch des anderen rekombinanten Gens. Die Analyse der F<sub>3</sub>-Pflanzen zeigte bei zwölf von 17 untersuchten Pflanzen die Integration beider antifungaler Gene. Die F<sub>4</sub> befindet sich zurzeit im Gewächshaus, um möglichst schnell die Etablierung einer homzygoten Kombinationslinie zu gewährleisten.

Die F<sub>3</sub>-Pflanzen wurden einer detaillierten molekularen und funktionalen Analyse unterzogen, die resultierenden Daten sind in der Tabelle 3.34 aufgeführt.

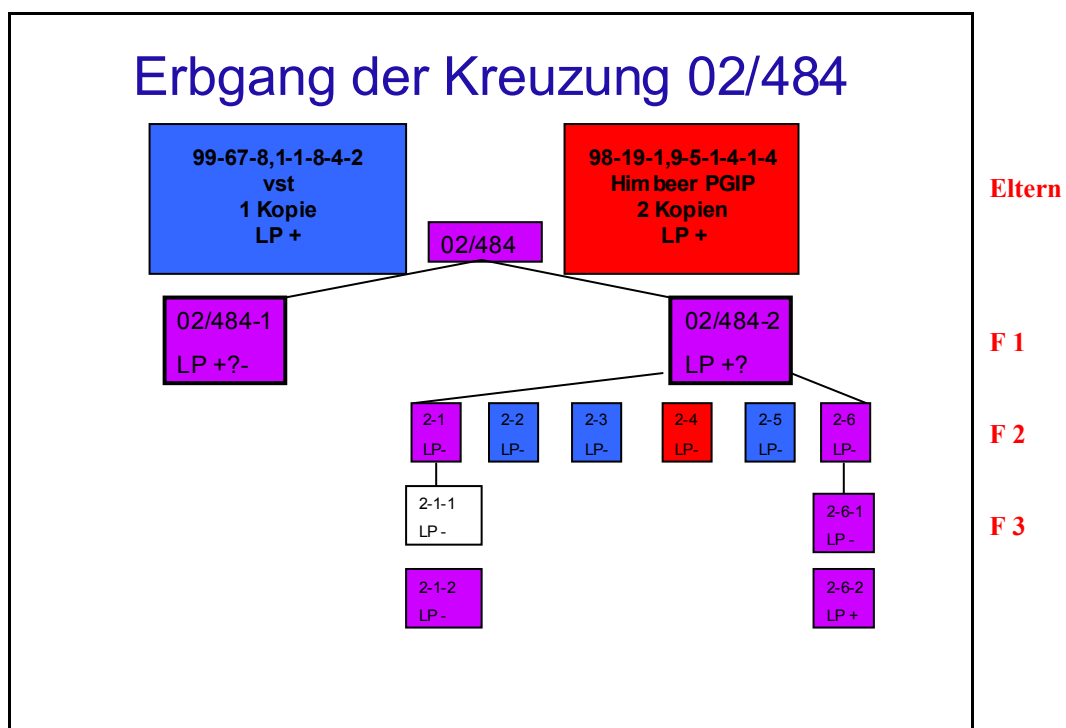


Abb. 3.28 Organigramm der Kreuzung 02/484; 02/484-2

Die Analyse der F<sub>2</sub>-Generation der 02/484-2 ergab zwei Pflanzen mit beiden GOIs aus sechs insgesamt getesteten. Die Leaf-Paint Ergebnisse der F<sub>2</sub> Pflanzen waren durchgängig negativ. Auch hierbei wurden die F<sub>3</sub>-Pflanzen einer detaillierten Analyse unterzogen. Die Ergebnisse befinden sich in Tabelle 3.34.

Die F<sub>3</sub>-Pflanzen der Kreuzung 02/484 zeigen im PGIP-Assay ein ähnliches Bild wie die bereits präsentierten Daten der Kreuzung 02/457 (Tab. 3.33). Die Ergebnisse in Bezug auf die PG von *Aphanomyces euteiches* waren vollständig negativ und entsprachen damit allen zuvor erhaltenen Ergebnissen.

Tab. 3.34 Ergebnisse der molekularen und funktionalen Analyse der F 3-Pflanzen der Kreuzung 02/484.

Pflanze	Samen	PCR vst	PCR RiPGIP	Leaf Paint	PG <i>Aphanomyces</i>		PG <i>Colletotrichum</i>	
					Protein in ng	Hemmung der PG in %	Protein in ng	Hemmung der PG in %
02/484-1-3-1		+	+	-			2000	66,7 %
02/484-1-3-2		+	+	-			2000	11,1 %
02/484-1-3-3		+	-	-			2000	22,2 %
02/484-1-3-4		+	+	-			2000	16,7 %
02/484-1-4-1		-	+	-	2000	0 %	2000	100 %
02/484-1-4-2		-	+	-	2000	0 %	2000	100 %
02/484-1-6-1		+	-	-			2000	22,2 %
02/484-1-6-2		+	+	-			2000	100 %
02/484-1-7-1	22	+	+	-			2000	14,3 %
02/484-1-8-1		+	-	-			2000	0 %
02/484-1-8-2		+	+	-			2000	100 %
02/484-1-9-1		+	+	-	2000	0 %	2000	71,4 %
02/484-1-9-2		+	+	-	2000	0 %	2000	100 %
02/484-1-10-1		+	+	-	2000	0 %	2000	71,4 %
02/484-1-14-1		-	+	-			2000	21,4 %
02/484-1-15-1		+	+	-	2000	0 %	2000	100 %
02/484-1-15-2		+	+	-	2000	0 %	2000	100 %
02/484-2-1-1		-	-	-			2000	0 %
02/484-2-1-2		+	+	-			2000	57,1 %
02/484-2-6-1	7	+	+	-			2000	100 %
02/484-2-6-2		+	+	+			2000	14,3 %

Bei dieser Kreuzung traten deutlich mehr F 3-Pflanzen auf, die keine oder nur eine sehr geringe Inhibierung der Polygalakturonase von *Colletotrichum acutatum* zeigten. So wurden für vier von 14 getesteten Hybridpflanzen eine Inhibierungsaktivitäten von weniger als 20 % gemessen. Sechs der 14 getesteten Hybridpflanzen zeigten eine vollständige Inhibierung der Polygalakturonase aus *Colletotrichum* und bei vier weiteren Pflanzen lag die Inhibierungsaktivität zwischen 57,1 und 71,4 %. Mit Ausnahme der Pflanze 02/484-2-6-2 fielen die Leaf-Paint-Ergebnisse für alle getesteten F3-Pflanzen negativ aus, dabei war unerheblich ob sie eines oder beide rekombinanten Gene integriert hatten.

Schon durch die Vorraussetzungen der Elternlinien, erschien die Kreuzung der *Ri* PGIP- Linie 98-19-1,9 mit der *Vst1*-Linie 99-67-8,1 als aussichtsreiche Kombination. Dies wurde durch die bisherigen Analysen der Hybridpflanzen und deren Nachkommen bestätigt. Die Resveratrolgehalte der Kombinationspflanzen konnten bisher leider noch nicht bestimmt werden. Die Ergebnisse der PGIP-Assays zeigten jedoch, dass die Expression des rekombinanten PGIPs in den Hybriden mindestens genauso stark ist wie in den Elternlinien. Sobald die Etablierung homozygoter Kombinationslinien gelungen ist, soll mit diesen Pflanzen der Effekt kombinierter antifungaler Gene auf Pilze untersucht werden.

## 4 Diskussion

Seit Gregor Mendel ist die Erbse eine wichtige Modellpflanze für physiologische, biochemische und genetische Studien. Heute werden *Lotus japonicus* und *Medicago truncatula* als führende Modell-Leguminosen angesehen (VANDEN BOSCH und STACEY 2003). *Medicago truncatula* hat sich vor allem aufgrund des wesentlich kleineren Genoms als Modellpflanze etabliert. Da *Medicago* eine hohe Syntenie zu *Pisum* aufweist, darf davon ausgegangen werden, dass Ergebnisse aus der Transkriptomik und Proteomik auf Erbsen übertragbar sein werden. Aufgrund ihres hohen Proteingehalts und den geringen Anteil antinutritiver Substanzen, zählen Erbsen, neben den Getreiden, zu den wichtigsten Nahrungspflanzen weltweit. Die Ertragsstabilität ist vor allem aufgrund biotischer Schadfaktoren sehr problematisch beim Erbsenanbau. Hier sind in erster Linie phytopathogene Pilze und Viren zu nennen, die mitunter zu dramatischen Ertragsausfällen führen können.

Der relativ kleine Genpool der Erbse gestaltet die Resistenzzüchtung sehr schwierig. Weder durch konventionelle Züchtung noch durch Mutationszüchtung konnte eine wesentliche Verbreiterung des primären Genpools der Erbse erreicht werden (GOTTSCHALK und WOLF 1983; BLIXT et al. 1991). Das Instrumentarium des molekularen Gentransfers bietet hier grundsätzlich eine Möglichkeit zur Erweiterung des Resistenzspektrums der Erbse.

Auch 14 Jahre nach der ersten Veröffentlichung über stabil transformierte Erbsen (PUONTI-KAERLAS et al. 1990) ist die Transformation von Leguminosen nicht sehr effizient. Es liegen jedoch inzwischen eine Reihe von Publikationen mit optimierten und reproduzierbaren Protokollen zur *Agrobacterium*-vermittelten Erbsentransformation vor (DAVIES et al. 1993; SCHROEDER et al. 1993; GRANT et al. 1995; BEAN et al. 1997; Zusammenfassung in GRANT und COOPER 2002).

Ein Großteil der Publikationen befasst sich ausschließlich mit der Etablierung und Optimierung von Transformationsbedingungen unter Einsatz visuell detektierbarer Reportergenen wie GUS (DE KATHEN und JACOBSEN 1990; DAVIES et al. 1993; POLOWICK et al. 2000; GRANT et al. 2003) oder selektierbarer Markergene wie *nptII* oder *bar* (PUONTI-KAERLAS et al. 1992; SCHROEDER et al. 1993; GRANT et al. 1995; BEAN et al. 1997; NADOLSKA-ORCZYK und ORCZYK 2000).

Unter dem Aspekt der Erhöhung der Insektenresistenz wurde von MORTON et al. (2000) durch die Expression eines  $\alpha$ -Amylase-Inhibitors ein Schutz gegen den Erbsen Samenbohrer (*Bruchus pisorum*) erreicht. Die Integration viraler Hüllproteingene oder viraler Replikasene in das Erbsengenom führte in einigen Fällen zur erhöhten Virusresistenz transgener Erbsen (CHOWRIRA et al. 1998; JONES et al. 1998; TIMMERMAN-VAUGHAN et al. 2001). Am CSIRO in Australien wird ebenfalls intensiv an der Erhöhung der Pilzresistenz von Erbsen geforscht, so wurden in den Jahren 1998, 1999 und 2000 Freisetzungsversuche von transgenen Erbsen durchgeführt, die folgende rekombinante Gene integriert hatten: RsAFP2 aus Rettich (*Raphanus sativus*) kodiert für ein antifungales Protein (PR-96); vst1 Gen aus Wein (*Vitis vinifera*) kodiert für Stilbensynthase (PR-96); ein Gen aus *Arabidopsis thaliana*, welches für ein Lipid Transfer Protein kodiert (PR-114) und ein Gen aus Tabak, welches für das Protein Osmotin kodiert (PR-134). Die entsprechenden Freisetzungsanträge sind im Internet einzusehen (Homepage des Australischen Gesundheitsministeriums; <http://www.health.gov.au>). Die Ergebnisse der Versuche wurden bisher aber nicht, oder nur mit zeitlicher Verzögerung veröffentlicht. Möglicherweise unterliegen die Daten dem Patentrecht, oder sie werden aus Gründen der Firmenpolitik zurückgehalten.

Ausserdem gibt es einige Ansätze, die Erbse mit ihren proteinreichen Samen zum „Molecular Farming“ einzusetzen. Die Arbeiten von PERRIN et al. (2000) und SAALBACH et al. (2001) zeigen, dass die Antikörperproduktion in transgenen Erbsen ein neues Produktionssystem eröffnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Strategie verfolgt, das antifungale Potenzial verschiedener Gene in Erbsenpflanzen zu kombinieren und damit eine Beeinflussung des Resistenzniveaus der Pflanzen gegenüber phytopathogenen Pilzen vorzunehmen. Die Kombination verschiedener rekombinanter Gene mittels Kreuzung stellt einen bisher einzigartigen Ansatz zur Erweiterung des Resistenzspektrums der Erbse dar.

Unabhängig von der in dieser Arbeit vorgestellten agrarbiotechnologischen Anwendung erweitert die Kreuzung transgener Pflanzen auch das Anwendungsspektrum zur Nutzung der Pflanze als Bioreaktor. Der wesentliche Vorteil liegt auch hier in der unabhängigen Identifizierung funktional intakter Einzelkomponenten in den jeweiligen transgenen Pflanzen zur Ausgestaltung komplexer Synthesewege in den Kombinationslinien.

