

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein mehrphasiges Regenerationssystem entwickelt und zur Herstellung transgener Pflanzen mit dem *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer kombiniert (Abschnitt 3.2). Zur Sproßinduktion wurde das als Phytohormon wirkende Phenylharnstoff-Derivat Thidiazuron (TDZ) eingesetzt. Alle Versuche wurden mit den Genotypen Mythos und Albatross durchgeführt.

Die verschiedenen Phasen des Regenerationssystems lassen sich folgendermaßen beschreiben (s. auch Abbildung 3.1):

Phase I: Kallusinitiation, Dedifferenzierung der Zellen der Explantate

Phase II: Sproßinduktion (mit TDZ als dominierendem Phytohormon)

Phase III: Sproßproliferation und -elongation auf Medium mit BAP

Phase IV: Bewurzelung oder Pfropfung der regenerierten Sprosse

Unabhängig von den Transformationsexperimenten wurden verschiedene Kulturbedingungen getestet, um das Regenerationssystem zu optimieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt (3.1) vorgestellt.

Material aus Transformationsexperimenten, d. h. mit Agrobakterien transformierte, kanamycinresistente Kulturen, die das Reporter-gen *uidA* enthielten, wurden ebenfalls für Optimierungsversuche herangezogen. Ergebnisse und Details hierzu befinden sich in Abschnitt 3.2.

Die morphologische, cytologische und genetische Charakterisierung der erzeugten transgenen Linien wird in den Abschnitten 3.3.1 - 3.3.5 dargestellt; gefolgt von den Ergebnissen der Untersuchungen zur Expression der übertragenen Gene im genomischen Background der Wirtspflanzen (3.3.6). Im letzten Teil des Kapitels (3.4) werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Veränderung der Aminosäurezusammensetzung der Samen beschrieben.

3.1 Versuche zur *in vitro*-Kultur und Sproßregeneration

3.1.1 Sproßregeneration mit und ohne Kallusphase

Zu Beginn der Untersuchungen wurde sowohl die Möglichkeit der direkten Sproßbildung am Explantat (mit nur einem Kulturmedium für Kallus- und Sproßentwicklung) wie auch der indirekte Weg der Sproßgewinnung mit eingeschobener Kallusphase (mit Medienwechsel zur Sproßinduktion) in Betracht gezogen. Allen Medien gemeinsam war die Verwendung des starken Wachstumsregulators Thidiazuron, allein oder in Kombination mit anderen Phytohormonen (s. Tabelle 2.3 - 2.5 im Methodenteil). Die einzige Ausnahme bildete eines der Medium der Kallusphase: dieses wurde aus einem Protokoll zur Kultivierung von Tabakprotokallussen nach Schieder (je 0,5 mg/l NAA, BAP,

2,4-D, pers. Mitteilung) übernommen. Bei allen weiteren Kallusinduktionsmedien wurde BAP durch TDZ in derselben Konzentration bzw. im selben Verhältnis ersetzt.

Versuche zur direkten Sproßinduktion (ohne Kallusphase): Die Kultur von verschiedenen Explantaten auf Medium mit unterschiedlichen TDZ-Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 mg/l führte zu Kalluswachstum, zeigte aber keine *de novo* Regenerationen von Sprossen (Tab. 7.1 im Anhang).

Ein Variante, die TDZ mit Zeatin, als einem „echten“ Cytokinin ergänzte, wirkte sich bei keinem der getesteten Medien positiv aus. Der hierbei gebildete Kallus war oft braun und bröselig. Eine ansteigende Hormonkonzentration führte zur Abnahme bei der Kallusbildung, von 50% bei geringeren Hormonkonzentrationen zu nur noch 20% kallusbildenden Explantaten bei den höher konzentrierten Hormonzugaben im Medium.

Für weitere Regenerationsversuche mit TDZ in Verbindung mit Auxinen war das synthetische Auxin Naphtyllessigsäure (NAA) und das auxinartige Picloram (Pyridincarboxylsäure) getestet worden. Beide Kombinationen führten in allen verwendeten Konzentrationen zu besserem Kalluswachstum als in den Versuchen ohne Auxinzugabe. Trotz guten Kalluswachstums auf TDZ/Picloram konnte keine Sproßbildung oder zumindest die Ausbildung globulärer Strukturen (als deren Vorstufe) beobachtet werden. Mit TDZ/NAA supplementierte Medien brachten an 60-70 % aller Explantate festen grünen Kallus hervor, der Anteil an hierbei beobachteten globulären Strukturen lag bei 5%. Eine weitere Variante, die TDZ, Zeatin und Picloram zu gleichen Teilen in Konzentrationen von 0,1 bis 5 mg/l enthielt, führte zu grossen Mengen Kallus mit einer glatten, kompakten Oberflächenstruktur, Regenerationsereignisse in Form von Sproßbildung bliebe jedoch auch hier aus (s. Tab. 7.1).

Auf allen getesteten Medien des einphasigen Systems (s. Tab. 2.3) konnte über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten keine Sproßbildung beobachtet werden.

