

1 Einleitung

1.1 Agronomische Bedeutung von Leguminosen

Pflanzliche Samen stellen die Hauptquelle für Proteine in der menschlichen Ernährung dar. Viele Samen sind reich an Protein, Stärke und Öl und werden entweder direkt verzehrt oder in prozessierter Form (z.B. durch Fermentation) bzw. über die Verfütterung in der Tierproduktion konsumiert. Im Jahr 1990 belief sich der Proteinverbrauch weltweit auf 137 Mio. Tonnen, davon stammten 65% direkt aus Pflanzen und 35% aus der Tierproduktion (FAO 1990). Wirtschaftlich gesehen ist pflanzliches Protein im Vergleich zu tierischem Protein günstiger in der Produktion, dem Transport und der Lagerhaltung; zudem lässt sich die Umweltbelastung vermeiden, die durch hohe Mengen an Stickstoffausscheidungen verursacht wird, welche infolge der ineffizienten Umwandlung von pflanzlichem in tierisches Protein entsteht.

Den Leguminosen (*Fabaceae*) steht in der Regel durch ihre Symbiose mit Knöllchenbakterien (Rhizobien-Arten) ausreichend Stickstoff zur Verfügung, so dass sie im Vergleich mit anderen Kulturpflanzen eine hohe Biomassenproduktion und einen besonders hohen Proteingehalt in den Samen aufweisen (Huber 1988). Vorherrschend sind hierbei Albumine und Globuline, während Prolamine und Gluteline (als typische Samenproteine der *Poaceae*) eher zurücktreten (Osborne 1924). Allen Leguminosen gemeinsam ist ein hoher Lysingehalt. Typisch ist außerdem ein hoher Anteil an nicht proteingebundenen Aminosäurederivaten, deren Vorkommen spezifisch für bestimmte Arten ist.

Man unterscheidet großsamige Leguminosenarten (Körnerleguminosen, *grain legumes*), deren Samen in verschiedenster Form verzehrt bzw. verfüttert werden, von kleinsamigen Arten (*pastures*), bei denen vor allem die vegetativen Teile der Pflanzen, hauptsächlich als Grünfütter oder Gründüngung, Verwendung finden. Zur ersten Gruppe zählen Sojabohne (*Glycine max*), Erbse (*Pisum sativum*), Linse (*Lens culinaris*), Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), Acker- oder Fababohne (*Vicia faba*), Kichererbse (*Cicer arietinum*), Erdnuß (*Arachis hypogaea*) und Lupine (*Lupinus spec.*). Zur Gruppe der kleinsamigen Arten gehören u.a. Luzerne (*Medicago spec.*) und verschiedene Kleearten wie Weißklee (*Trifolium repens*), Rotklee (*Trifolium pratense*), Stein- und Hornklee (*Lotus japonicus* und *Lotus corniculatus*).

Die Fababohne weist im Vergleich mit den übrigen Körnerleguminosen das höchste Ertragspotential und den zweithöchsten Proteingehalt nach der Sojabohne auf (Müntz *et al.* 1986). Die Samen von *Vicia faba* enthalten – je nach Genotyp - zwischen 27 und 34% Protein. Bis zu 80% davon sind Globuline, die aufgrund ihrer Sedimentationseigenschaften in 7S Viciline und 11S Legumine eingeteilt werden. Diese beiden Speicherproteine sind charakterisiert durch hohe Anteile von Arginin, Glutamin und Asparagin, die als Stickstoffquelle während der Samenkeimung dienen. Da Globuline nur

geringe Mengen an schwefelhaltigen essentiellen Aminosäuren enthalten, ist die biologische Wertigkeit der Proteine von *Vicia faba* aus ernährungsphysiologischer Sicht für monogastrische Lebewesen als Alleinfutter nicht ausreichend. Bei der Verfütterung von reinem *Vicia faba* - Mehl kann bei Schweinen und Geflügel der Bedarf an den genannten Aminosäuren nur zu 50-60% gedeckt werden (Hanelt *et al.* 1978). Um ein optimales Wachstum bei Tieren zu erreichen, sollte deren Futter 1,6–1,9% Methionin enthalten (Tabe & Higgins 1998).

Antinutritive Inhaltsstoffe können die Verwertbarkeit des verfügbaren Proteins herabsetzen. In der Familie der Leguminosen wird eine vergleichsweise hohe Anzahl von antinutritiven Substanzen gebildet, so dass der unprozessierte Verzehr roher Samen zu Gesundheitsschäden führen kann. Zwei nur in Ackerbohnen und Wicken vorkommende Glucoside - Vicin und Convicin – können Favismus, eine ernährungsbedingte Stoffwechselstörung (hämolytische Anämie), bei Menschen und Tieren bewirken (Jeroch *et al.* 1993).

Lectine und Proteinase-Inhibitoren sind weitere Bestandteile der Proteinfraction, welche die Verwertbarkeit der Samenspeicherproteine einschränken können. Lectine zeichnen sich durch eine zellagglutinierende Wirkung aus, die mit den Bindungsstellen dieser Proteine für Ca^{2+} und Mg^{2+} zusammenhängen. Ihre Funktion wird im Schutz gegen Tierfraß und in der spezifischen Rhizobien-Nodulation gesehen (Diaz *et al.* 1989, Murdock *et al.* 1990); die Wirkung von roh verzehrten Lectinen auf monogastrische Lebewesen ist toxisch (Pusztai *et al.* 1979).

Proteinase-Inhibitoren haben eine trypsinhemmende Wirkung und verursachen Wachstumsdepressionen; sie sind aktiv gegen Säugetiere und Insekten, jedoch nicht gegen Pflanzen (Powers & Whittaker 1977).