Am Lehrgebiet Molekulargenetik wurden im Rahmen eines EU Projektes in den Jahren 1996 bis 1998, unter der Leitung von Dr. Andre de Kathen, nach dem modifizierten Protokoll von SCHRÖDER et al. (1993) etwa 130 putativ transgene Erbsenklone mit verschiedenen antifungalen Genen hergestellt. Um eine möglichst breite Basis verschiedener Klone für die weiteren Arbeiten zu bekommen, wurden auch Sprosse eines Sprosskallus molekular charakterisiert. Die Integrationsmuster wichen aber niemals voneinander ab. Dies zeigt, dass das Selektionsschema und der Selektionsdruck optimal gewählt worden waren. Es kam hingegen vor, dass vermeintlich unterschiedliche Klone aufgrund ihrer identischen Integrationsmuster nachträglich im Rahmen der Charakterisierung zu einem Klon zusammengefasst werden mussten. Diese Ergebnisse führten dazu, dass nur eindeutig charakterisierte Klone in die Berechnung der Transformationseffizienz einbezogen wurden. Die Transformationseffizienz lag möglicherweise aus diesem Grund mit ca. 0,3 % weit unter den Werten, die in vergleichbaren Arbeiten (2 bis 3 %, GRANT et al. 2003) durchschnittlich erreicht wurden. Da noch 80 potentiell transgene Klone zur Verfügung stehen, ist eine Erhöhung der berechneten Transformationseffizienz auf mindestens 0,8 % durchaus wahrscheinlich. Diese Klone stehen größtenteils als T 1 Samen zur Verfügung, sie wurden bisher lediglich mittels PCR charakterisiert und daher nicht in die Berechnung der Effizienz einbezogen.

## **4.1 Molekulare Analyse auf DNA Ebene**

Der erfolgreiche Einsatz der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung setzt die stabile Integration, Vererbung und vor allem die stabile Expression der rekombinanten Gene voraus. Diese Faktoren waren Gegenstand der Untersuchungen der transgenen Pflanzen, um damit eine Basis für die Auswahl geeigneter Pflanzen für die nachfolgenden Kreuzungen zu schaffen.

### **4.1.1 Problematik multipler T-DNA Integrationen**

Da unter anderem die Integration multipler Kopien der T-DNA (LINN et al. 1990) eine Stilllegung der Transgene zur Folge haben kann, ist es inzwischen zur gängigen Praxis geworden, mittels Southern-Blot-Analyse transgene Linien mit Einzelkopien, sogenannte

*Single-Copy* Klone, zu identifizieren und zu selektieren (DE NEVE et al. 1998; THEUNS et al. 2002).

Dieses war auch in der vorliegenden Arbeit das erste Ziel. Die Integrationsanalysen mittels Southern-Blot offenbarten, dass ein großer Teil der transgenen Pflanzen mehrere T-DNA Kopien der Transgene trug. So konnte bei den drei verschiedenen *Ri* PGIP-Klonen kein *Single-Copy* Klon identifiziert werden (Seite 60; Abb. 3.1). In dem Fall wurden alle drei Klone in die weiteren Analysen einbezogen. Bei den *Ad* PGIP Pflanzen hingegen, war die Selektion mehrerer *Single-Copy* Linien möglich (Seite 66; Abb. 3.5). In den *vst1*-transgenen Pflanzen konnten zwei Linien identifiziert werden, von denen eine Linie (98-48-8,2) zwei T-DNA Kopien trug, während es sich bei der zweiten um eine *Single-Copy* Linie handelte (Seite 72; Abb.3.6 und 3.7). Es wurden beide Linien zu weiteren Untersuchungen herangezogen.

Wie man der Tabelle 4.1 entnehmen kann, wurden bisher insgesamt 27 Klone charakterisiert. Davon trugen zehn Klone Einzelkopien der T-DNA. Der Anteil der *Single-Copy* Klone lag also bei 37 %.

**Tab. 4.1 Ergebnisse molekulare Charakterisierung-*Single Copy* Klone**

<b>Antifungales Gen</b>	<b>Einzel Kopie</b>	<b>Zwei/drei Kopien</b>	<b>Multiple Kopien</b>	<b>Unvollständige Integration</b>	<b>Linien mit Backbone Sequenzen</b>
RiPGIP	-	3	-	-	-
AdPGIP	5	2	2	-	2
Glucanase	3	3	5	-	3
Vst1	1	1	-	-	-
Chitinase	1	-	-	1	-
Summe	10	9	7	1	5

### 4.1.2 Transfer von Backbone-Sequenzen in das Pflanzengenom

Unsere Untersuchungen ergaben ausserdem, dass Mehrfachinsertionen oft mit der Integration von Backbone Sequenzen einhergingen. Insgesamt trugen von den 27 Klonen drei Klone mit multiplen Kopien, zwei Klone mit Einzelkopien und ein Klon mit zwei Kopien der T-DNA auch Backbone- Sequenzen des Vektors. Es wurden also von insgesamt 27 charakterisierten Klonen fünf Klone mit integrierten Vektorsequenzen detektiert (Tab. 4.1; orange unterlegt). Das entspricht 18,5 %.

Viele Jahre glaubte man, dass durch den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer nur die T-DNA zwischen den Bordersequenzen in das Pflanzengenom integriert würde. Detaillierte Analysen transgener Pflanzen zeigten jedoch, dass die Integration von Vektorsequenzen in das pflanzliche Genom sehr häufig stattfindet (MARTINEAU et al. 1994; RAMANATHAN et al. 1995; CLUSTER et al. 1996; VAN DER GRAAFF et al. 1996; KONONOV et al. 1997; WENCK et al. 1997; WOLTERS et al. 1998). YIN und WANG (2000) konnten in ihren Arbeiten an Reis zeigen, dass 33 % der transgenen Linien (insgesamt 226) Backbone Sequenzen des Vektors integriert hatten. Auch DE BUCK et al. (2000A) stellten nach der *Agrobacterien*-vermittelten Transformation von Tabak und Arabidopsis fest, dass 20 bis 50 % der transgenen Pflanzen Vektorsequenzen trugen, die über die linke Border der T-DNA hinaus gingen, was den eigenen Beobachtungen in dieser Arbeit entsprach (Tab. 4.1).

DE BUCK et al. (2000A) konnten nachweisen, dass weder die Pflanzenart, noch der Explantattyp oder die Selektion einen Einfluss auf die Frequenz der Backbone Integrationen hatte. Auch der *Agrobacterien* Stamm hatte keinen Einfluss auf die Übertragungsfrequenzen von Backbone Sequenzen (KONONOV et al. 1997). In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass auch neue Vektorsysteme wie pGreen/pSoup, bei denen es sich um sogenannte Minimalvektoren handelt, in hoher Frequenz (45%) Backbone Sequenzen übertragen (VAIN et al. 2003).

Die Übertragung von Vektorsequenzen ist höchstwahrscheinlich eine Konsequenz diverser Vorgänge, die sich bereits in dem *Agrobacterium* vollziehen. VAN DER GRAAFF et al. (1996) ziehen als Ursache für die Übertragung der Vektorsequenzen die fehlerhafte Prozessierung der Vir Proteine in der 5' Region der linken Bordersequenz in Betracht.

DE BUCK et al. (2000) hingegen, sehen spezifische Bordersequenzen als Auslöser der Backboneübertragung an und postulieren, dass ein Überlesen der linken Border zur

Übertragung von Backbone Sequenzen führt. Ein spontaner Abbruch der Einzelstrangsynthese führt zur Übertragung von Backbone Fragmenten, während bei einem kompletten Umlauf mit dem erneuten Erreichen der linken Border terminiert wird. Diese Integration zweier T-DNAs mit dazwischen liegendem Vektor-Backbone wird Backbone-Junction genannt. Dieses Phänomen konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Methylierung der auf der T-DNA befindlichen Restriktionschnittstellen würde in diesem Fall zu einer Einzelbande in der Southern-Blot-Analyse führen, welche tatsächlich aber zwei T-DNAs repräsentiert.

Ein Transfer von Backbone-Sequenzen im *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfersystem ist nicht beeinflussbar, es bleibt also nur die Backbone tragenden Linien zu eliminieren. Der Nachweis von Backbone Sequenzen geschah im Vorfeld der vorliegenden Arbeit mittels PCR (Material und Methoden 2.2.2.11).

#### 4.1.3 Biologische Sicherheitsaspekte

Die EU Direktive 2001/18/EC sieht vor, unter besonderer Berücksichtigung der Antibiotikaresistenzgene, die zu übertragenden Sequenzen auf das funktional notwendige Mindestmass zu begrenzen. Zur Stabilisierung der Ti-Plasmide im *Agrobacterium* sind auf dem Backbone befindliche Antibiotikaresistenzgene unter der Kontrolle prokaryontischer Promotoren unentbehrlich. Dies ist eine potentielle aber vermeidbare Gefahr im Hinblick auf einen horizontalen Gentransfer.

Die durch die EU-Gesetzgebung vorgeschriebene Detektion von Backbone-Sequenzen in den transgenen Pflanzen ist gleichermaßen für die Funktionalität essentiell.

#### 4.1.4 Segregationsanalyse der Nachkommenschaften

Bei Selbstbefruchtern wie der Erbse, aber auch Reis, Weizen, Gerste werden homozygote Linien als Ausgangsmaterial für Züchtungsprogramme verwendet (JAMES et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde die Homozygotie der Pflanzen auf herkömmliche Weise, durch Nachkommenschaftsanalysen bestimmt. Zunächst sollte sowohl die auf dem *bar*-Gen beruhende Herbizidresistenz als auch die molekularbiologische Untersuchung mittels PCR zur Ermittlung des Homozygotiegrades herangezogen werden. Die Expression dieses Markergens erwies sich jedoch für verlässliche Segregationsanalysen als unbrauchbar. Dies entspricht



Ergebnissen der Arbeit von JAMES et al. (2002), bei der jedoch andere Markergene verwendet wurden. Es wurden also lediglich die PCR Daten zur Segregationsanalyse der Erbsen herangezogen.

In den meisten Fällen, wie bei den *Ri* PGIP-Linien 98-19-1,9, 98-52-2,5 und 98-52-5,4 oder auch der *Vst1*-Linie 98-48-8,2 war die Insertion multipler T-DNA Stränge so eng, dass mittels Southern-Blot-Analyse keine Segregation beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung wurde auch bei Weizen, Mais und Reis gemacht (REGISTER et al. 1994; STÖGER et al. 1998; GAHAKWA et al. 2000; BOURDON et al. 2002). Da mittels Southern keine Neuorientierung der Transgene beobachtet werden konnte, wurden die eng gekoppelten Kopien in den Berechnungen zur Segregationsanalyse als eine Kopie angesehen.

Die Ausnahme bildete hierbei der *Ad* PGIP-Klon 98-29-1,9. Bei diesem Klon konnte an vier T1 Pflanzen mittels Southern die Segregation der multiplen Kopien verfolgt werden (Seite 66; Abb. 3.4). Zur weiteren Analyse wurde ein daraus resultierender *Single-Copy* Klon isoliert (98-29-1,9-1) und für weitere Analysen verwendet.

Die Entwicklung zuverlässiger Techniken, wie z.B. einer inversen PCR, würden die Segregationsanalysen wesentlich vereinfachen und verkürzen. Dazu müsste jedoch zunächst die Sequenz der flankierenden genomischen Bereiche der T-DNA bestimmt werden, was sich in bezug auf die transgenen Erbsen bisher als äußerst schwierig erwies, dies wird auch in der Literatur bestätigt (BREYNE et al. 1992; LIU et al. 1995; DE BUCK et al. 2000B). Dieser Ansatz sollte aber gerade auch im Hinblick auf die Charakterisierung der Hybridpflanzen und deren Nachkommenschaften weiter verfolgt werden.

## 4.2 Expressionsanalyse der transgenen Erbsenpflanzen

Der Begriff Epigenetik umschreibt vererbare Veränderungen der Genexpression, die nicht auf Veränderungen der DNA Sequenz zurückzuführen sind. Das kann zur Unterdrückung oder Aktivierung von Genexpression führen (VAUCHERET et al. 2001). In den 90er Jahren wurde erstmals beobachtet, dass rekombinante Gene in Pflanzen stillgelegt werden können, bzw. dazu führen können, dass homologe endogene Gene stillgelegt werden (NAPOLI et al. 1990; SMITH et al. 1990; VAN DER KROL et al. 1990). Da in diesen Fällen sowohl die mRNA der Transgene als auch die der homologen endogenen Gene abgebaut wurden, wurde das Phänomen zunächst als Kosuppression bezeichnet. Später konnten einige Arbeitsgruppen

zeigen, dass das *Gene Silencing* auch Transgene betreffen kann, die keine Homologie zu endogenen Pflanzengen hatten (DEHIO und SCHELL 1994; INGELBRECHT et al 1994; ELMAYAN und VAUCHERET 1996). Damit war klar, dass das *Gene Silencing* nicht nur einen Regulationsmechanismus endogener Genexpression darstellt, sondern dass es sich vielmehr um einen Abwehrmechanismus gegen invasive DNA Sequenzen und Viren handeln könnte (MATZKE und MATZKE 1998A).

Von dem Phänomen des *Gene Silencing* können sowohl Einzelkopien oder mehrere nicht gekoppelte Integrationen betroffen sein (*Trans*-Inaktivierung), als auch multiple, eng gekoppelte Transgene (*Cis*-Inaktivierung). Die *cis*-Inaktivierung, die durch Methylierung der entsprechenden Bereiche zur Stilllegung der Expression führt, kann zudem auch die Expression eventueller weiterer homologer Gene in *trans* beeinflussen (MATZKE und MATZKE 1998B).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Selektion von *Single-Copy* Linien in den meisten Fällen eine *cis*-Inaktivierung ausgeschlossen werden.