Versuche zur indirekten Sproßinduktion (mit Kallusphase): Die Induktion von Kallus an Gewebeexplantaten ist mit der Verwendung einer niedrig konzentrierten ausgeglichenen Auxin/Cytokinin-Mischung ein Standard der Gewebekultur, alle zur Kallusbildung verwendeten Medien enthielten deshalb die drei Phytohormone NAA, 2,4-D und TDZ oder BAP, in gleichen Anteilen. Bei dem Vergleich von BNZ mit TNZ-Medium (Tab. 2.4) zur Kallusinduktion über einen Zeitraum von 15 Wochen wurde festgestellt, dass das Kalluswachstum auf Medium ohne TDZ deutlich später (ca. 3 Wochen) einsetzte; dementsprechend waren die Kallusse auf BNZ am Ende der Kulturphase kleiner und ausserdem häufiger von Schäden durch die stressinduzierte Produktion polyphenolischer Substanzen betroffen.

Ein Vergleich von TNZ 0,5 und TNZ 2 (TDZ, NAA und 2,4-D in gleichen Anteilen von 0,5 bzw. 2 mg/l) ergab keine Vorteile für die Verwendung einer höheren Hormonkonzentration, die Intensität der Kallusbildung und der zeitliche Ablauf waren für beide

Medien ohne Unterschied. Für die anschliessenden Versuche der Transformation wurde nur noch das geringer konzentrierte Medium weiterverwendet (vgl. Tab. 3.5).

Zur Sproßinduktion am Kallusgewebe wurden Kulturmedien mit den Hormonkombinationen TDZ/NAA bzw. TDZ/BAP/NAA verwendet, die zuvor zu Bildung von Kallus mit globulären Strukturen geführt hatten. Die Ausbildung sog. globulärer Strukturen („*nodular callus*“) wurde als ein Indiz für die Fähigkeit zur Ausbildung von Sproßregeneraten angesehen. Mit einer Kombination von 0,75 mg/l NAA, 2,5 mg/l TDZ und 5 mg/l BAP konnten erste Sproßregenerationen an Kallussen ausgelöst werden. Eine für die Kultur von Protokallussen optimierte Kombination von 0,75 mg/l NAA und 7,5 mg/l TDZ (Gebhardt 1995) führte auch an Gewebekallussen zu Bildung von Sproßknospen. Beide Hormonzusammensetzungen wurden in Verbindung mit KM- oder MS-Basalmedium getestet (vgl. Tab. 3.2), mit beiden konnte in zehn Versuchsreihen erfolgreich Sproßbildung induziert werden (Tab. 7.1). Im Hinblick auf eine Straffung und Vereinfachung des Arbeitsprotokolls, wurde auf den Zusatz von BAP verzichtet und das TDZ/NAA-Medium als Standard des Arbeitsprotokolls weitergeführt (Tab. 3.5).

Dass die Kallusphase unverzichtbar ist, wurde durch weitere Versuche bestätigt, dazu wurden Stengelexplantate nach 0, 2, 4, 6 Wochen Kultur auf Standard-Kallusinduktionsmedium (Tab. 3.5) auf Sproßinduktionsmedium transferiert und weitere 16 Wochen kultiviert. Kallusse, die direkt auf Sproßinduktionsmedium kultiviert worden waren, zeigten ein abweichendes Erscheinungsbild, sie waren grün, sehr fest, mit spröder Oberfläche, die Bildung globulärer Strukturen oder Sproßbildung wurde nicht beobachtet. Sowohl bei Genotyp Mythos wie auch Albatross stieg der Anteil globulärer Strukturen mit der Dauer des Verbleibs auf Kallusmedium an, Sproßbildung konnte bei beiden Sorten nur nach 6wöchiger Vorkultur auf Kallusmedium vor dem Transfer auf Sproßinduktionsmedium erreicht werden (Tab.3.1)

Tabelle 3.1: Einfluss der Dauer der Kallusphase (I) auf die Induktion von Sprossen in Kulturphase II

| Genotyp | Dauer der Kallusinduktion | 0 Wochen | 2 Wochen | 4 Wochen | 6 Wochen |
|-----------|---------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Mythos | globuläre Strukturen | 0% | 3% | 7% | 13% |
| | Sproßbildung in Phase II | - | - | - | + |
| Albatross | globuläre Strukturen | 0% | <1% | 4% | 6% |
| | Sproßbildung in Phase II | - | - | - | + |

Für jede Variante wurden 150 Explantate (Epicotylsegmente) auf den Standardmedien (Tab.3.5) getestet, die Auswertung erfolgte nach 16 Wochen.

3.1.2 Einfluß unterschiedlicher Basalmedien (MS vs. KM)

Die Verwendung des komplexen KM-Mediums stammte aus der Protoplastenkultur von *Vicia hajastana* (Kao & Michayluk 1975) und ist für die Erhaltung der empfindlichen Protoplasten notwendig (Tegeger 1995). Bei dem Vergleich mit MS-Medium sollte ermittelt werden, ob die Inhaltsstoffe von KM darüber hinaus positive Effekte auf die Regeneration ausübten, die bei Verwendung von MS verlorengehen würden. Zum Vergleich der beiden Standardmedien MS und KM wurden Explantate unter gleichen Bedingungen und Zusätzen auf beiden Medien kultiviert, die Auswertung erfolgte nach 4-6 Monaten. In beiden Fällen war die erzielte Regenerationsrate ähnlich gering (s. Tab. 3.2), signifikante Unterschiede wurden bei keiner der Wiederholungen festgestellt.