1.2 *Vicia faba*

Die Gattung *Vicia* umfasst ca. 150 Arten krautiger Pflanzen in gemäßigten und subtropischen Gegenden der nördlichen und südlichen Hemisphäre (Maxted 1993).

Die Faba- oder Ackerbohne (*Vicia faba*) ist die wirtschaftlich interessanteste Vertreterin dieser Gattung, die unter geeigneten Bedingungen eine hohe Ertragsfähigkeit aufweist. Mit einem Ertrag von 3,7 Millionen Tonnen im Jahr 2002 (FAO) befindet sie sich weltweit unter den zehn ökonomisch wichtigsten Körnerleguminosen. Die grössten Erzeuger im Jahr 2002 waren China mit 1,6 Millionen Tonnen, gefolgt von Äthiopien (0,45), Ägypten (0,44), Frankreich (0,28) und Australien (0,2). Allerdings weist die Fababohne im Gegensatz zu Sojabohne oder Erbse weniger globale als regionale Bedeutung auf, ihr Schwerpunkt liegt vor allem in Ländern wie Ägypten und den Magrheb-Staaten (Algerien, Marokko, Tunesien), wo *Vicia faba* mehr als 50% der Anbaufläche für Leguminosenarten einnimmt. In der ehemaligen DDR lag *Vicia faba* hinsichtlich ihres Körner- und Rohproteinertrags je Flächeneinheit ebenfalls an der Spitze aller Körnerleguminosen

(Müntz *et al.* 1972). 1998 wurden in Deutschland auf 26.000 ha Ackerbohnen angebaut; damit lag sie hier an zehnter Stelle der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen hinter Erbse und Sonnenblume.

Die Fababohne zählt zu den ältesten bekannten Kulturpflanzen. Funde des Anbaus der Ackerbohne im Mittelmeerraum konnten zurück bis ins Neolithikum 5000-7000 v. Chr. datiert werden (Schultze-Motel 1972, Zohary & Hopf 1988, Duc 1997). Ihr Anbau verbreitete sich während der Bronzezeit nach Norden und erreichte während der jüngeren Eisenzeit Mitteldeutschland. In Ägypten ist die Fababohne seit der 12. Dynastie (18. Jh. v.Chr.) nachweisbar, in China seit Ende des 13. Jahrhunderts n. Chr. (Körper-Grohne 1987). *Vicia faba* war lange wichtigste Nahrungspflanze Mitteleuropas, bis sie von der Kartoffel und der Gartenbohne nach und nach verdrängt wurde (Hegi 1964).

Da *Vicia faba* anfällig gegenüber einer Vielzahl biotischer und abiotischer Stressfaktoren ist, kommt es häufig zu starken Ertragsschwankungen. Vor allem Pilzbefall mit *Botrytis fabae* oder *Ascochyta fabae* führen zu starken Ernteeinbußen. In Ostafrika sind Viruserkrankungen verbreitet und in Nordafrika und Westasien treten verstärkt Nematoden und Befall mit dem parasitierenden Sommerwurz (*Orobanche crenata*) auf. Die eingeschränkte Kälte- und Trockenheitstoleranz bedeutet ebenfalls eine Einschränkung des Ertrags und damit der wirtschaftlichen Verwertbarkeit von *Vicia faba* (Birch 1985, Bond 1987, Frauen 1989).

Der züchterischen Verbesserung der Fababohne durch Einkreuzung verwandter Wildarten steht die relative genetische Isolation dieser Art entgegen (Ramsay und Pickersgill 1986). Diese beruht vermutlich auf dem Jahrtausende währenden Ausleseprozess als Kulturpflanze und der damit einhergehenden Einengung des genetischen Pools (von Kittlitz 1985). Die systematische Einordnung in die Verwandtschaft mit morphologisch ähnlichen Arten ist noch immer umstritten (Cubero 1981, Maxted *et al.* 1991). Wurde *Vicia faba* lange zur morphologisch ähnlichen *Narbonensis*-Gruppe gerechnet, rücken neuere phylogenetische Arbeiten unter Einbeziehung von RFLP-Analysen (Potokina *et al.* 1999) oder Isozymmustern (Jaaska 1997) sowie vergleichende Untersuchungen der *trnL*-Sequenz der Chloroplasten von Fennel *et al.* (1998) *Vicia faba* weiter von der *Narbonensis*-Gruppe ab und ordnen sie näher bei *Lathyrus* ein.

1.3 Züchtungsziele

Aktuelle Entwicklungen, u. a. die BSE (*bovine spongiforme encephalopathy*) - Krise haben dazu geführt, dass heimisch erzeugbare, pflanzliche Proteinquellen wieder stärker nachgefragt werden. Die Eigenversorgung mit pflanzlichen Proteinträgern für den Einsatz in Mischfuttermitteln liegt in der Europäischen Union unter 30% (Stand 1998), mit der Tendenz zu einer steigenden Nachfrage nach Proteinfuttermitteln von jährlich ca. 3%.

Die Bedeutung, die der Fababohne international für die Welternährung beigemessen wird, kommt ebenfalls in der seit einigen Jahren intensivierten züchterischen Bearbeitung

dieser Pflanze z. B. im ICARDA-Institut (International Center for Agricultural Research in Dry Areas, Aleppo/Syrien) zum Ausdruck.