Nach einer Einteilung von MATZKE und MATZKE (1998B) kann die *trans* –Inaktivierung, je nach Mechanismus, in *Transkriptionales Gene Silencing* (TGS) und *Posttranskriptionales Gene Silencing* (PTGS) unterteilt werden. Die Transkriptionale Inaktivierung wird dabei durch Promotorhomologien ausgelöst und ist mit einer verstärkten Methylierung des Promotors assoziiert. Diese Art der Inaktivierung ist sehr persistent und wird auf die Nachkommen vererbt. Der Mechanismus der Inaktivierung beruht höchstwahrscheinlich auf einer DNA-DNA Interaktion, die bereits im Zellkern stattfindet (MATZKE und MATZKE 1998). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem *Posttranskriptionalen Gene Silencing*, auch als *Cosuppression* oder *Sense Suppression* bezeichnet (JORGENSEN 1995), um ein wesentlich dynamischeres System, das auf einer Methylierung der Protein-codierenden Region des Transgens beruhen kann. Dieser Prozess ist durch die Meiose revertierbar. Im Gegensatz zum TGS ist das PTGS durch eine normale transkriptionale Aktivität des Promotors gekennzeichnet, die Expressionsinstabilität wird in diesem Fall durch einen RNA Abbau im Cytoplasma hervorgerufen (MATZKE und MATZKE 1998). Ausgelöst wird dieser Prozess durch eine doppelsträngige RNA (dsRNA), wie an Untersuchungen des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al. 1998) gezeigt werden konnte. Die Autoren prägten den Ausdruck RNA Interferenz (RNAi) für diese Art der Geninhibition. Die Aufklärung der RNAi Maschinerie und möglicher natürlicher Funktionen stand in den letzten Jahren im Mittelpunkt vieler Untersuchungen (MARTENS und NELLEN 2002). Sie wurden größtenteils mit Hilfe von Zellextrakten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* aufgeklärt. So konnten ELBASHIR et

al. (2001) zeigen, dass kleine (20-23 bp) doppelsträngige RNAs, die auch als siRNAs bezeichnet werden, effektiv RNA-Interferenz in *Drosophila* auslösen können. BERNSTEIN et al. (2001) deckten den Ursprung der 21mere auf, als sie in *Drosophila* den Proteinkomplex Dicer aufspürten, der unter anderem eine RNase und eine Helikasedomäne enthält und so in der Lage ist, doppelsträngige RNA in siRNAs zu zerschneiden. Während in *Drosophila* sogenannte RISC Komplexe postuliert wurden (HAMMOND et al. 2000), nimmt beim PTGS in Pflanzen die Enzymfamilie der „cellular RNA-directed RNA polymerases“ (cRdRPs) eine Schlüsselrolle ein (SIJEN et al. 2001). Die RdRPs können von einer RNA Matrize komplementäre Stränge anfertigen, wodurch weitere dsRNAs generiert werden. Dies führt zu einer Vervielfältigung des Silencing Signals in Form von siRNAs, was zum einen zu der systemischen Ausbreitung des Signals in der Pflanze und zum anderen zur RNA-vermittelten DNA-Methylierung führen kann (WATERHOUSE et al. 2001). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind noch nicht alle Details des Mechanismus vollständig geklärt, doch auch neuere Untersuchungen an Tabak (FOJTOVA et al. 2003) zeigen, dass anhaltende Zellkultur der Pflanzen über 24 Monate zu einer Umschaltung des PTGS auf das nicht reversible TGS führen kann. In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess mit einer Hypermethylierung des Promotors korreliert war. Wie bereits postuliert, scheinen also beide Phänomene eine gemeinsame Basis zu haben.

Im Rahmen der Arbeit wurden die transgenen Pflanzen zunächst mittels RT-PCR und teilweise mittels Northern Blot analysiert, um erste Hinweise auf die Expression zu bekommen. Während sich mittels RT-PCR auch Transkripte im pg Bereich nachweisen lassen, sind für die hier angewendete Northern-Blot Methodik RNA Mengen im µg Bereich notwendig um deutbare Signale zu bekommen. Die Ergebnisse lassen also eine Aussage darüber zu, wieviel Transkript in den Pflanzen gebildet wird und somit eine Einschätzung darüber, um welchen Mechanismus es sich bei einem *Gene Silencing* handeln könnte. Da bei dem TGS bereits die Transkription blockiert ist, sollte, wenn dieses Phänomen zugrunde liegt, auch mittels RT-PCR kein Transkript nachweisbar sein, beim PTGS hingegen findet die RNA-Degradation erst im Cytoplasma statt (MATZKE und MATZKE 1998), die im Nukleus vorhandenen Transkripte sollten also mittels RT-PCR nachweisbar sein. Unter diesen Aspekten sollen im folgenden die RNA Ergebnisse in Zusammenhang mit den Ergebnissen der funktionalen Assays bewertet werden.

#### 4.2.1 Expression des *bar*-Gens in den transgenen Erbsenpflanzen

In der vorliegenden Arbeit wurde das *bar*-Gen erfolgreich als selektiver Marker in der *in-vitro* Kultur transgener Pflanzen eingesetzt. Bei den Nachkommenschaften einiger Transformanten zeigte sich jedoch zunehmend eine Expressionsinstabilität des *bar*-Gens.

Das *bar*-Gen gehört zu den meistgenutzten selektiven Markergenen (BRASILEIRO und ARAGAO 2001) in der Pflanzenbiotechnologie. Trotzdem ist es in der Anwendung nicht ganz unproblematisch. DE BLOCK et al. (1995) konnten zeigen, dass die Selektionswirkung von PPT in der Gewebekultur sehr stark vom physiologischen Zustand der Explantate abhängt. Auch in anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das *bar*-Gen, in Abhängigkeit vom jeweils eingesetzten Promotor, häufig Expressionsinstabilitäten unterliegt. Ein Grund für diese Problematik könnte der relativ hohe GC-Gehalt (68,3 %; Gen Bank accession no. X17220) des *bar*-Gens darstellen. MEYER und SAEDLER konnten 1996 zeigen, dass Unregelmäßigkeiten im GC Gehalt von DNA-Sequenzen ein Signal zur *de novo* Methylierung liefern können. Auch in einem Versuch von ELOMAA et al. (1995) konnte gezeigt werden dass ein relativ GC-reiches Gen aus Mais, im Vergleich zu einem Gen aus Gerbera, welches einen geringeren GC Gehalt aufwies, in transgenen Petunien wesentlich häufiger methyliert und stillgelegt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Pflanzen, die negative Ergebnisse im Leaf-Paint-Test lieferten, stichprobenartig RT-PCRs durchgeführt. Es konnte für alle Pflanzen eine Transkription des *bar*-Gens nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass es sich in den untersuchten Fällen vermutlich um PTGS handelt. Auch die Dynamik der Expressionsinstabilität, die sich darin zeigt, dass unter den Nachkommen von Erbsenpflanzen mit blockiertem *bar*-Gen auch herbizidresistente Pflanzen detektiert werden konnten, spricht für ein PTGS des *bar*-Gens. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit durch Pfropfung einiger herbizidsensitiver Sprosse auf herbizidresistente Unterlagen die Übertragbarkeit des Silencing Signals beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht den Ergebnissen von PALAUQUI et al. (1997), JORGENSEN et al. (1998), WASENEGGER und PELISSIER (1999), und FAGARD und VAUCHERET (2000).

Unter den Backbone tragenden Pflanzen mit multiplen Kopien hingegen, konnten Linien identifiziert werden, die von der Analyse der T 0 bis zur T 4 durchgängig herbizidsensitiv waren, also die Stilllegung des *bar*-Gens stabil auf die Nachkommen vererbt haben. Diese Pflanzen wurden zwar nicht näher untersucht, doch die Irreversibilität des Gene silencings

unter Einbeziehung der genetischen Konstitution der Pflanzen, spricht in diesem Fall für ein TGS. Weitere Analysen diesbezüglich wurden mit den Pflanzen bisher nicht durchgeführt, da sie dem Ziel der Arbeit nicht entsprachen.

Durch die Verwendung des Markergens *bar* mit dem Nopalinsynthase-Promotor (Material und Methoden 2.1.7.3) in allen Konstrukten ist davon auszugehen, dass in den Hybridpflanzen ein verstärktes Silencing des *bar*-Gens auftrat. Genau dieser Effekt war bei den Hybridpflanzen zu beobachten (Kapitel 3.5.1, 3). Es finden sich unter den Hybridpflanzen und deren Nachkommen nur sehr wenige herbizidresistente Pflanzen, unabhängig davon ob die Kreuzungseltern eine Expression des *bar*-Gens zeigten oder nicht. Erstaunlicherweise trat dieser Effekt schon in der F1-Generation auf, obwohl in dieser Generation durch die Hemizygotie der F 1 Pflanzen noch keine Vervielfachung des *bar*-Gens durchgeführt wurde. Eventuell kommt hier ein Positionseffekt der *bar*-Gene zum Tragen, der zu einem Gene Silencing in *trans* führt. Um dieses näher zu untersuchen müsste eine Bestimmung der Methylierungsmuster durchgeführt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten MITTELSTEN-SCHIED et al. (1998) an *Arabidopsis* zeigen. Neuere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass durch die Polyploidisierung transgener Arabidopsispflanzen eine irreversible Stilllegung des Hygromycin-Gens möglich war. Aus einer transgenen Linie wurden sechs unabhängige autotetraploide Linien hergestellt, von denen eine Linie weiterhin resistent war, zwei Linien zeigten Expressionsinstabilitäten des *hpt*-Gens und drei Linien waren sensitiv für Hygromycin. Auch durch Rückkreuzung der sensitiven Pflanzen mit Wildtyp Pflanzen und nachfolgenden Selbstungen konnte die Antibiotikaresistenz nicht wiederhergestellt werden. Der epigenetische Status der Genexpression, der durch die Polyploidisierung ausgelöst wurde, war also so stabil, dass er selbst durch die Reduktion der Kopien und der Chromosomen nicht verändert werden konnte, MITTELSTEN-SCHIED et al. (2003) bezeichnen diesen Vorgang als Paramutation.

Ob die Stilllegung des *bar*-Gens bei den Hybridpflanzen aus einem ähnlichen Mechanismus resultiert, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden, wird aber Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

#### 4.2.2 Expression der *pgip*-Gene in den transgenen Erbsenpflanzen

Auf Basis der RT-PCR konnte für fast alle untersuchten PGIP Klone eine Transkription nachgewiesen werden (Seite 63; Abb. 3.2). Lediglich der Klon 99-63-38,1 zeigte kein Transkript, deshalb muss bei diesem Klon von einem transkriptionalen *Gene Silencing* ausgegangen werden.

Die *Ri* PGIP-Linien 98-19-1,9 und 98-52-5,4 wurden mittels Northern Blot untersucht. Hier konnten Unterschiede in der Menge des PGIP-Transkriptes nachgewiesen werden. Während für die Linie 98-19-1,9 Signale detektiert werden konnten (Seite 64, Abb. 3.3) war es nicht möglich, für die Linie 98-52-5,4 bei Einsatz der gleichen RNA Menge (15 µg und 30 µg RNA) Expression festzustellen. Dieses Ergebnis wird durch die Ergebnisse des PGIP Assays bestätigt. Während die Pflanzen der Linien 98-19-1,9 eine deutliche Inhibierung auf verschiedene pilzliche Polygalakturonasen zeigten (Seite 83 – 85), konnten weder für die Pflanzenextrakte der Linie 98-52-2,5 noch der Linie 98-52-5,4 ein Effekt auf dieselben PGs verzeichnet werden (Seite 88). Dies spricht für ein *Gene Silencing* der PGIP Gene auf posttranskriptionaler Ebene.

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 4.2 alle Ergebnisse der PGIP-Linien zusammengefasst:

**Tab. 4.2 Ergebnisse der molekularen und funktionalen Analyse der PGIP Linien**

Linie	GOI	Southern Ergebnisse	RT PCR PGIP	Northern	PGIP Assay	Silencing Phänomen
98-19-1,9	<i>Ri</i> PGIP	2 Kopien	+	+	+	
98-52-2,5	<i>Ri</i> PGIP	2 Kopien	+	n. d.	-	PTGS
98-52-5,4	<i>Ri</i> PGIP	3 Kopien	+	-	-	PTGS
98-29-1,4-1	<i>Ad</i> PGIP	1 Kopie	+	n. d.	-	
99-55-1,2	<i>Ad</i> PGIP	1 Kopie	+	n. d.	-	
99-63-38,1	<i>Ad</i> PGIP	1 Kopie	-	n. d.	-	TGS

Für zwei der drei *Ad* PGIP-Linien konnte auf Basis der RT-PCR eine Transkription der PGIP Gene nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des PGIP Assays jedoch waren durchgängig negativ. Dies könnte bedeuten, dass auch diese PGIP Gene einem PTGS unterlagen, es könnte

aber auch sein, dass die verwendeten PGs nicht mit dem gebildeten PGIP kompatibel sind. DELORENZO et al. (2001) geben in ihrem Review einige Beispiele dafür, dass es sich bei der PG/ PGIP Bindung um eine sehr spezifische Interaktion handelt. Zu diesem Zeitpunkt kann nicht abschließend geklärt werden, welche Problematik auf die beiden *AdPGIP* Linien zutrifft.

Bei den in der Arbeit verwendeten *pgip*-Genen handelte es sich um Gene aus Kiwi und Himbeere. Hierbei handelt es sich, ebenso wie bei der Erbse, um dikotyle Pflanzen. Auf Basis des GC-Gehaltes sollte es hier also nicht zu Problemen der Expressionsstabilität kommen. Da jedoch auch die Erbse über *pgip*-Gene verfügt, könnte die Kosuppression in diesem Fall zum Tragen kommen. Die Sequenzhomologie zwischen den beiden zur Transformation verwendeten PGIPs beträgt nach einer Berechnung von DE LORENZO et al. (2001) 72 %. Entscheidender wäre die Homologie der rekombinanten Gene zum PGIP Gen aus Erbse. Da die Sequenz des Gens der Erbse jedoch bisher nur teilweise bekannt ist (NAKAMURA et al. 2003), ist ein vollständiger Sequenzvergleich zurzeit nicht möglich. Bei den Ausführungen von DE LORENZO et al. (2001) konnte die Gruppe der bisher sequenzierten Leguminosen-PGIPs jedoch deutlich von allen anderen dargestellten PGIPs (darunter auch *AdPGIP* und *RiPGIP*) abgegrenzt.

In einigen Veröffentlichungen wird diskutiert, wie hoch die Homologie zweier Gene sein muss, damit es zu einer Induktion von Silencing Effekten kommt. So konnte eine Kosuppression von Chitinasegenen in Tabak (KUNZ et al. 1996) durch eine Homologie der Gene von mehr als 60 % ausgelöst werden. Zur Kosuppression von basischen Glucanase Genen waren sogar mehr als 70 % Homologie nötig ( DE CARVALHO NIEBEL et al. 1995). In einigen Publikationen (SIJEN et al. 1996; ENGLISH et al. 1996) konnte gezeigt werden, dass bei diesem Prozess vor allem das 3' Ende der transkribierten Region von großer Bedeutung ist. Die neueren Erkenntnisse der RNA Interferenz bestätigen, dass zwar eine 100 % ige Homologie zur Anwendung des RNAi nötig ist, jedoch nur die eingesetzten siRNAs betreffend.

Eine weitere Fragestellung ergibt sich aus der großen Expressions-Variabilität einzelner Pflanzen der Linie 98-19-1,9. Wie unter Kapitel 3.2.2 (Seite 83 bis 85) gezeigt wurde, unterlag die Expression des *RiPGIP* Gens der Individualpflanzen einer großen Variabilität. Hinzu kam, dass mit fortschreitender Reifung der Pflanzen eine deutliche Reduktion der Expression einherging. Die Expressionsvarianz durch den Einfluss externer Faktoren kann in diesem Zusammenhang nicht ganz ausgeschlossen werden, die Pflanzen wurden jedoch unter

gleichen Bedingungen kultiviert und es konnten keine Unterschiede in Schädlingsbefall oder Pflanzenentwicklung beobachtet werden.

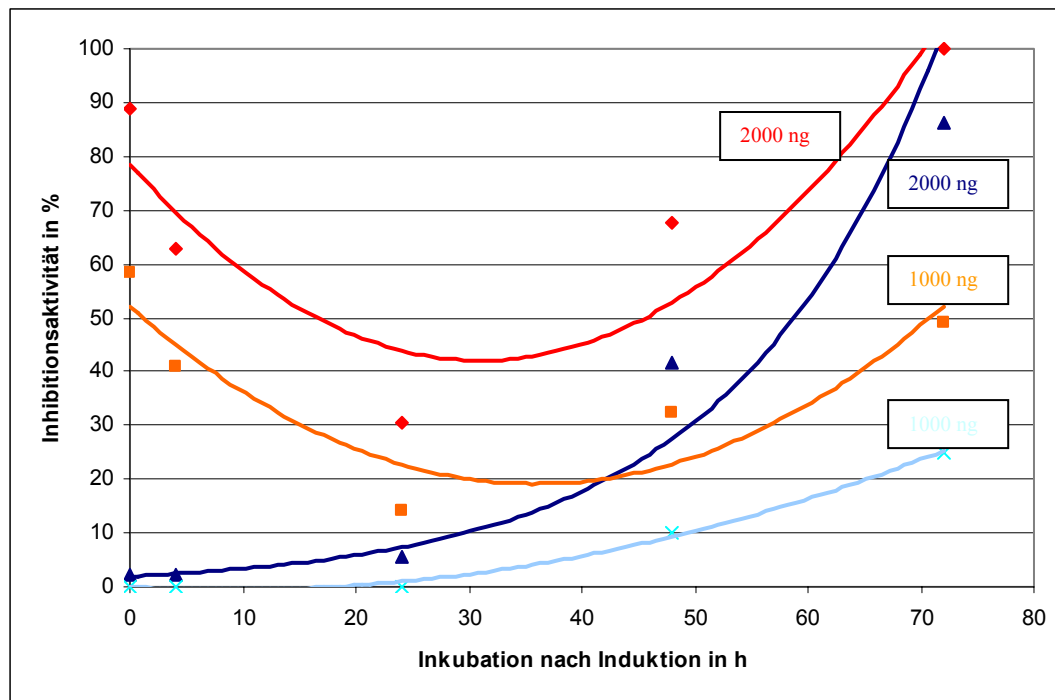
Die variable Expression innerhalb einer Population ist schon länger ein Thema der Populationsgenetik (RASMUSON, 1996; KASHI et al. 1997). Auch DE NEVE et al. (1999) konnten bei ihren Untersuchungen an fünf unabhängigen Arabidopsislinien zeigen, dass sich durch epigenetische Effekte sehr unterschiedliche Expressionsprofile ergeben können. So unterschied sich die Expressionsstärke der Einzelpflanzen einer homozygoten Linie um den Faktor 100. Bei zwei anderen untersuchten Linien konnte im Laufe der Pflanzenentwicklung eine drastische Reduktion des Antikörpergehaltes um den Faktor 50 bis 100 beobachtet werden. Parallel durchgeführte Methylierungsanalysen der Pflanzen ließen den Schluss zu, dass durch fortschreitende Methylierung des GOI im Laufe der Pflanzenentwicklung ein posttranskriptionales *Gene Silencing* ausgelöst wurde.

STEVENS et al. (2000) beobachteten bei der Antikörperproduktion in Tabak ebenfalls mit zunehmendem Alter der Pflanzen eine drastische Reduktion intakter Antikörper. Dies deckt sich mit Beobachtungen von DE NEVE et al. (1993) und VAN ENGELEN et al. (1994). STEVENS et al. (2000) führten dies jedoch auf eine proteolytische Degradation *in planta* zurück, die im Rahmen der Seneszenz-assoziierten Vorgänge in der Pflanze abläuft.

Da ähnliche Vorgänge auch durch Stress (HUFFACKER et al. 1990) ausgelöst werden können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Zusatzversuch durchgeführt. Dazu wurden die Blätter von transgenen Pflanzen der Linie 98-19-1,9 und Kontrollpflanzen mit UV behandelt und danach für bis zu 72 h inkubiert. Nach einer Zeit von 0, 4, 24, 48 und 72 Stunden wurden Pflanzenextrakte hergestellt und diese im PGIP Assay mit PG *Colletotrichum* eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1 graphisch aufgetragen.

Die roten Linien repräsentieren dabei die Ergebnisse für die transgenen Pflanzen und die blauen Linien stellen die Ergebnisse der Kontrollpflanzen dar.





**Abb. 4.1 Inhibierungsaktivität der Pflanzen gegenüber PG Colletotrichum nach Induktion mit UV.**

Die blauen Punkte und Linien bezeichnen die Ergebnisse der Kontrollpflanzen, die roten Punkte und Linien bezeichnen die Ergebnisse der transgenen Pflanzen (Linie 98-19-1,9)

In der Graphik ist der unterschiedliche Gehalt der Blattextrakte an PGIPs deutlich erkennbar. Da das *pgip*-Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors konstitutiv exprimiert wurde, war ohne Induktion oder vier Stunden nach der Induktion der größte Unterschied zwischen transgenen Pflanzen und nicht transgenen Kontrollpflanzen zu beobachten. Während die Inhibierungsaktivität der transgenen Pflanzen ohne Induktion bei 90 % (2000ng) bzw. 60 % (1000 ng) lag, zeigten die Kontrollpflanzen keine Inhibierung der PGs. Auch 4 Stunden nach Induktion war der Gehalt an PGIPs und damit die Inhibierungsaktivität mit 63 % und 40 % immer noch deutlich, während die Kontrollpflanzen unter 5 % lagen. 24 Stunden nach Inkubation fand bei den transgenen Pflanzen eine drastische Reduktion der Inhibierung auf 30 % bzw. 15 % statt, während die Kontrollpflanzen noch immer um 5 % lagen. Bei den transgenen Pflanzen schien sich die UV-Bestrahlung so auszuwirken, dass die Synthese der rekombinanten Proteine durch einen Defekt im Syntheseparat (Crosslinking) unterdrückt oder die PGIPs durch Proteolyse degradiert wurden. Erst 48 Stunden nach Induktion war eine Reaktion in den Kontrollpflanzen erkennbar, die Extrakte zeigten beim Einsatz von 2000 ng Gesamtprotein eine Inhibierung der PGs um 40 %. Sie lag aber immer noch um etwa 20-30 % unter den Werten der transgenen Pflanzen. Auch 72 Stunden nach der Induktion blieb ein Vorteil der transgenen Pflanzen von etwa 15 bis 20 % erhalten. Sowohl die Werte für die Transgenen als auch für die Kontrollpflanzen lagen jetzt bei nahezu 100 %.

Mit dem Versuch konnte gezeigt werden, dass die transgenen Pflanzen durch die konstitutive Expression der rekombinanten Proteine schon zu Beginn eines potentiellen Pathogenbefalls gerüstet waren, sofern eine Kompatibilität zwischen den PGIPs und den pilzlichen Polygalakturonasen bestand. Auch bei Einfluss externer Stressfaktoren blieb der Vorsprung der transgenen Pflanzen erhalten und konnte nicht durch endogene Prozesse der Kontrollpflanzen kompensiert werden.

#### **4.2.2.1 Resistenztestung der transgenen Erbsenpflanzen mit PGIP**

Die Ergebnisse der Resistenztests mit Pflanzen der *Ad* PGIP-Linien 98-29-1,4-1 und 99-55-1,2-3 zeigten im Bezug auf *Erysiphe pisi* keinen Effekt. Die Infektion mit *Uromyces pisi* jedoch ergab eine deutlich höhere Suszeptibilität der transgenen Pflanzen als der Kontrollpflanzen. So wurden die Pflanzen der Linie 98-29-1,4-1 in etwa 6 x stärker befallen als die Kontrollpflanzen. Bei den transgenen Pflanzen der Linie 99-55-1,2-3 war der Befallsgrad im Vergleich zur Kontrolle doppelt so hoch. Hier müsste im Detail geprüft werden ob es durch die Homologie des rekombinanten Gens mit endogenen PGIPs zu einer Kosuppression beider Gene kommt, wie schon bei anderen Pflanzen gezeigt werden konnte (KUNZ et al. 1996; DE CARVALHO NIEBEL et al. 1995).

In den Resistenztests mit Pflanzen der Linie 98-19-1,9 konnte sowohl bei *Erysiphe pisi* als auch bei *Uromyces pisi* ein leicht reduzierter Befall beobachtet werden. Die Mehltauinfektion konnte von 75% bei den Kontrollpflanzen auf ca. 65 % bei den Pflanzen der Linie 98-19-1,9 reduziert werden. Die Infektion mit *Uromyces pisi* konnte von 3,5 % auf ca. 2,3 % reduziert werden. Diese Werte bestätigen die mittels PGIP Assay detektierten Effekte auf pilzliche Polygalakturonasen. Im Hinblick auf die zuvor diskutierte Expressionsinstabilität der Individualpflanzen müssten sich jedoch auch hier detaillierte Analysen anschließen, um eine abschließende Bewertung durchführen zu können.

### 4.2.3 Expression des *vstI*-Gens in den transgenen Erbsenpflanzen

Das antibiotische Potenzial des Phytoalexins Resveratrol konnte bereits gegen ein breites Spektrum phytopathogener Pilze nachgewiesen werden (LANGCAKE und PRYCE 1976; HART 1981; ADRIAN et al. 1997; HOOS und BLAICH 1990; PAUL et al. 1998; SARIG et al. 1997). Es wird durch die Stilbensynthese als Produkt des *vstI*-Gens synthetisiert. Durch umfangreiche Untersuchungen homologer und heterologer Systeme konnte die Wirksamkeit des Resveratrols noch bestätigt werden. So konnten HAIN et al. (1993) durch den Transfer des *vstI* Gens in Tabak erstmals eine Erhöhung der Resistenz gegen *Botrytis cinerea* erreichen. Es folgten Versuche mit Raps (THOMZIK 1993), Reis (STARK-LORENZEN et al. 1997), Tomaten (THOMZIK et al. 1997), Gerste und Weizen (LECKBAND und LÖRZ 1998), bei denen ebenfalls erhöhte Resistenzen gegenüber phytopathogenen Pilzen erreicht werden konnten (siehe auch Tabelle 1.2 in der Einleitung).

Der Nachweis von Resveratrol ist mittels chromatographischer Techniken wie HPLC (HAIN et al. 1990; PEZET et al. 1994; JEANDET et al. 1997; HIPSKIND und PAIVA 2000; ROMERO-PEREZ et al. 2001; DOMINGUEZ et al. 2001; MALANOVA et al. 2001) oder Gaschromatographie-Massenspektroskopie (LUAN et al. 2000) möglich.

Die HPLC-Analysen von Pflanzenextrakten der Linien 98-48-8,2 und 99-67-8,1 ergaben, dass in den Erbsen kein freies, sondern zwei verschiedene Glykosid-Formen des Resveratrols vorlagen. Während eines der Glykoside genau der Form entsprach, die auch in transgenen Apfelpflanzen nachgewiesen werden konnte (SZANKOWSKI 2003), wurde in den Erbsen ein zusätzliches Glykosid nachgewiesen, welches aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert wurde.

Wie bereits SOTHEESWARAN und PASUPATHY (1993) zeigen konnten, kommt es in Pflanzen sehr häufig zu einer Derivatisierung von Resveratrol, die auch eine Bildung von speziesspezifischen Dimeren, Trimeren oder Tetrameren zur Folge haben kann. Diese glykosilierten Formen konnten bereits sowohl in *Vitis* Spezies (LANGCAKE und PRYCE 1976; WATERHOUSE und LAMUELA-RAVENTOS 1994; ROMERO-PEREZ et al. 2001) als auch bei transgenen Pflanzen (KOBAYASHI et al. 2000; HIPSKIND und PAIVA 2000) mit dem *vstI*-Gen nachgewiesen werden.