An züchterischen Fortschritten ist in den letzten Jahren eine Verbesserung der Kornertragsleistung und der Mähdruschfähigkeit erreicht worden. Ein Stabilityp wie z. B. die Sorte Mythos ist ebenso dreschbar wie Getreide. Als weitere wichtige Zuchtziele für eine erfolgreiche Ausdehnung des Ackerbohnenanbaus sind zu nennen:

- Überwindung der Ertragsinstabilität durch Verbesserung der Trockenresistenz und der Winterfestigkeit; die Einbringung von Resistenzen gegen Pilzkrankheiten wie *Botrytis fabae* und *Ascochyta fabae*, sowie gegen tierische Schädlinge wie die schwarze Bohnenlaus und den Blattrandkäfer (Lechner 1959, Bond 1987), sowie die Herstellung Glyphosat-resistenter Sorten, um die Überwucherung mit *Orobanche* zu kontrollieren (Padgett *et al.* 1995)
- die Erzeugung von männlich sterilen Pflanzen für die Hybridzüchtung, da der Heterosis-effekt bei der Fababohne eine signifikante Verbesserung und Stabilisierung des Ertrags mit sich bringt (Bond *et al.* 1966, EEC *joint faba bean test* 1985-87 in: Duc 1997)
- Erhöhung der Qualität der Samen durch Kombination von hoher Saatgutqualität (d. h. Keimfähigkeit, Gesundheit, Besatz) mit wertvollen Inhaltsstoffen: eine Steigerung des Gesamtproteingehalts auf etwa 35% plus die Verbesserung der biologischen Wertigkeit des Proteins durch Erhöhung des Methionin- und Cysteinanteils auf den in der Tierfütterung benötigten Standardlevel; Reduzierung antinutritiver Faktoren (Bond 1976).

Die Samen der Ackerbohne können größere Mengen an Tanninen (Phenolderivate) enthalten, die die Proteinverdaubarkeit herabsetzen. Der Tanningehalt kann je nach Sorte und Umweltbedingungen stark variieren. Da das Vorkommen von antinutritiven Substanzen in den Samen vorwiegend auf einfacher monogener Vererbung basiert, konnten *zero*-Tannin und nahezu *zero*-Vicin-Convicin-Genotypen als spontane bzw. durch Induktion erzeugte Mutationen gefunden und diese für die Züchtung verwendet werden. Bei der Reduzierung antinutritiver Faktoren liessen sich durch konventionelle Züchtungsprogramme gute Erfolge erzielen. Die Fortschritte bei der weitergehenden Verbesserung der Samenproteinqualität blieben dagegen bislang unbefriedigend (Bliss 1990).

1.4 Gentechnische Verfahren in der Pflanzenzüchtung

Die genetische Inkompatibilität von *Vicia faba* mit allen anderen Arten der Gattung *Vicia* machte es bis jetzt unmöglich, erwünschte positive Eigenschaften aus verwandten Arten einfach einzukreuzen (Lazaridou & Roupiakis 1993). Der DNA-Gehalt von *Vicia faba* ist ungefähr doppelt so hoch wie der anderer *Vicia*-Arten und die Größe und Anzahl der Chromosomen unterscheidet sie von allen anderen verwandten Arten dieser Gattung.

Mit Hilfe biotechnologischer Methoden ist es möglich, die entsprechenden Gene erwünschter Eigenschaften aus Wildarten oder anderen Kulturpflanzen zu isolieren und mit geeigneten Vektoren in das Genom der Empfängerpflanze einzuschleusen, sofern eine geeignete Transformationsmethode zur Verfügung steht.

Eine Übertragung von DNA bei höheren Pflanzen (genetische Transformation) kann über verschiedene Wege erfolgen:

- direkter Gentransfer durch Transformation von protoplastierten Pflanzenzellen mit „nackter“ DNA (siehe Paszkowski *et al.* 1984, Potrykus *et al.* 1985, Negrutiu *et al.* 1987)
- direkter ballistischer Transfer, Beschuß von pflanzlichen Geweben mit DNA-beladenen Wolfram- oder Goldpartikeln mit Hilfe der *particle gun* (siehe Klein *et al.* 1987, Christou *et al.* 1988)
- Transformation unterschiedlicher Gewebe durch Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens*, dessen (entsprechend verändertes) Ti-Plasmid als Vektor dient (siehe Zambryski *et al.* 1980, Otten *et al.* 1981, Herrera-Estrella *et al.* 1983, Bevan *et al.* 1984, Fraley *et al.* 1983, Horsch *et al.* 1984, Stachel *et al.* 1985, Hinchee *et al.* 1988, Grimsley *et al.* 1987, Hohn *et al.* 1989, Gould *et al.* 1991)

Diese Transformationstechniken, welche für Modellpflanzen wie Tabak oder *Arabidopsis* längst Routine sind, erwiesen sich als nur schwer übertragbar auf die als „unzugänglich“ geltenden Leguminosen. Die als Standard-Methode etablierte *leaf disc-transformation* mittels *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch *et al.* 1985) von Tabak (und anderen Solanaceen), führte – mit Ausnahme von *Arachis hypogaea* (Cheng *et al.* 1996) - bei keiner weiteren wichtigen Leguminosenart zum Erfolg. Der kritische Punkt bei Leguminosen liegt in ihrer geringen Zugänglichkeit für die *de novo* Regeneration aus dem selektierten Gewebe. Der Begriff „Regeneration“ bezeichnet in der Gewebekultur eine *de novo*-Bildung von Sprossen (Organogenese) oder von Embryonen (somatische Embryogenese). Diese entwickeln sich entweder direkt am Explantat ohne eingeschobene Kallusphase oder indirekt über eine Phase dedifferenziertes Zellwachstum (Kallusbildung) und anschließender Redifferenzierung des Gewebes.

Die Regenerationsproblematik erfordert für jede Spezies, z. T. für jeden Genotyp, ein eigens erstelltes Protokoll, welches die Faktoren Explantat-Typ und – Alter, Auxin/Cytokinin Konzentration, die Kombination und das Verhältnis der Phytohormone zueinander, sowie Licht- und Temperaturverhältnisse berücksichtigt. Um befriedigende Ergebnisse bei Leguminosen zu erzielen, müssen Standardmethoden daher einer umfassenden modifikatorischen Anpassung unterzogen werden, was in den meisten Fällen mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden ist (Herrera-Estrella & Simpson 1988, Parrott *et al.* 1992). Aufgrund dessen ist die Anzahl transgener Linien bei Leguminosen bis jetzt eher überschaubar geblieben (s. Tabelle 1.1).