Welchen Effekt die Glykosylierung auf die antifungale Wirkung des Resveratrols hat, konnte bisher nicht eindeutig ermittelt werden. HIPSKIND und PAIVA (2000) konnten mit ihren Versuchen an Alfalfa zeigen, dass durch die Akkumulation des Resveratrolglykosids Trans-Resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glycopyranosid (Piceid) eine erhöhte Resistenz gegenüber *Phoma medicaginis* erreicht werden konnte. Bei einem Gehalt von 20  $\mu$ g Piceid pro g Frischgewicht

konnte eine Verminderung der Symptomausprägung um 50 % erreicht werden. Die inhibierende Wirkung des Resveratrolglykosids konnte zudem durch in-vitro Assays bestätigt werden. KOBAYASHI et al. (2000) hingegen detektierten einen Gehalt von bis zu 182 µg Piceid pro g Frischgewicht in transgenen Kiwipflanzen (Mittelwert ca. 48 µg) und konnten trotzdem keinen Effekt auf *Botrytis cinerea* beobachten.

Aus den Analysen der Erbsenpflanzen ergaben sich für die Blattextrakte Resveratrolglykosid-Gehalte, die im Bereich von 0,2 µg bis zu 5 µg pro g Frischgewicht lagen (Seite 90, Abb. 3.19, 20). Diese Ergebnisse lagen weit unter den Werten von KOBAYASHI et al. (2000) und HIPSKIND und PAIVA (2000). Welchen Einfluss das auf die Resistenz hat, kann zurzeit noch nicht abschließend bewertet werden. HAIN et al. (1993) konnten zeigen, dass der Resveratrolgehalt und die Resistenz miteinander korreliert sind. Um entsprechende Aussagen über die beiden transgenen Erbsenlinien treffen zu können, müssten detaillierte Versuche durchgeführt werden, bei denen die Befallsrate und der Resveratrolgehalt einzelner Pflanzen einer Linie parallel bestimmt werden sollten. Bisher war die Anzahl der untersuchten Proben sehr limitiert.

#### 4.2.3.1 Resistenztestung der transgenen Erbsenpflanzen mit *Vst1*

Die bisher durchgeführten Resistenztests mit *Erysiphe pisi* und *Uromyces pisi* zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Bei der Linie 98-48-8,2, für die Resveratrolgehalte bis zu 3,32 µg pro g Frischgewicht detektiert werden konnten, wurde kein Effekt auf *Erysiphe pisi* beobachtet. Der Befall mit *Uromyces pisi* hingegen war bei den transgenen Pflanzen stärker ausgeprägt als bei den nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Bei der Linie 99-67-8,1 die eine Kopie des Transgens trägt und für die Werte von ca. 5 µg Resveratrolglykosid pro g Frischgewicht detektiert wurden, konnte bei *Uromyces pisi* kein Effekt beobachtet werden. Die Infektion mit *Erysiphe pisi* hingegen war im Vergleich zu den Kontrollpflanzen leicht reduziert.

Es konnte also gezeigt werden, dass beide Linien, die das *vst1* Gen tragen, auch Resveratrol synthetisierten. Über den Effekt des *vst1*-Gens in Erbsen können jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Gerade im Hinblick auf die Expressionsinstabilität einzelner Pflanzen innerhalb einer Linie, die am Beispiel der *RiPGIP* Linie 98-19-1,9 diskutiert wurde, ist eine detaillierte Untersuchung der Pflanzen nötig, um hier eine abschließende Bewertung zuzulassen.

### 4.3 Untersuchungen der Hybridpflanzen und deren Nachkommenschaften

Sehr viele wichtige Ziele in der Pflanzenbiotechnologie und Pflanzenzüchtung können nicht mit der Integration eines Gens erreicht werden. Oft ist die Interaktion einer ganzen Reihe von Genen nötig um ein Zuchtziel zu erreichen. Dies trifft vor allem auf Produkte des „Molecular Farming“ zu, aber auch auf eine nachhaltige Resistenz gegenüber Pathogenen. Es wurden einige Versuche zur Kombination oder Pyramidisierung verschiedener rekombinanter Gene in Pflanzen unternommen.

Zum Erreichen des Ziels wurden sehr unterschiedliche Methoden wie die Retransformation, die Cotransformation, die Verwendung gekoppelter Transgene zur Transformation oder, wie in der vorliegenden Arbeit, die Kreuzung transgener Pflanzen angewendet (HALPIN et al. 2001).

Die Retransformation bietet sich vor allem bei Pflanzen an, bei denen eine Kombination von Genen mittels Kreuzung nicht möglich oder aufgrund langer Generationszeiten praktisch nicht möglich ist, wie bei Bäumen. So konnte die Ligninbiosynthese in Pappeln durch die Unterdrückung zweier Gene erfolgreich ausgeschaltet werden (LAPIERRE et al. 1999). Da sich nach jedem Transformationsschritt eine ausführliche Charakterisierung der potentiell transgenen Pflanzen auf DNA und Proteinebene anschließt, kann die Methode im Vergleich zur Kreuzung kaum Vorteile aufweisen. Hinzu kommt, dass lang anhaltende in-vitro Kultur Phasen einen negativen Effekt auf die Expressionsstabilität ausüben können (FOJTOVA et al. 2003) und bei jeder Transformation ein neues Markergen zur Selektion benötigt wird.

Die Cotransformation konnte bisher in sehr vielen Spezies und mit verschiedenen Transformationsmethoden angewendet werden. Untersuchungen zur Integration der T-DNA (ARAGAO et al. 1996; DE BUCK et al. 1998; MAQBOL und CHRISTOU 1999) zeigten jedoch, dass in 40 bis 70 % der transgenen Pflanzen die verschiedenen T-DNAs gemeinsam an einer Position im Chromosom integriert waren und dass die Integration multipler Kopien eines Gens bei dieser Transformationsmethode sehr häufig auftrat (HADI et al. 1996). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Faktoren die Expressionslevel und -stabilität der rekombinanten Gene erheblich reduzieren können. So konnte bei der Cotransformation von Arabidopsis mit zwei Genen bei nur 9 % der transgenen Pflanzen eine Expression beider Gene nachgewiesen werden (POIRIER et al. 2000). Hinzu kommt, dass es durch die Segregation der verschiedenen Gene in den Nachkommenschaften zum Verlust einzelner Transgene kommen kann. Die Verwendung gekoppelter Gene soll vor allem die Koordination der Expression verschiedener Gene gewährleisten. Auch wenn dies in einigen Arbeiten erreicht werden konnte (VAN ENGELEN et al. 1994), zeigen doch sehr viele Ergebnisse, dass

die Expressionslevel unterschiedlicher Gene auch bei sehr enger Kopplung unabhängig voneinander sind (NAGY et al. 1985; AN 1986; JONES et al. 1987). Die Methode gerät ausserdem durch die limierte Größe der transferierbaren T-DNA sehr schnell an ihre Grenzen. Im Vergleich zu den anderen Methoden scheint der klassische Weg der Kreuzung zunächst sehr zeit- und arbeitsaufwendig zu sein, da sich an die Transformation der Pflanzen eine Linienetablierung anschließt, die mehrere Generationen benötigt. Im Hinblick auf die bereits erläuterte Problematik der Expressionsstabilität in transgenen Pflanzen ist eine sorgfältige Auswahl der einzelnen Kreuzungseltern jedoch unumgänglich. Die Möglichkeit der Auswahl perfekter Elternlinien ist aber nur bei der Kreuzung in jeder Phase des Gene stacking gegeben.

Aus den oben genannten Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die klassische Methode der Kreuzung angewendet. Dadurch war es möglich durch eine detaillierte Charakterisierung der transgenen Linien, Elitelinien als Eltern auszuwählen. Wie man anhand der Ergebnisse verfolgen kann, ist jedoch eine relativ große Anzahl unabhängiger Klone notwendig um geeignete Elternlinien etablieren zu können, die möglichst viele der in Kapitel 3.4 genannten Kriterien erfüllen sollten. In der vorliegenden Arbeit wurden letztlich nur zwei Elternlinien aus 14 charakterisierten Linien zur Kreuzung verwendet. Es ist also zu Beginn eines solchen Züchtungsprogramms nötig eine Vielzahl unterschiedlicher Klone herzustellen und zu charakterisieren.

Die Ergebnisse für die Hybride aus der RiPGIP Linien 98-19-1,9 und der Vst1-Linie 99-67-8,1 zeigten, dass die Herbizidresistenz, wenn sie in einer solchen Konstellation vorliegt wie in diesem Fall, durch die Akkumulation gleicher Gene und Promotoren verloren geht. Ähnliche Ergebnisse konnten auch MITTELSTEN-SCHEID et al. (2003) durch eine Polyploidisierung von Arabidopsis zeigen. Im Hinblick auf die GOI jedoch, wirkte sich die Kreuzung positiv auf die Expression der Transgene aus. Die Hybridpflanzen und deren Nachkommen zeigten durchgängig hohe Expressionsraten des *Ri pgip*-Gens und damit hohe Inhibierungsaktivitäten (Seite 101 und folgende) in Bezug auf das verwendete PG von *Colletotrichum acutatum*. Inwieweit hierbei die Homozygotie/Hemizygotie in Bezug auf das Transgen zum Tragen kommt, ist zur Zeit noch nicht abschließend zu bewerten, da es sich bei den Pflanzen zum größten Teil um hemizygote Pflanzen handelt. In der Literatur gibt es jedoch einige Beispiele dafür, das sich dieser Faktor erheblich auf die Expression auswirken kann (Übersicht bei JAMES et al. 2002). Die Expression des *vst1*-Gens konnte bisher nur näherungsweise durch eine Transkriptionsanalyse mittels RT-PCR untersucht werden. Die Werte für die RT-PCR waren jedoch durchweg positiv und lassen auf eine Expression des *vst1*-Gens hoffen. Hier

werden sich weitere detaillierter Analysen anschließen, sobald homozygote Kombinationslinien etabliert wurden. Vor allem in Hinblick auf die Resistenztestung ist ein stabiler genetischer Hintergrund von großer Bedeutung für die Interpretierbarkeit der Ergebnisse.

#### **4.4 Ausblick**

Zunächst sollten aus den bereits erstellten Hybriden, homozygote Kombinationslinien etabliert werden. Die Untersuchung dieser Pflanzen mittels funktionaler Assays und die Ermittlung von Resistenzdaten, könnte Aufschluss über die Erfolgsaussichten weiterer Kreuzungen geben.

Durch eine Charakterisierung weiterer transgener Erbsenklone könnte eine Basis für neue Kreuzungen geschaffen werden. Es sollten auch andere antifungale Gene einbezogen werden um das Resistenzspektrum der Erbse durch unterschiedliche Mechanismen zu erweitern.

Die Expressionsstabilität innerhalb der Linien sollte detaillierter untersucht und durch Methylierungsanalysen unterlegt werden. In Verbindung damit wäre auch eine bessere Interpretation der Ergebnisse aus Resistenztests möglich.

In Bezug auf die PGIP Pflanzen wäre eine Ausweitung der Kollektion pilzlicher Polygalakturonasen wünschenswert. Auch hier wäre die Abstimmung der im Resistenztest eingesetzten Pathogene und der im PGIP Assay eingesetzten PGs sinnvoll.

Zudem wäre eine Bestimmung der Expression mittels Antikörper, also die Durchführung von Western-Blot-Analysen hilfreich zur Interpretation der funktionalen Ergebnisse.

Die Resveratrolbestimmung mittels HPLC oder alternative Methoden müsste am Lehrgebiet Molekulargenetik etabliert werden um ebenso wie für die PGIP Pflanzen eine kontinuierliche und detaillierte Analyse der vst1 Pflanzen zu ermöglichen.

Etablierung einer inversen PCR zur Unterstützung der Segregationsanalyse. Methoden wie das PCR Walking (COTTAGE et al. 2001) oder das T-DNA Fingerprinting (THEUNS et al. 2002) eröffnen hier neue Ansätze zur schnellen Identifizierung und Etablierung entsprechender *Single-Copy* Linien.

## 5 Literatur

- Abu-Goukh, A.A.; Strans, L.L.; Labavitch, J.M. (1983) Development-related changes in decay susceptibility and polygalacturonase inhibitor content of "Bartlett" pear fruit. *Physiol. Plant Pathol.* 23:101-109.
- Adrian, M.; Jeandet, P.; Veneau, J.; Weston, L. ; Bessis, R. (1997) Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J. Chem. Ecol.* 23: 1689-1702.
- AEP European association for grain legume research.  
<http://www.grainlegumes.com>
- Ambrose, M.J.; Green, F.N. (1991) A review of pisum genetic resources and germplasm utilisation. *Aspects of Applied Biology* 27: 234-251.
- An, G. (1986) Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of the nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiol.* 81: 86-91.
- Annis, S.L.; Goodwin, P.H. (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 1-14
- Arachi, H.; Kimura, Y.; Okuda, H.; Baba, K.; Kozawa, M.; Arachi, S. (1982) Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. In lipid metabolism. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 1766-1770.
- Aragao, F.J.L.; Barros, L.M.G.; Brasileiro, A.C.M.; Ribeiro, S.G.; Smith, F.D.; Sanford, J.C.; Faria, J.C.; Rech, E.L. (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cotransformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 93: 142-150.
- Australisches Gesundheitsministerium  
<http://www.health.gov.au>
- Bean, S.J.; Gooding, P.S.; Mullineaux, P.M.; Davies, D.R. (1997) A simple system for pea transformation. *Plant Cell Rep.* 16: 513-519



- Becker, D.; Kemper, E.; Schell, J.; Masterson, R. (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 20(6): 1195-1197.
- Berger, D.K.; Oelofse, D.; Arendse, M.S.; Du Plessis, E.; Dubery, I.A. (2000) Bean polygalacturonase inhibitor protein-1 (PGIP-1) inhibits polygalacturonases from *Stenocarpella maydis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 57: 5-14.
- Bergmann, C.; Ito, Y.; Singer, D.; Albersheim, P.; Darvill, A.G. (1994) Polygalacturonase-inhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors and fungal infection. *Plant J.* 5: 625-634.
- Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M.; Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- Birch, R.G. (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 297-326.
- Blixt, S.; Folkesson, D.; Gottschalk, W. (1991) Use of mutations for chromosome mapping and breeding in *Pisum*. In: Tsuchiya, T.; Gupta, P.K. (Hrsgb.) *Chromosome engineering in Plants, Genetics, Breeding, Evolution*. Elsevier, Amsterdam-Oxford-NewYork-Tokio, Kap.2.
- Böhmer, P. (1995) Entwicklung eines transformationskompetenten Regenerationssystems für Protoplasten der Erbse (*Pisum sativum* L.) Dissertation vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover.
- Bourdon, V.; Ladbrooke, Z.; Wickham, A.; Lonsdale, D.; Harwood, W. (2002) Homozygous transgenic wheat plants with increased luciferase activity do not maintain their high level of expression in the next generation. *Plant Sci.* 163: 297-305.
- Bouwman, A.J. (1991) Developments in pea breeding and targets for the future. *Aspects of applied biology* 27: 221-229.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brasileiro, A.C.M.; Aragao, F.J.L. (2001) Marker genes for in vitro selection of transgenic plants. *J. Plant Biotechnol.* 3(3): 113-121.

- Bravo-Angel, A.M.; Hohn, B.; Tinland, B. (1998) The omega sequence of VirD2 is important but not essential for efficient transfer of T-DNA by *Agrobacterium tumefaciens*. MPMI 11(1): 57-63.
- Bressani, R.; Elias, L.G. (1988) Seed quality and nutritional goals in pea, lentil, faba bean and chickpea breeding: 381-404. In: Summerfield, R.J. (ed.), World Crops: Cool Season Food Legumes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Breyne, P.; Gheysen, G.; Jacobs, A.; Van Motagu, M.; Depicker, A. (1992) Effect of T-DNA configuration on transgene expression. Mol. Gen. Genet. 235: 389-396.
- Broer, I. (1989) Expression des Phosphinotricin-N-Acetyltransferase-Gens aus *Streptomyces viridochromogenes* in *Nicotiana tabacum*. Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld.
- Buchanan, S.G.S.; Gay, N.J.; (1996) Structural and functional diversity in the leucin-rich repeat family of proteins. Prog. Biophys. Mol. Biol. 65: 1-44.
- Cervone, F.; De Lorenzo, G.; Pressey, R.; Darvill, A.G.; Albersheim, P. (1990) Can *Phaseolus* PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? Phytochemistry 29: 447-449.
- Chareonpornwattana, S.; Thara, K.V.; Wang, L.; Datta, S.K.; Panbangred, W.; Muthukrishnan, S. (1999) Inheritance, expression and silencing of a chitinase transgene in rice. Theor. Appl. Genet. 98: 371-378.
- Chowrira, G.M.; Cavaleer, T.D.; Gupta, S.K.; Lurquin, P.F.; Berger, P.H. (1998) Coat protein-mediated resistance to pea enation mosaic virus in transgenic *Pisum sativum* L. Transgenic Res. 7: 265-271.
- Christou, P. (1992) Pea (*Pisum sativum* L.). In: Genetic Engineering and in vitro Culture of Crop Legumes. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster – USA.
- Cluster, P.D.; O'Dell, M.; Metzloff, M.; Flavell, R.B. (1996) Details of T-DNA structural organization from transgenic petunia population exhibiting co-suppression. Plant Mol. Biol. 32: 1197-1203.
- Colonna, P.; Lourdin, D.; Buleon, A. (1994) Potential industrial uses of pea starches. In: Grain Legumes, AEP, Leterme, P. (ed.) 2: 10-11.

- Cornelissen, B.J.C. und Melchers, L.S. (1993) Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant Physiol.* 101: 709-712.
- Cottage, A.; Yang, A.; Maunders, H.; de Lacy R.C.; Ramsay, N.A. (2001) Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR-Walking. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 321-327.
- Council of the European Communities (2001) Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing directive 90/220/EEC OJ No L106/1-38, 17 April 2001.
- Coutos-Thevenot, P.; Poinssot, B.; Bonomelli, A.; Yean, H.; Breda, C.; Buffard, D.; Esnault, R.; Hain, R.; Boulay, M. (2001) In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbensynthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promotor. *J Exp. Bot.* 52(358): 901-910.
- Dambroth, M. (1986) Stand und Perspektiven der Nutzung "Nachwachsende Rohstoffe" aus landwirtschaftlicher Sicht. In: BMFT, BML (Hrsgb.) *Nachwachsende Rohstoffe Expertenkolloquium*, Bd.1: 21-26.
- Davies, D.R.; Berry, G.J.; Heath, M.C.; Dawkins, T.C.K. (1985) Pea (*Pisum sativum* L.): 147-198. In: Summerfield, R.J. and Roberts, E.H., (eds.), William Collins Sons and Co. Ltd, London, UK.
- Davies, D.R.; Hamilton, J.; Mullineaux, P. (1993) Transformation of peas. *Plant Cell Rep.* 12: 180-183.
- De Block, M.; De Sonville, A.; Debrouwer, D. (1995) The selection mechanism of phosphinothricin is influenced by the metabolic status of the tissue. *Planta* 197: 619-626.
- De Buck, S.; Jacobs, A.; Van Montagu, M.; Depicker, A. (1998) *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of *Arabidopsis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. *MPMI* 11: 449-457.
- De Buck, S.; De Wilde, C.; Van Montagu, M.; Depicker, A. (2000A) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of Transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breed.* 6: 459-468

- De Buck, S.; de Wilde, C.; Van Montagu, M.; Depicker, A. (2000B) Determination of the T-DNA transfer and the T-DNA integration frequencies upon cocultivation of *Arabidopsis thaliana* root explants. *MPMI* 13: 658-665.
- De Carvalho Niebel, F.; Frendo, P.; Van Montagu, M.; Cornelissen, M.(1995) Post-transcriptional cosuppression of  $\beta$ -1,3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. *Plant Cell* 7: 347-358.
- Dehio, C.; Schell, J. (1994) Identification of plant genetic loci involved in a post-transcriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5538-5542.
- De Kathen, A.; Jacobsen H.-J. (1990) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Pisum sativum* using binary and cointegrate vectors. *Plant Cell Rep.* 9: 276- 279.
- De Kathen, A. (1993) *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Pisum sativum* L.: Zellkompetenz und Transfer relevanter Gene. Dissertation vom Fachbereich Biologie der Universität Bonn.
- De Kathen, A.; Jacobsen, H.-J. (1993) Transformation of pea (*Pisum sativum* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (Hrsg) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 23, *Plant Protoplasts and Genetic Engineering IV*, Springer Verlag Berlin – Heidelberg
- De Kathen, A; Jacobsen, H.-J. (1995) Cell competence for *Agrobacterium*-mediated DNA-transfer in *Pisum sativum* L. *Transgenic research* 4: 184-191
- De Lorenzo, G.; Cervone, F.; Bellincampi, D.; Caprari, C.; Clark, A.J. (1994) Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 396-399.
- De Lorenzo, G.; Castoria, R.; Bellincampi, D.; Cervone, F. (1997) Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: *The Mycota. V. Plant Relationships*, Part B. Carroll, G.C.; Tudzynski, P. (ed); 61-83; Berlin: Springer Verlag.
- De Lorenzo, G.; D'Ovidio, R.; Cervone, F. (2001) The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 313-335.

- De Lorenzo, G.; Ferrari, S. (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(4): 295-299.
- DeNeve, M.; De Loose, M.; Jacobs, A.; Van Houdt, H.; Kaluza, B.; Weidle, U.; Van Montagu, M.; Depicker, A. (1993) Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res.* 2: 227-237.
- De Neve, M.; De Buck, S.; Jacobs, A.; Van Montagu, M.; Depicker, A. (1997) T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from ligation of separate T-DNAs. *Plant J.* 11: 15-29.
- De Neve, M.; Van Houdt, H.; Bruyns, A.-M.; Van Montagu, M.; Depicker, A. (1998) Screening for transgenic lines with stable and suitable accumulation levels of a heterologous protein. In: C. Cunningham & A.J.R. Porter (Eds.), *Recombinant proteins from plants: Production and isolation of clinically useful compounds*, (Methods of Biotechnology, Vol. 3), pp. 203-227. Humana Press, Totowa, NJ.
- De Neve, M.; De Buck, S.; De Wilde, C.; Van Houdt, H.; Strobbe, I.; Jacobs, A.; Van Montagu, M.; Depicker, A. (1999) Gene silencing results in instability of antibody production in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 260: 582-592.
- Depicker, A.; Van Montagu, M. (1997) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin Cell Biol.* 9: 373-382.
- Dercks, W.; Creasy, L.L. (1989) The significance of stilben phytoalexins in the *Plasmopara viticola* – grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 189-202.
- Desiderio, A.; Aracri, B.; Lecki, F.; Mattei, B.; Salvi, G.; Tigelaar, H.; Van Roeckel, J.S.C.; Baulcombe, D.C.; Melchers, L.S.; De Lorenzo, G.; Cervone, F. (1997) Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 852-860.
- Dixon, R.A.; Lamb, C.J.; Masoud, S.; Sewalt, V.J.H.; Paiva, N.L. (1996) Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense response – a review. *Gene (Amst.)* 179: 61-71.

- Dominguez, C.; Guillen, D.A.; Barroso, C.G. (2001) Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *J. Chromatogr. A.* 918: 303-310.
- D'Ovidio, R.; Mattei, B.; Roberti, S.; Bellincampi, D. (2004) Polygalacturonases, polygalacturonases-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696(2): 237-244.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15.
- Elbashir, S.M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200.
- Ellis, T.H.N. (1993) The nuclear genome. In Casey R. and Casey D.R. (Hrsgb.) *Peas : Genetics, molecular biology and biotechnology*. CAB International, 13-47.
- Elmayan, T.; Vaucheret, H. (1996) Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J.* 9: 787-797.
- Elomaa, P.; Helariutta, Y.; Griesbach, R.J.; Kotilainen, M.; Seppänen, P.; Teeri, T.H. (1995) Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Mol. Gen. Genet.* 248: 649-656.
- English, J.J.; Mueller, E.; Baulcombe, D.C. (1996) Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8: 179-188.
- Evans, I.J.; Greenland, A.J. (1998) Transgenic approaches to disease protection: application of antifungal proteins. *Pestic. Sci.* 54: 353-359.
- Fagard, M.; Vaucheret, H. (2000) Systemic silencing signal(s). *Plant Mol. Biol.* 43: 285-293.
- Ferrari, S.; Vairo, D.; Ausubel, F.M.; Cervone, F.; De Lorenzo, G. (2003) Tandemly duplicated arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell* 15: 93-106.

- Fettig, S.; Hess, D. (1999) Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines. *Transgenic Res.* 8: 179-189.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Fojtova, M.; Van Houdt, H.; Depicker, A.; Kovarik, A. (2003) Epigenetic switch from posttranscriptional to transcriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. *Plant Physiol.* 133: 1-11.
- Gahakwa, D.; Maqbool, S.B.; Fu, X.; Sudhakar, D.; Christou, P.; Kohli, A. (2000) Transgene rice as a system to study the stability of transgene expression: multiple heterologous transgenes show similar behaviour in diverse genetic backgrounds. *Theor. Appl. Genet.* 101: 288-299.
- Gelvin, S.B. (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 227-232.
- Gelvin, S.B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 223-256.
- Gheysen, G.; Angenon, G.; Van Motagu, M. (1998) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications. In: K. Lindsey (Ed.); *Transgenic Plant research*, pp. 1-33. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Gottschalk, W. (1983) Seed protein production in *Pisum* mutants and recombinants. In: *Seed Proteins*, Martinus Nijhoff, Den Haag. 377-402.
- Gottschalk, W.; Wolff G. (1983) General aspects of mutation breeding with regard to the improvement of seed storage substances. In: Gottschalk, W.; Wolff, G. (Hrsgb.) *Induced mutations in plant breeding*, Monographs on theoretical and applied genetics 7, Springer-Verlag Berlin Heidelberg NewYork Tokio: 178-181.
- Grant, J.E.; Cooper, P.A.; McAra, A.E.; Frew, T.J. (1995) Transformation of peas (*Pisum sativum* L.) using immature cotyledons. *Plant Cell Rep* 15: 254-258.