Die Erzeugung transgener Pflanzen unter Umgehung der Gewebekultur-Phase z.B. durch Infiltration der Samenanlagen mit *Agrobacterium tumefaciens* ist z.B. für *Arabidopsis thaliana* beschrieben worden (Feldmann & Marks 1987, Clough & Bent 1998). Diese *in planta* Transformationsmethode konnte bei der Leguminose *Medicago truncatula* (Trieu *et al.* 2000) erfolgreich angewendet werden, ist aber bei Körnerleguminosen, die nur verhältnismäßig wenige, aber große Samen bilden nicht durchführbar. Ein erfolgreiches Regenerationsprotokoll aus Gewebeexplantaten bleibt daher eine Voraussetzung für die Erzeugung transgener Körnerleguminosen.

1.5 Gewebekultur und Transformation bei *Vicia faba*

Die ersten Versuche zur *in vitro*-Kultur von *Vicia faba* konzentrierten sich auf optimales Kalluswachstum mit dem Ziel maximalen Zuwachses an Frischgewicht. Der Einfluss von Explantat und verwendetem Medium wurde getestet, bereits hier wurden niedrige Wachstumsraten und Nekrotisierung des Gewebes beschrieben (Mitchell & Gildow 1975, Jelaska *et al.* 1981). Geringes morphogenetisches Potential attestierte Röper (1979) Zellkulturen von *Vicia faba* nach vergeblichen Versuchen zur Regeneration von Sprossen.

Die nachfolgend publizierten Arbeiten beschrieben die Regeneration von Sprossen aus meristemhaltigen Gewebeteilen, i. d. R. Apikalmeristeme (Martin *et al.* 1979, Cheyne & Dale 1980, Galzy & Hamoui 1981, Bieri *et al.* 1984, Schulze *et al.* 1985, Busse 1986, Fakhrai *et al.* 1989, Selva *et al.* 1989, Taha & Francis 1990), was im engeren Sinn der Definition keine Regeneration, sondern eine Art von Mikropropagation darstellt. Im Explantat bereits vorhandene Meristeme (Apikalmeristem, Achselknospen, Cotyledonarnodien) wurden bei Kultur auf cytokininhaltigen Medien (meist BAP), allein oder in Kombination mit geringen Mengen an Auxin, zur multiplen Sproßproliferation angeregt. Da eine bekannte Wirkung von Cytokinin die Hemmung der Apikaldominanz ist, resultierte daraus der Effekt einer permanenten Anregung des Wachstums der Seitentriebe, wobei jeder Sproß sich selbst im Wachstum hemmt und durch weitere Seitensprosse ersetzt wird.

Eine gewichtige Einschränkung der Eignung für die Verwendung in der *in vitro*-Kultur stellt die ausgeprägte Neigung von *Vicia faba* zur Bildung polyphenolischer Komponenten dar (Bieri 1984, Schulze *et al.* 1985, Selva 1989), da diese zum raschen Absterben der betroffenen Bereiche führen können. Griga und Mitarbeiter (1987) erzeugten mit Wechsel von hohen zu niedrigeren Auxinkonzentration im Medium embryoidähnliche Strukturen an Kallus- und Suspensionskulturen aus unreifen *Vicia faba*-Cotyledonen, die jedoch keine weitere Entwicklung aufwiesen.

Die Isolierung von Protoplasten und ihre Entwicklung bis zum Kallus wurde von Binding und Nehls (1978) und Röper (1981) durchgeführt, eine Regeneration aus Protoplasten zu vollständigen Pflanzen konnte für *Vicia faba* erst 14 Jahre später beschrieben werden (Tegeder *et al.* 1995). Die erfolgreiche Regeneration konnte mit der Verwendung von

Thidiazuron (TDZ) erreicht werden, eine substituierte Phenylharnstoff-Verbindung mit einer starken cytokininartigen Wirkung (Mok *et al.* 1982, Thomas & Kattermann 1986), die bei vielen als problematisch geltenden Arten die Regeneration ermöglichte u.a. Erdnuß (Gill & Saxena 1992), Gartenbohne (Malik & Saxena 1992), Apfel (de Bondt *et al.* 1994).

Die ersten Versuche der Übertragung fremder Gene in *Vicia faba* wurden von Schiemann & Eisenreich (1989) publiziert. Keimlinge wurden mit *Agrobacterium rhizogenes* inokuliert, der daraus resultierende Kallus wuchs auf hormonfreiem Medium und produzierte GUS-positive Wurzeln. Ähnliche Versuche wurden von Ramsay & Kumar (1990) veröffentlicht; sie inkubierten Stengelgewebe und Cotyledonen mit *A. rhizogenes/pBin19*, was ebenfalls zu hormonautotrophen Wurzelkulturen führte, deren transgener Status ausserdem durch einen NPTII *dot blot*-Assay nachgewiesen wurde. Über die Regeneration von Sprossen konnte in beiden Fällen nicht berichtet werden.

Jelenić *et al.* (2000) inokulierten Keimlinge und Explantate lokaler *Vicia faba* - Sorten mit verschiedenen Agrobakterienstämmen; zum Nachweis von transformierten Zellen diente das autotrophe Wachstum der Kalluskulturen auf hormonfreiem Medium und deren erhöhte Peroxidaseaktivität. Auch hier konnte keine Regeneration von Sprossen erzielt werden. Kramer (2002) führte Untersuchungen zum Gentransfer bei *Vicia faba* mit *A. tumefaciens* und *A. rhizogenes* in Verbindung mit verschiedenen Gewebeexplantaten durch. In keiner der Versuchsanordnungen konnte eine Regeneration von Pflanzen beschrieben werden.

Ein *Agrobacterium*-vermitteltes Transformationssystem, das für die verwandte Art *Vicia narbonensis* entwickelt wurde, welches die Regeneration über somatische Embryogenese bewirkt (Pickardt *et al.* 1991, Saalbach *et al.* 1994), lies sich trotz wiederholter Versuche nicht auf *Vicia faba* übertragen und führte zu keinen positiven Resultaten (Pickardt, pers. Mitteilung).

Tabelle 1.1 Transgene Körnerleguminosen, nach Somers *et al.* (2003), verändert

Spezies	Art der Genübertragung	Explantat und Regenerationstyp	Referenz
<i>Arachis hypogaea</i>			
	Particle gun	Unreife Cotyledonen (E)	Ozias-Akins <i>et al.</i> (1993)
	A.t. (EHA105)	Blattstücke (O)	Cheng <i>et al.</i> (1996)
	Particle gun	Embryokulturen (E)	Wang <i>et al.</i> (1998)
	Particle gun	Somat. Embryonen (E)	Livingstone & Birch (1999)
	A.t. (C58)	Cotyledonen (O)	Sharma <i>et al.</i> (2000)
<i>Cicer arietinum</i>			
	A.t. (LBA4404)	Cotyledonarnodien (O)	Fontana <i>et al.</i> (1993)
	A.t. (C58C1/EHA101)	Embryoachsen (O)	Krishnamurthy <i>et al.</i> (2000)
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>			
	A.t. (LBA4404)	Cotyledonen (O)	Joersbo <i>et al.</i> (1999)
<i>Glycine max</i>			
	A.t. (A281)	Cotyledonen (O)	Hinchee <i>et al.</i> (1988)
	Particle gun	Embryoachsen (O)	McCabe <i>et al.</i> (1988)
	Particle gun	Embryoachsen (O)	Christou <i>et al.</i> (1989)
	Particle gun	Embr. Suspensionskulturen	Sato <i>et al.</i> (1993)
	Particle gun	Unreife Cotyledonen (O)	Parrott <i>et al.</i> (1994)
	Particle gun	Embryoachsen (O)	Aragão <i>et al.</i> (2000)
	A.t. (C58)	Cotyledonen (O)	Clemente <i>et al.</i> (2000)
	A.t. (EHA101)	Cotyledonarnodien (O)	Olhoft <i>et al.</i> (2003)
<i>Lens culinaris</i>			
	Particle gun	Cotyledonarnodien (O)	Gulati <i>et al.</i> (2002)
<i>Lupinus angustifolius</i>			
	A. tumefaciens	Embryoachsen (O)	Molvig <i>et al.</i> (1997)
	A.t. (AgL0)	Embryoachsen (O)	Pigeaire <i>et al.</i> (1997)
<i>Lupinus luteus</i>			
	A.t. (AgL0)	Apikalmeristeme (O)	Li <i>et al.</i> (2000)
<i>Phaseolus vulgaris</i>			
	Particle gun	Embryoachsen (O)	Aragão <i>et al.</i> (1996, 2002)
<i>Pisum sativum</i>			
	A.t. (GV3101)	Epicotylsegmente (O)	Puonti-Kaerlas <i>et al.</i> (1990)
	A.t. (C58/3)	Cotyledonarnodien (O)	Davies <i>et al.</i> (1993)
	A.t. (AGL1)	Embryoachsen (O)	Schroeder <i>et al.</i> (1993)
	A.t. (EHA105)	Cotyledonarnodien (O)	Bean <i>et al.</i> (1997)
	A.t. (AGL1)	Unreife Cotyledonen (O)	Grant <i>et al.</i> (1998)
<i>Vicia faba</i>			
	A.t. (EHA101/EHA105)	Epicotylsegmente (O)	Böttinger <i>et al.</i> (2001)
<i>Vicia narbonensis</i>			
	A.t. (EHA101)	Epicotylsegmente (O)	Pickardt <i>et al.</i> (1995)
	A.t. (EHA101)	Epicotyle, Sproßspitzen (O)	Czihal <i>et al.</i> (1999)

O: Organogenese; E: Embryogenese; A.t.: *Agrobacterium tumefaciens*

1.6 Modifizierung der Aminosäurezusammensetzung in Samen von Körnerleguminosen

Samenproteine werden in großen Mengen im Laufe der Samenentwicklung akkumuliert und in membranumschlossenen Kompartimenten, den *protein bodies* gespeichert. Der größte Anteil an Aminosäuren, die von den photosynthetisch aktiven Teilen der Pflanze zu den Samen transportiert werden, besteht aus Asparagin und Glutamin, im weiteren Serin, Alanin und Glycin (Macnicol 1977, Lea & Mifflin 1980, Anderson & Fitzgerald 2001). In den sich entwickelnden Samen müssen also alle Enzyme vorhanden sein, um die aus dem Hülsengewebe angelieferten Aminosäuren in alle anderen umzuwandeln, die den speziellen Anforderungen und Charakteristika der Speicherproteine im Samen entsprechen. Die Menge und das Verhältnis kohlenstoff-, stickstoff- oder schwefelhaltiger Metabolite, die vom vegetativen Teil der Pflanze zu den Samen transportiert werden, sind nicht festgelegt, sondern unterliegen starken Schwankungen, entsprechend den wechselnden Umweltbedingungen. Deshalb müssen Samen über ein komplexes regulatorisches Netzwerk des Aminosäuremetabolismus verfügen, welches sie in die Lage versetzt, ankommende Metabolite zu erkennen und diese dementsprechend in die erforderlichen, freien Aminosäuren umzuwandeln zur effizienten Inkorporation der freien Aminosäuren in die Speicherproteine (Galili & Höfgen 2002).