- Grant, J.E.; Cooper, P.A. (2002) Genetic transformation in pea. In: Jaiwal P.K.; Singh, R.P. (eds) Focus on biotechnology, Vol 10B, Applied genetics of leguminosae biotechnology. Kluwer, Dordrecht, 23-35.
- Grant, J.E.; Thomson, L.M.J.; Pither-Joyce, M.D.; Dale, T.M.; Cooper, P.A. (2003) Influence of *Agrobacterium tumefaciens* strain on the production of transgenic peas (*Pisum sativum* L.). Plant Cell Rep 21: 1207-1210.
- Grayer, R.J.; Kokubun, T. (2001) Plant fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. Phytochemistry, 56: 253-263.
- Griga, M.; Novak, F.J. (1990) Pea (*Pisum sativum* L.). In: Bajaj Yps (Hrsgb.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.10: Legumes and Oilseed Crops I, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 65-99.
- Gritton, E.T. (1980) Field pea. In: Fehr, W.R. and Hadley, H.H. (eds), Hybridization of Crop Plants. (pp. 347-356) American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Grover, A.; Gowthaman, R. (2003) Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Current Science 84(3): 330-340.
- Haberlandt, G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber Akad Wiss Wien, Math Nat Kl, Abt 2b, 111: 69-91.
- Hadi, M.Z.; McMullen, M.D.; Finer, J.J. (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. Plant Cell Rep. 15: 500-505.
- Hain, R.; Bieseler, B.; Kindl, H.; Schröder, G.; Stöcker, R. (1990) Expression of a stilben synthase in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of phytoalexin resveratrol. Plant Mol. Biol. 15: 325-335
- Hain, R.; Reif, H.-J.; Krause, E.; Langebartels, R.; Kindl, H.; Vornam, B.; Wiese, W.; Schmeltzer, E.; Schreier, P.H.; Stöcker, R.H.; Stenzel, K. (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature (London) 361: 153-156.
- Hagedorn, D.J. (2001) Pea diseases. In: Kraft, J.M. and Pflieger, F.L. (eds), Compendium of pea diseases and pests, Second edition. The American Phytopathological Society.



- Halperin, W. (1986) Attainment and retention of morphogenic capacity in vitro. In: Vasil, I.K. (eds) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press Inc., New York 3: 3-47.
- Halpin, C.; Barakate, A.; Askari, B.M.; Abbott, J.C.; Ryan, M.D. (2001) Enabling technologies for manipulating multiple genes on complex pathways. *Plant Mol. Biol.* 47: 295-310.
- Hammerschmidt, R. (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years ? *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 285-306.
- Hammond, S.M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hart, J.H. (1981) Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu Rev. Phytopathol.* 19: 437-458.
- He, X.-Z.; Dixon, R.A. (2000) Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. *Plant cell* 12: 1689-1702.
- Heldt, H.W. (1996) Pflanzenbiochemie (Kapitel 16). Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Herron, S.R.; Benen, J.A.; Scavetta, R.D.; Visser, J.; Jurnak, F. (2000) Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8762-8769.
- Hipskind, J.D.; Paiva, N.L. (2000) Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol. Plant Microb. Interact.* 13(5): 551-562.
- Hobbs, S.L.A.; Warkentin, T.D.; De Long, C.M.O. (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant mol. Biol.* 21: 17-26.
- Hock, B.; Elstner, E.F. (Hrsg.) (1995) Schadwirkungen auf Pflanzen 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford.
- Hoos, G.; Blaich, R. (1990) Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *J. Phytopathol.* 129: 102.110.

- Huffacker, R.C. (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol.* 116: 199-231.
- Iglesias, V.A.; Moscone, E.A.; Papp, I.; Neuhuber, F.; Michalowski, S.; Phelan, T.; Spiker, S.; Matzke, M.; Matzke, A.J.M. (1997) Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* 9: 1251-1264.
- Ingelbrecht, I.; Van Houdt, H.; Van Montagu, M.; Depicker, A. (1994) Post-transcriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10502-10506.
- Ingham, J.L. (1976) 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnut (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry* 15: 1791-1793.
- Ingham, J.L. (1978) Isoflavonoid and stilbene phytoalexins of the genus *Trifolium*. *Biochem. Sys. Ecol.* 6: 217-223.
- Jach, G.; Görnhardt, B.; Mundy, J.; Logemann, J.; Pinsdorf, E.; Leah, R.; Schell, J.; Mass, C. (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant Journal* 8: 97-109
- Jacobsen, H.-J. (1992) Biotechnology applied to grain legumes – current state and prospects. *Proc 1<sup>st</sup> European Conference on Grain Legumes, Angers, Frankreich*: 99-103
- Jakowitsch, J.; Papp, I.; Moscone, E.A.; van der Winden, J.; Matzke, M.; Matzke, A.J.M. (1999) Molecular and cytogenetic characterisation of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant Journal* 17: 131-140.
- James, V.A.; Avart, C.; Worland, B.; Snape, J.W.; Vain, P. (2002) The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 104: 553-561.
- Jeandet, P.; Breuil, A.C.; Adrian, M.; Weston, L.A.; Debord, S.; Meunier, P.; Maume, G.; Bessis, R. (1997) HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal. Chem.* 69: 5172-5177.

- Johnston, D.J.; Ramanathan, V.; Williamson, B. (1993) A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other microorganisms. J. Exp. Bot. 44: 971-976.
- Jones, J.D.G.; Gilbert, D.E.; Grady, K.L.; Jorgensen, R.A. (1987) T-DNA structure and gene expression in petunia cells transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. Mol. Ge. Genet. 207: 478-485.
- Jones, A.L.; Johansen, I.E.; Bean, S.J.; Bach, I.; Maule, A.J. (1998) Specificity of resistance to pea seed borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (Nib) gene. J. Gen. Vir. 79: 3129-3137.
- Jongedijk, E.; Tigelaar, H.; Van Roekel, J.S.C.; Bres-Vloemans, S.A.; Dekker, I.; Van den Elzen, P.J.M.; Cornelissen, B.J.C.; Melchers, L.S. (1995) Synergistic activity of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 85: 1173-180.
- Jorgensen, R.A. (1995) Cosuppression, flower color patterns and metastable gene expression states. Science 268: 686-691.
- Jorgensen, R.A.; Atkinson, R.G.; Forster, R.L.S.; Lucas, W.J. (1998) An RNA-based information superhighway in plants. Science 279: 1486-1487.
- Kashi, Y.; King, D.; Soller, M. (1997) Simple sequence repeats as a source of a quantitative genetic variation. Trends Genet. 13: 74-78.
- Kiesecker, H. (2000) Entwicklung eines *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfersystems für Kichererbsen (*Cicer arietinum* L.) Dissertation vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover.
- Kim, J.-K.; Duan, X.; Wu, R.; Seok, S.J.; Boston, R.S.; Jang, I.-C.; Eun, M.-Y.; Nahm, B.H. (1999) Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance *bar* gene. Mol. Breed. 5: 85-94.
- Kobayashi, S.; Ding, C.K.; Nakamura, Y.; Nakajima, I.; Matsumoto, R. (2000) Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). Plant Cell Rep. 19: 904-910.

- 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 integration. *Plant J.* 11: 945-957.
- Kunz, C.; Schöb, H.; Stam, M.; Kooter, J.M.; Meins, F.Jr. (1996) Developmentally regulated silencing and reactivation of tobacco chitinase transgene expression. *Plant J.* 10: 437-450.
- Lamb, C.J.; Ryals, J.A.; Ward, E.R.; Dixon, R.A. (1992) Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Bio-Technology (N.Y.)*, 10: 1436-1445.
- Langcake, P.; Pryce R.J. (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 77-86.
- Lapierre, C.; Pollet, B.; Petit-Conil, M.; Toval, G. ; Romero, J. ; Pilate, G. ; Leple, J.-C. ; Boerjan, W. ; Ferret, V. ; De Nadai, V.; Jounain, L. (1999) Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial craft pulping. *Plant Physiol.* 119: 153-163.
- Leckband, G.; Lörz, H. (1998) Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1004-1012.
- Liang, H.; Zheng, J.; Duan, X.; Sheng, B.; Jia, S.; Wang, D.; Ouyang, J.; Li, J.; Tian, W.; Hain, R.; Jia, X. (2000) A transgenic wheat with a stilbene synthase gene resistant to powdery mildew obtained by biolistic method. *Chinese Sci. Bull.* 45(7): 634-638.
- Linn, F.; Heidmann, I.; Saedler H.; Meyer, P. (1990) Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: Role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Mol. Gen. Genet.* 222: 329-336.
- Liu, Y.G.; Mitsuwaka, N.; Oosumi, T.; Whittier, R.F.; (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8: 457-463.
- Lottspeich, F; Zorbas, H.(Hrsg) (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin.

- Luan, T.; Li, G.; Zhang, Z. (2000) Gas-phase postderivatization following solid-phase microextraction for rapid determination of trans-resveratrol in wine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 424: 19-25.
- Malanova, S.; Montelongo, F.J.G.; Perez, J.P.; Rodriguez-Delgado, M.A. (2001) Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 428: 245-253.
- Makashewa, R.K. (1983) *The pea*, Oxonian Press Pvt.Ltd., New Delhi.
- Maqbol, S.B.; Christou, P. (1999) Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Mol. Breed.* 5: 471-480.
- Markovic, O.; Janecek, S. (2001) Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence structural features, specificities and evolution. *Protein Engineering* 14: 615-631.
- Martens, H.; Nellen, W. (2002) Epigenetisches Genesilencing: RNA Interferenz und Antisense RNA. *BIOspektrum* 4/02 (8): 351-354.
- Martineau, B.; Voelker, T.A.; Sanders, R.A. (1994) On defining T-DNA. *Plant Cell* 6: 1032-1033.
- Matzke, M.A.; Matzke, A.J.M. (1991) Differential inactivation and methylation of a transgene in plants by two suppressor loci containing homologous sequences. *Plant Mol. Biol.* 16: 821-830.
- Matzke, A.J.M.; Matzke, M.A. (1998A) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 142-148.
- Matzke, M.A.; Matzke, A.J.M. (1998B) Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence response. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 94-103.
- Melchers, L.S.; Stuiver, M.H. (2000) Novel genes for disease resistance breeding. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 147-152
- Meyer, P.; Saedler, H. (1996) Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 23-48.

- Mittelsten Scheid, O.; Afsar, K.; Paszkowski, J. (2003) Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Nature Gen.* 34(4): 450-454.
- Morton, R.L.; Schroeder, H.E.; Bateman, K.S.; Chrispeels, M.J.; Armstrong, E.; Higgins, T.J.V. (2000) Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(8): 3820-3825.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Muskens, M.; Vissers, A.; Mol, J.; Kooter, J. (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol. Biol.* 43: 243-260.
- Nadolska-Orczyk, A.; Orczyk, W. (2000) Study of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.). *Mol. Breeding* 6: 185-194.
- Nagy, F.; Morelli, G.; Fraley, R.T.; Rogers, S.G.; Chua, N.-H. (1985) Photoregulated expression of a pea *rbcS* gene in leaves of transgenic plants. *EMBO J.* 12: 3063-3068.
- Nakamura, N.; Marutani, M.; Sanematsu, S.; Toyoda, K.; Inagaki, Y.-S.; Shiraishi, T.; Ichinose, Y. (2003) Phylogenetic classification of dof-type transcription factors in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Biotechnol.* 20: 247-253.
- Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Neuhaus, J.-M.; Ahl-Goy, P.; Hinz, U.; Flores, S.; Meins, F. Jr. (1991) High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol. Biol.* 16: 141-151.
- Nielsen, K.K.; Mikkelsen, J.D.; Kragh, K.M.; Bojsen, K. (1993) An acidic class III chitinase in sugar beet: induction by *Cercospora beticola*, characterization and expression in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 495-506.

- Nirenberg, H.I.; Feiler, U.; Hagendorn, G. (2002) Description of *Colletotrichum lupini* com. Nov. in modern terms. *Mycologia* 94, 307-320.
- Nuss, L.; Mahe, A.; Clark, A.J.; Grisvard, J.; Dron, M.; Cervone, F.; De Lorenzo, G. (1996) Differential accumulation of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) mRNA in two near isogenic lines in *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48: 83-89.
- Palauqui, J.-C.; Elmayan, T.; Pollien, J.M.; Vaucheret, H. (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non silenced scions. *EMBO J.* 16: 4738-4745.
- Paul, B.; Chereyathmanjiyil, A.; Masih, I.; Chapuis, L.; Benoit, A. (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 165: 65-70.
- Peach, C.; Velten, J. (1991) Transgene expression variability(position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol. Biol.* 17: 49-60.
- Perrin, J.; Vaquero, C.; Gerrard, I.; Sack, M.; Drossard, J.; Stöger, E.; Christou, P.; Fischer, R. (2000) Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFV)antibody used in cancer diagnosis and therapy. *Molecular Breeding* 6: 345-352.
- Pezet, R.; Pont, V.; Cuenat, P. (1994) Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* 663: 191-197.
- Poirier, Y.; Ventre, G.; Nawrath, C. (2000) High-frequency linkage of co-expressing T-DNA in transgenic *Arabidopsis thaliana* transformed by vacuum-infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* 100: 487-493.
- Polowick, P.L.; Quandt, J.; Mahon, J.D. (2000) The ability of pea transformation technology to transfer genes into peas adapted to western Canadian growing conditions. *Plant Sci.* 153: 161-170.
- Polowick, P.L. ; Vandenberg, A.; Mahon, J.D. (2002) Field assessment of outcrossing from transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Transgenic Research* 11: 515-519.