1.7 Strategien zur Veränderung des Aminosäureprofils

Methionin ist eine essentielle, schwefelhaltige Aminosäure, die nicht nur für den Aufbau von Proteinen, sondern auch als Bestandteil zellinterner Vorgänge wichtig ist (Giovannelli *et al.* 1980, Anderson 1990). Methionin ist eine Komponente der Methyl-tRNA zur Initiation der Proteinsynthese und dient als Vorstufe für S-Adenosyl-Methionin (SAM), dem Hauptdonor in vielen Methylierungsreaktionen (Chiang *et al.* 1996). In Pflanzen wird Methionin außerdem über SAM in das Phytohormon Ethylen eingebaut (Matthews 1999).

Die Aminosäurenkomposition der Samenproteine von Körnerleguminosen ist natürlicherweise lysinreich, aber arm an Methionin und Cystein und gilt deshalb als nicht ausgewogen. Um einen höheren Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren und damit eine ernährungsphysiologisch ausgewogenen Proteinqualität zu erreichen, wurde in mehreren Arbeitsgruppen unterschiedliche Strategien zur Erhöhung des Methionins auf Ebene der Proteine oder der Aminosäurenbildung verfolgt.

(a) Übertragung von Genen für methioninreiche Proteine

Bei dieser Vorgehensweise wird ein Gen, welches für ein methioninreiches Protein codiert, in den Zielorganismus übertragen. Die Expression des Transgens soll zu einem Anstieg der Methioninkonzentration im Proteinpool der Wirtspflanze führen. Bei Tabak (Altenbach *et al.* 1989), Raps (Guerche *et al.* 1990, Altenbach *et al.* 1992), Sojabohne (Townsend & Thomas 1994), Mäusewicke *Vicia narbonensis* (Saalbach *et al.* 1994,

Pickardt *et al.* 1995), Luzerne (Tabe *et al.* 1995) und Lupine (Molvig *et al.* 1997) wurde diese Strategie bereits erfolgreich umgesetzt und Samen mit erhöhtem Methioningehalt erzeugt.

Geeignete Gene wurden aus Paranuß *Bertholletia excelsa* (Sun *et al.* 1987, 2S-Albumin mit 24% Met/Cys), Sonnenblume *Helianthus annuus* (Kortt *et al.* 1991, 2S-Albumin mit 23% Met/Cys) und Mais *Zea mays* (Hoffman *et al.* 1987, 15kD Zein 11% Met/4,3% Cys) isoliert. Die samenspezifische Expression des 2S-Albumins aus der Paranuß unter Kontrolle des Phaseolin-Promotors führte in Tabak und Raps zu einer Erhöhung des Methioningehalts um 30% (Altenbach *et al.* 1989, 1992) und damit zu einem Anteil von 8 bzw. 4% des SDS-extrahierbaren Gesamtproteingehalts. In Samen von *Vicia narbonensis* führte die Expression des gleichen Gens zu einer Akkumulation des fremden Albumins von bis zu 5% des Gesamtproteins und zu einer Verdopplung des proteingebundenen Methionins und erreichte damit 80% des FAO-Standards für ernährungsphysiologisch wertvolles Protein (Saalbach *et al.* 1995). Die Übertragung des Paranußgens unter Kontrolle eines doppelten CaMV 35S-Promotors mit der ballistischen Methode in die Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) wurde von Aragão *et al.* (1999) publiziert. Zwei von fünf transgenen Linien zeigten einen signifikant erhöhten Gehalt an Methionin (14% bzw. 23%) gegenüber nichttransformierten Pflanzen. In einer von Pioneer-HiBred erzeugten transgenen Sojabohne lag der Anteil des Paranuß-Albumins bei 10% des Gesamtproteins, die Samen zeigten jedoch keine dementsprechend proportionale Erhöhung an proteingebundenem Methionin (Rudolf Jung, pers. Mitt.).

Die wirtschaftliche Nutzung des Paranußgens wurde in Frage gestellt durch die Ergebnisse medizinischer Studien zur Allergenität. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die allergenen Eigenschaften der Paranuß u.a. auf das methioninreiche 2S-Albumin zurückzuführen sind und diese allergenen Eigenschaften auch in den transgenen Samen der Wirtspflanzen auftraten (Nordlee *et al.* 1996).

Weitere Arbeiten zu diesem Thema konzentrierten sich auf andere methioninreiche Speicherproteine. So führte die Transformation mit dem Gen für das Sonnenblumen-Albumin SFA8 bei Lupinen zu einer 40-50%igen Erhöhung des proteingebundenen Methionins (Molvig *et al.* 1997). Eine vergleichbare Anreicherung an Methionin erzielten Keeler *et al.* (1997) mit einem synthetischen Gen CP3-5 (31% Lysin, 20% Methionin) mit samenspezifischem Promotor in Tabaksamen. Das 15kDa β -Zein aus Mais wurde, reguliert durch den Phaseolinpromotor, in Tabak übertragen und führte dort zu einer Akkumulation von 1,6% am Gesamtproteingehalt der Samen. Die Genexpression erfolgte gewebespezifisch und wurde entwicklungsabhängig reguliert, das Zein wurde sowohl im Endosperm als auch im embryonalen Gewebe nachgewiesen (Hoffman *et al.* 1987).

Die nichtsamenspezifische Expression des Sonnenblumen-Albumins in dem Gras *Festuca arundinacea* mit einem ER-Retention-Signal (KDEL) führte zu einer Akkumulation von 0,2% von SFA8 am Gesamtprotein (Wang *et al.* 2000). Auch in Blättern von transgenem

Weißklee (*Trifolium repens*) konnten Christiansen *et al.* (2000) eine Akkumulation des schwefelreichen SFA8 nachweisen.