- Potrykus, I. (1991) Gentransfer auf Getreide: Eine Abschätzung und Bewertung. Arbeitsmaterialien zur Technologiefolgenabschätzung und –bewertung der modernen Biotechnologie, Universität Hamburg.
- Powell, A.L.T.; Stotz, H.U.; Labavitch, J.M.; Bennett, A.B. (1994) Glycoprotein inhibitors of fungal polygalacturonases. In: Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. Vol. 3. Daniels, M.J.; Downie, J.A.; Osbourn, A.E. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 399-402.
- Powell, A.L.T.; Van Kan, J.; ten Have, A.; Visser, J.; Greve, L.C.; Bennett, A.B.; Labavitch, J.M. (2000) Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 942-950.
- Punja, Z.K. (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. Can. J. Plant Pathol. 23:216-235.
- Punja, Z.K.; Raharjo, S.H.T. (1996) Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. Plant Dis. 80: 999-1005.
- Puonti-Kaerlas, J.; Eriksson, T.; Engström, P. (1990) Production of transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. Theor. Appl. Genet. 80: 246-252.
- Puonti-Kaerlas, J.; Eriksson, T.; Engström, P. (1992) Inheritance of a bacterial hygromycin phosphotransferase gene in the progeny of primary transgenic pea plants. Theor. Appl. Genet. 84: 443-450.
- Puonti-Kaerlas, J. (1993) Genetic Engineering in Pea Crop Improvement. Acta Agric. Scand., Sect.B, Soil and Plant Sci., 43: 65-73.
- Ramanathan, V.; Veluthambi, K. (1995) Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T<sub>L</sub>-DNA. Plant Mol. Biol. 28: 1149-1154.
- Ramanathan, V.; Simpson, C.G.; Thow, G.; Iannetta, P.P.M.; McNicol, R.J.; Williamson, B. (1997) cDNA cloning and expression of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) from red raspberry (*Rubus idaeus*). J.Exp.Bot. 48(311): 1185-1193.



- Rasmuson, M. (1996) Polygenes revisited. *Hereditas* 125: 1-9.
- Raybould, A.F. (1999) Transgenes and agriculture – going with the flow? *Trends Plant Sci* 4: 247-248
- Register, J.C.; Peterson, D.J.; Bell, P.J.; Bullock, W.P.; Evans, I.J.; Frame, B.; Greenland, A.J.; Higgs, N.S.; Jepson, I.; Jiao, S.; Lewnau, C.J.; Sillick, J.M.; Wilson, H.M. (1994) Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* 25: 951-961.
- Reymond, P.; Weber, H.; Damond, M.; Farmer, E.E. (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-720.
- Romero-Perez, A.; Lamuela-Raventos, R.M.; Andres-Lacueva, C.; De La Torre-Boronat, M.C. (2001) Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *J. Agri. Food Chem.* 49: 210-215.
- Saalbach, I.; Giersberg, M.; Conrad, U. (2001) High-level expression of a single chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds. *J. Plant Physiol.* 158: 529-533.
- Salmeron, J.M.; Vernooij, B. (1998) Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 347-352
- Sarig, P.; Zuthki, Y.; Monjauze, A.; Lisker, N.; Ben-Arie, R.; (1997) Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50: 337-347.
- Schenk, P.M.; Kazan, K.; Wilson, I.; Anderson, J.P.; Richmond, T. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11655-11660.
- Schichtherle, H. (1989) Pfahlbauten: die frühe Besiedlung des Alpenvorlandes. *Spektrum der Wissenschaften*, 6-89: 72-85.
- Schroeder H.E.; Schotz A.H.; Wardley-Richardson T.; Spencer D.; Higgins T.J.V. (1993) Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol* 101:751–757.

- Sela-Buurlage, M.B.; Ponstein, A.S.; Bres-Vloemans, S.A.; Melchers, L.S.; Van den Elzen, P.M.J.; Cornelissen, B.J.C. (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101: 857-863.
- Seppänen, S.-K.; Syrjälä, L.; von Weisenberg, K.; Teeri, T.H.; Paajanen, L.; Pappinen, A. (2004) Antifungal activity of stilbenes in in vitro bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase. *Plant Cell Rep.* 22: 584-593.
- Sijen, T.; Wellink, J.; Hiriart, J.-B.; van Kammen, A. (1996) RNA-mediated virus resistance: role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant cell* 8: 2277-2294.
- Sijen, T.; Fleenor, J.; Simmer, F.; Thijssen, K.L.; Parrish, S.; Timmons, L.; Plasterk, R.H.; Fire, A. (2001) On the role of RNA amplification in ds-RNA-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476.
- Sillero, J.C.; Rubiales, D. (2002) Histological characterization of resistance to *Uromyces viciae-fabae*. *Faba Bean Phytopathology* 92(3): 294-299.
- Simpson, C.G.; MacRae, E.; Gardner, R.C. (1995) Cloning of a polygalacturonase-inhibiting protein from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Plant Gene Register (PGR 95-037)*. *Plant Physiol* 108: 1748.
- Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. In: *Methods in Enzymology Volume 299 section 14: Polyphenols and Flavonoids* p. 152-178 Academic Press.
- Slinkard, A.E.; Bascur, G.; Hernandez-Bravo, G. (1994) Biotic and abiotic stresses of cool season food legumes in the western hemisphere. 195-200. In: Muehlbauer, F.J. and Kaiser, W.J. (eds.), *Expanding the production and use of cool season food legumes*, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Somers, D.A.; Samac, D.A.; Olhoft, P.M. (2003) Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol.* 131: 892-899
- Sotheeswaran, S.; Pasupathy, J. (1993) Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry* 32(5): 1083-1092.

- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Mol Biol* 98: 503-517
- Spencer, T.M.; O'Brien, J.V.; Start, W.G.; Adams, T.R.; Gordon-Kamm, W.J.; Lemaux, P.G. (1992) Segregation of transgenes in maize. *Plant Mol. Biol.* 18: 201-210.
- Smith, C.J.S.; Watson, C.F.; Bird, C.R.; Ray, J.; Schuch, W.; Grierson, D. (1990) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 224: 477-481.
- Snoad, B. (1985) The need for improved pea-crop plant ideotypes. In: Hebblethwaite, P.D.; Heath, M.C.; Dawkins, T.C.K. (Hrsgb), *The pea crop*, Butterworth, London: 31-41.
- Stark-Lorenzen, P.; Nelke, B.; Hänbler, G.; Mühlbach, H.P.; Thomzik, J.E. (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Cell Rep.* 16: 668-673.
- Staskawicz, B.J.; Ausubel, F.M.; Baker, B.J.; Ellis, J.G.; Jones, J.D.G. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
- Stevens, L.; Stoopen, G.M.; Elbers, I.J.W; Molthoff, J.W.; Bakker, H.A.C.; Lommen, A.; Bosch, D.; Jordi, W. (2000) Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 124: 173-182.
- Stöger, E.; Williams, S.; Keen, D.; Christou, P. (1998) Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression. *Transgenic Res.* 7: 463-471.
- Strittmatter, G.; Wegner, D. (1993) Genetic engineering of disease and pest resistance in plants: present state of the art. *Z. Naturforsch.* 48: 673-688.
- Szankowski, I. (2002) Entwicklung und Analyse transgener Apfelpflanzen mit dem vst1-Gen aus *Vitis vinifera* L. und dem PGIP-Gen aus *Actinidia deliciosa*. Dissertation des Fachbereiches Biologie der Universität Hannover.
- Szankowski, I.; Briviba, K.; Fleischhut, J.; Schönherr, J.; Jacobsen, H-J.; Kiesecker, H. (2003) Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Rep.* 22: 141-149.

- Talhinhas, P.; Sreenivasaprasad, S.; Neves-Martins, J.; Oliveira, H. (2002) Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology* 92(9) 986.
- Taylor, R.J.; Secor, G.A. (1988) An improved diffusion assay for quantifying the polygalacturonase content of *Erwinia* culture filtrates. *Phytopathology* 78: 1101-1103.
- Theuns, I.; Windels, P.; De Buck, S.; Depicker, A.; Van Bockstaele, E.; De Loose, M. (2002) Identification and characterization of T-DNA inserts by T-DNA fingerprinting. *Euphytica* 123: 75-84.
- Thomma, B.P.H.J.; Nelissen, I.; Eggermont, K.; Broekaert, W.F. (1999b) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* 19: 163-171.
- Thompson, C.J.; Movva, N.R.; Tizard, R.; Cramer, R.; Davies, J.E.; Lauwereys, M.; Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygrosopicus*. *EMBO J.* 6(9): 2519-2523.
- Thomzik, J.E. (1993) Transformation in oilseed rape *Brassica napus* L. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol 23. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 171-182.
- Thomzik, J.E.; Stenzel, K.; Stöcker, R.; Schreier, P.H.; Hain, R.; Stahl, D.J. (1997) Synthesis of grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 265-278.
- Timmerman-Vaughan, G.M.; Pither-Joyce, M.D.; Cooper, P.A.; Russell, A.C.; Goulden, D.S.; Butler, R.; Grant, J.E. (2001) Partial resistance of transgenic peas to Alfalfa mosaic virus under greenhouse and field conditions. *Crop Sci.* 41: 846-853.
- Tinland, B. (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* 1(6): 178-184.
- Toubart, P.; Desiderio, A.; Salvi, G.; Cervone, F.; Daroda, L. (1992) Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant J.* 2: 367-373.

- Vain, P.; Afolabi, A.S.; Worland, B.; Snape, J.W. (2003) Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/pSoup. *Theor. Appl. Genet.* 107: 210-217.
- Vanden Bosch, K.; Stacey, G. (2003) Summaries of legume genomics projects from around the globe. *Community resources for crops and models. Plant Physiol.* 131: 840-865.
- van den Elzen, P.J.M.; Jongedijk, E.; Melchers, L.S.; Cornelissen, B.J.C. (1993) Virus and fungal resistance: from laboratory to field. *Philos. Trans. R.Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 342: 271-278.
- van der Graaff, E.; den Dulk-Ras, A.; Hooykaas, P.J.J. (1996) Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol. Biol.* 31: 677-681.
- van der Krol, A.R.; Mur, L.A.; Beld, M.Mol, J.N.M.; Stuitje, A.R. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of genes copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299.
- van Engelen, F.A.; Schouten, A.; Molthoff, J.W.; Roosien, J.; Salinas, J.; Dirkse, W.G.; Schots, A.; Bakker, J.; Gommers, F.J.; Jongasma, M.A.; Bosch, D.; Stiekema, W.J. (1994) Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 26: 1701-1710.
- Vaucheret, H.; Beclin, C.; Fagard, M. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114: 3083-3091.
- Walton, J.D. (1994) Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 1113-1118.
- Walters, D.A.; Vetsch, C.S.; Potts, D.E.; Lundquist, R.C.; (1992) Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 189-200.
- Wang, Y.; Nowak, G.; Culley, C.; Hadwiger, L.A.; Fristensky, B. (1999) Constitutive expression of a pea defense gene *DRR206* confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 410-418.
- Wassenegger, M.; Pelissier, T. (1999) Signalling in gene silencing. *Trends Plant Sci.* 4: 207-209.

- Waterhouse, A.L.; Lamuela-Raventos, R.M. (1994) The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* 37(2): 571-573.
- Waterhouse, P.M.; Wang, M.-B.; Lough, T. (2001) Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* 411: 834-842.
- Wenck, A.; Czako, M.; Kanevski, I.; Marton, L. (1997) Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 34: 913-922.
- Williamson, B.; Johnston, D.J.; Ramanathan, V.; McNicol, R.J. (1993) A polygalacturonase inhibitor from immature raspberry fruits: a possible new approach to grey mold control. *Acta Hort.* 352: 601-605.
- Wolters, A.-M.A.; Trindadae, L.M.; Jacobsen, E.; Visser, R.G.F. (1998) Fluorescence in situ hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyse complex T-DNA loci in potato. *Plant J.* 13: 837-847.
- Yang, H.A. and Sweetingham, M.W. (1998) The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose. *Australian Journal of Agricultural research* 49, 1213-1223.
- Yanofsky, M.F.; Porter, S.G.; Young, C.; Albright, L.M.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. (1986) The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 47: 471-477
- Yao, C.; Conway, W.S.; Ren, R.; Smith, D.; Ross, G.S.; Sams, C.E. (1999) Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Mol. Biol.* 39: 1231-1241.
- Yin, Z.; Wang, G.L. (2000) Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. *Theor. Appl. Genet.* 100: 461-470.
- Zhu, Q.; Maher, E.A.; Masoud, S.; Dixon, R.A.; Lamb, C.J. (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio-technology (N.Y.)* 12: 807-812.

Zook, M.; Hohn, T.; Bonnen, A.; Tsuji, J.; Hammerschmidt, R. (1996) Characterization of novel sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco expressing a fungal sesquiterpene synthase. *Plant Physiol.* 112: 311-318.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hannover, 28. Mai 2004

Andrea Richter



## Curriculum Vitae

### Persönliche Angaben

**Name:** **Andrea Richter geb.Lübke**  
 Date of birth: 06th of January 1970  
 Place of birth: Langenhagen  
 Marital status: Married  
 Children: Paul Richter, born 09<sup>th</sup> of March 2002  
 Carl Richter, born 29<sup>th</sup> of June 2004

### Schulbildung

1976 – 1980	Grundschule Krähenwinkel (bei Langenhagen)
1980 – 1981	Orientierungsstufe in Langenhagen
1981 – 1982	Orientierungsstufe in Schwarmstedt
1982 – 1989	Gymnasium Walsrode
Mai 1989	Abitur am Gymnasium Walsrode

### Berufsausbildung

August 1989  
 – Januar 1992 Ausbildung zur Biologielaborantin  
 Celler Pflanzen und Gewebelabor

### Berufserfahrung

Februar 1992 – September 1995	Arbeit als Biologielaborantin bei Wolfgang Bock Gartenbau- betrieb Pflanzenexport KG in Bremen Massenvermehrung von <i>Spathiphyllum</i> und <i>Anthurium</i> unter sterilen Bedingungen, Organisation der Arbeit von Teilzeitkräften, Kalkulation der Produktionsmengen
seit August 2000	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrgebiet Molekulargenetik der Universität Hannover

### Studium

1995 – 2000	Studium der Gartenbauwissenschaften Universität Hannover
Juli 2000	Diplomprüfung im Studiengang Gartenbau mit der Gesamtnote sehr gut
November 2004	Promotion am Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover mit „magna cum laude“