(b) Deregulierung der Biosynthese der Aspartataminosäuren

Zu der Gruppe der Aspartatfamilie gehören die Aminosäuren Asparaginsäure (Aspartat), Asparagin, Lysin, Threonin, Isoleucin und Methionin. Ausgehend von Aspartat weist der Biosyntheseweg zwei wichtige Verzweigungen auf (s. Abb. 1.1). Die erste führt zur Lysinsynthese aus der Kopplung der Aspartatfamilie mit der Glutamatfamilie. Am zweiten *branch point* dient O-Phosphohomoserin (OPH) als Substrat für die konkurrierenden Synthesewege zu Threonin einerseits und zu Methionin andererseits. Der für die Synthese von Methionin benötigte Schwefel wird in reduzierter Form als SH-Gruppe von Cystein auf das zur Verfügung stehende Kohlenstoffskelett übertragen. Über weitere Zwischenschritte, die in der Form von Homocystein aus dem Plastiden herausführen, wird Methionin im Cytosol der Zelle gebildet.

Die Synthese der genannten Aminosäuren wird in Pflanzen durch *feedback* Kontrolle über die Endprodukte reguliert. Übersteigt der Level von Lysin oder Threonin einen bestimmten Schwellenwert, so wird die Aktivität der Aspartatkinase (AK), des ersten Enzyms des Aspartatstoffwechselweges gehemmt. Die Konzentration an Methionin übt keine hemmende Rückwirkung auf die Aspartatkinase aus, sondern reguliert sich über die Hemmung der Cystathionin- γ -Synthase und der fördernden Wirkung auf die konkurrierende Threonin-Synthese.

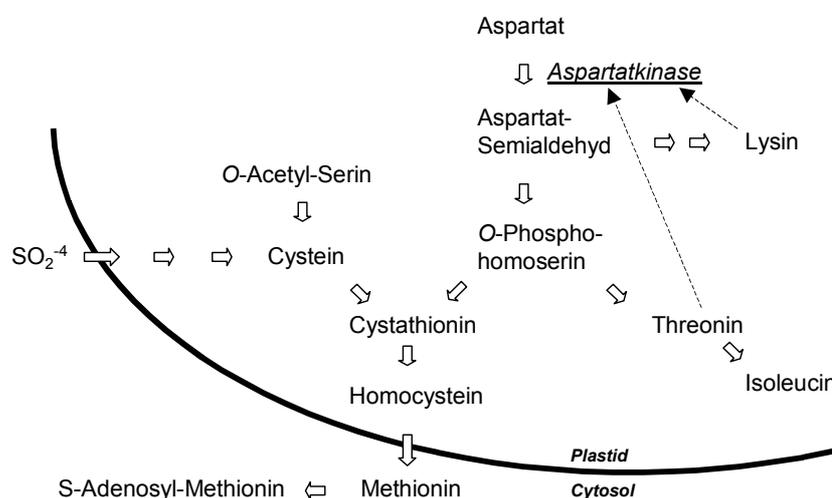


Abbildung 1.1: *Feedback* Hemmung (gestrichelte Pfeile) der Aspartatkinase durch die Endprodukte Lysin und Threonin im Biosyntheseweg der Aminosäuren der Aspartatfamilie (nach Galili 1995, verändert).

Durch eine Verhinderung der *feedback*-Hemmung innerhalb des Biosynthese-Weges könnte „ungehemmt“ Methionin produziert werden, vorausgesetzt, dass ausreichend Schwefel zum Einbau in die Kohlenstoffskelette in der Pflanze zur Verfügung steht. Bei Tabak konnte durch den Einbau eines aus *E. coli* stammenden Gens für eine *feedback*-insensitive Aspartatkinase (*lysC*) in Verbindung mit dem 35S CaMV-Promotor (Shaul & Galili 1992) eine Überproduktion an freiem Threonin erreicht werden. Durch Fusion der *E. coli* Aspartatkinase mit dem samenspezifischen Phaseolinpromotor (aus *Phaseolus vulgaris*) konnten Karchi *et al.* (1993) eine signifikante Erhöhung des Threonin- und Methioningehalts in den Samen von transgenen Tabakpflanzen erzielen. Die Expression desselben bakteriellen AK-Gens in Gerste (Brinch-Pedersen *et al.* 1996) brachte eine 14fache Erhöhung an Lysin und eine 8fache Erhöhung an Methionin in Blättern, jedoch keine Veränderungen im Gesamtaminosäuregehalt der Samen. Galili *et al.* (2000) erzielten mit der Übertragung des AK-Gens in Luzerne eine Steigerung des Threoningehalts, der Methioningehalt blieb hingegen unverändert.

Die Überproduktion von Threonin und/oder Lysin in transgenen Pflanzen bringt z. T. abweichende Phänotypen hervor (Frankard *et al.* 1992, Shaul & Galili 1993). Wenn die Anhäufung dieser Aminosäuren zu einer Störung des Stoffwechselgleichgewichts in der Zelle führt, kann durch samenspezifisches *Targeting* die Akkumulation in die entsprechenden Kompartimente der Samen verlagert werden, wo sich die Stoffwechselprodukte inert verhalten.

(c) Züchtungsstrategie Mutantenauslese

Eine weitere Möglichkeit ist das *Screening* und die Isolierung von Mutanten mit einem erhöhten Level der Synthese und Akkumulation erwünschter Aminosäuren aufgrund von mutierten Enzymen des Biosynthesewegs. Viele dieser Untersuchungen wurden mit den Enzymen des Aspartatbiosyntheseweges durchgeführt. Die Selektion auf Ethionin (einem toxischen Analogon von Methionin), kann verwendet werden, um Pflanzen mit erhöhter Methioninakkumulation zu identifizieren, da eine hohe Methioninkonzentration in den Zellen die toxische Wirkung von niedrig dosiertem Ethionin abpuffert.

Bei Sojabohnen isolierte die Arbeitsgruppe von Imsande (2001) eine Methionin überproduzierende Mutante durch Selektion auf Ethionin und visuellem Phänotypen-*screening*. Der Methionin- und Cysteingehalt in den Samen der Mutanten-Linie lag ungefähr 20% höher als in den Elternpflanzen, die Gründe für diesen Anstieg sind noch nicht geklärt.

In *Arabidopsis* wurde die Mutante *mto-1* isoliert, die infolge einer Mutation in der Cystathionin- γ -Synthase (CGS) eine bis zu 40fache Menge an Methionin in jungen Blattrosetten akkumulierte (Inaba *et al.* 1994). Im Wildtyp von *Arabidopsis* bewirkt ein hoher Methioninlevel die Abregulation der CGS mRNA, dieser Mechanismus ist in der *mto-1* Mutante stark eingeschränkt und dadurch die CGS mRNA Stabilität erhöht (Chiba *et al.* 1999). Eine weitere *Arabidopsis*-Mutante, *mto-2*, akkumulierte die 20fache Menge an Methionin, wobei der Gehalt an Threonin reduziert war (Bartlem *et al.* 2000). Der

Grund hierbei war eine Mutation der Threoninsynthase (TS); durch eine Reduktion der TS Aktivität war das kompetitive Gleichgewicht um das gemeinsame Substrat OPH (s. Abb. 1.1) in Richtung der Methioninsynthese verschoben.

(d) *Antisense*-Suppression endogener, methioninarmer Samenproteine

Arbeiten an *Brassica napus* hatten gezeigt, dass sich durch Einführung des *Cruciferin*-Gens in *antisense*-Orientierung eine Reduzierung dieses Samenproteins bei gleichzeitigem Anstieg des methioninreicheren Napins erreichen lässt (Kohno-Murase *et al.* 1995). Auch für *Arabidopsis thaliana* wurden Daten publiziert, die die Akkumulation eines heterologen samenspezifischen Samenproteins zeigten, wenn gleichzeitig ein endogenes Samenprotein mittels *antisense* supprimiert wird (Goossens *et al.* 1999).

Um eine vergleichbare Änderung der Proteinzusammensetzung in *Vicia* Samen zu erreichen, bieten sich als Ziel der *antisense*-Suppression das 7S-Globulin Vicilin und das Legumin B4 aus der 11S Legumin B-Familie an, welche in größeren Mengen im Samen vorhanden sind und kein Methionin enthalten.

1.8 Aufgabenstellung

Aufbauend auf Untersuchungen zur Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten von *Vicia faba* (Gebhardt 1995, Tegeder *et al.* 1995) und der Transformation von Cotyledonarnodien bei *Vicia faba* (Böttinger 1993) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Entwicklung eines Transformationssystems konzipiert, das zur Herstellung transgener Linien und damit zu der Einführung züchterisch interessanter Eigenschaften bei *Vicia faba* geeignet ist. Die hierfür verwendeten Genotypen Mythos und Albatross hatten sich bereits in vorangegangenen Versuchen als gewebekulturgeeignet erwiesen.

Zur Überwindung der Regenerationsproblematik sollte das Phenylharnstoff-Derivat Thidiazuron (TDZ) verwendet werden, ein synthetischer Wachstumsregulator mit starker cytokininartiger Wirkung. Das Auffinden geeigneter Kulturbedingungen war in diesem Zusammenhang ein wichtiges Kriterium, d.h. die Ermittlung verschiedener Faktoren der Kultur wie Zusammensetzung des Basalmediums, Konzentration der Phytohormone und ihre Kombination, notwendige Umweltbedingungen wie Temperatur usw. .

Zur Übertragung der Gene sollte das *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfersystem zur Anwendung kommen. Das Testen verschiedener Parameter des Gentransfers diente dem Ziel der Optimierung des Arbeitsprotokolls, um die Ausbeute an verwertbarem Material zu erhöhen und den (zeitlichen) Ablauf verkürzen zu können. Zu diesem Zweck wurden im ersten Teil der Arbeit Vektoren mit dem Reportergen *uidA*, mit oder ohne Intron, unter der Kontrolle verschiedener Promotoren verwendet.

An die Transformationsexperimente sollten Untersuchungen zur Erhöhung der schwefelhaltigen Aminosäuren in den Samen der Ackerbohne geknüpft werden. Hierbei

wurden zwei Strategien verfolgt: (i) Übertragung von Genen für methioninreiche Speicherproteine und (ii) Deregulierung des Aspartartaminosäure-Stoffwechsels.

Das Gen für das 2S-Albumin aus der Sonnenblume (*sfa8*) unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors (Bäumlein *et al.* 1991) sollte in *Vicia faba* übertragen und stabile transgene Linien erzeugt werden, die mit der Schaffung eines zusätzlichen „*sink*“ einen höheren Anteil an schwefelreichen Proteinen im Samen akkumulieren. Die Übertragung der codierenden Sequenz einer *feedback*-insensitiven Aspartatkinase (*lysC*) aus einer *E. coli*-Mutante (Karchi *et al.* 1993) sollte in den transgenen Linien die Produktion von mehr Methionin (als *source*) durch Umgehung der substratgekoppelten Hemmung bewirken.

Da die genetische Stabilität der transgenen Linien einen weiteren wichtigen Punkt bei der Entwicklung einer verlässlichen Transformationsmethode darstellt, müssen die erzeugten Linien mit cytologischen und molekularbiologischen Methoden analysiert und die Vererbung der eingefügten Gene über mehrere Generationen verfolgt werden. Darüber hinaus sollte die Expression der übertragenen Gene in den Empfängerpflanzen mit geeigneten Methoden nachgewiesen werden.