Tabelle 3.2: Vergleich der Sproßregeneration auf unterschiedlichen Basal-Medien (Phytohormone in Phase I: je 0,5 mg/l NAA, 2,4-D, TDZ; in Phase II: 5 mg/l BAP, 2,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l NAA)

| | KM | MS |
|--|-------------|--------------|
| Anzahl ausgelegter Explantate | 100 | 100 |
| Phase I: Anzahl Explantate mit Kallusbildung | 56 | 65 |
| Phase II: Sproßinduktion | 1 Regenerat | 2 Regenerate |

Das reichhaltige KM-Medium der Protoplastenkultur konnte für die *de novo*-Regeneration mit Epicotylsegmenten durch das einfacher zu handhabende und weniger aufwendige MS-Medium mit gleichbleibend guten Ergebnissen ersetzt werden.

3.1.3 Einfluß verschiedener Hormonkonzentrationen in Phase II

Da die Regenerationsrate von Sprossen auf den Standard-Medien relativ niedrig lag, wurden weitere Versuche zur Verbesserung der Ausbeute und zur Verkürzung der Zeitspanne bis zum Erscheinen der Regenerate unternommen. Tabelle 2.5 im Methodenteil gibt einen Überblick über die Vorgehensweise und die getesteten Phytohormonkonzentrationen und - Kombinationen. Außerdem brachte die Verwendung von TDZ unerwünschte Nebenwirkungen wie verstärkte Vitrifizierung und Stauchung der Sprosse mit sich, deshalb wurden Versuche mit intervallmässiger Anwendung von TDZ, in Abwechslung mit TDZ-freien oder -erniedrigten Kulturabschnitten durchgeführt (*pulsed feeding*), um diesen Effekt zu umgehen.

Eine Erhöhung der TDZ Konzentration mit dem Ziel der Steigerung der Regenerationsrate führte zu keiner verbesserten Sproßausbeute. Weder eine dauerhafte Konzentrationserhöhung auf mehr als 10 mg/l, noch Variationen in der TDZ-Konzentration durch stufenweises Erhöhen bzw. Absenken des Levels bei jeder Subkultur konnten eine Steigerung in der Anzahl regenerierender Kallusse bewirken oder die Zeitspanne bis zur Ausbildung erster Sproßanlagen verkürzen. Auch die unerwünschte Hemmung des Längenwachstums der Sprosse wurde dadurch nicht verhindert.

Tabelle 3.3: Auswirkung erhöhter TDZ-Konzentrationen auf die Sproßbildung in Phase II

| Genotyp | | Standardmedium 7,5 mg/l TDZ | Med 2 10 mg/l TDZ | Med 3 20 mg/l TDZ | Med 4 30 mg/l TDZ |
|-----------|--|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Mythos | Kallusbildung | 69% | 82% | 68% | 43% |
| | Globuläre Strukt. Sproßregeneration | 14% + | 1% + | >1% - | 0% - |
| Albatross | Kallusbildung | 78% | 56% | 64% | 69% |
| | Globuläre Strukt. Sproßregeneration | 4% + | 3% - | 4% - | 1% - |

Bis auf den TDZ-Anteil entsprachen alle Medien den Standardbedingungen. Für jeden Ansatz wurden dreimal 100 Explantate ausgelegt, die Grösse der ausgewerteten Kallusse betrug mind. 1 cm.

Die Kultur auf 10 mg/l TDZ führte zwar bei der Sorte Mythos zu mehr und optisch besserem Kallus, zeigte jedoch keine erhöhte Sproßregeneration. Konzentrationen von 20 mg/l und mehr führten beim Genotyp Mythos zu verstärkter Bildung von Polyphenolen und zum Absterben von Kallussen, die Sproßbildung unterblieb ganz. Genotyp Albatross zeigte auch bei hohen TDZ-Konzentrationen gutes Kalluswachstum, weniger Vitrifizierung und kaum Verluste durch phenolische Oxidation, die Sproßbildung blieb dennoch gering (Tab. 3.3). Ein zeitlich begrenzter „Impuls“ mit hohen TDZ-Konzentrationen (3 Wochen auf 10, 20, 30 mg/l) zur Initiation von Sproßbildung und anschließender Kultur auf niedrigerem Cytokinin-Niveau mit BAP (5mg/l) führte zum Ausbleiben von Regeneraten und war deshalb ungeeignet.

3.1.4 Wirkung von Caseinhydrolysat und Kokoswasser

Aus Casein wird durch Hydrolyse ein Aminosäuregemisch gewonnen, das in der Gewebekultur als Quelle für reduzierten Stickstoff eingesetzt wird. Caseinhydrolysat, wie auch andere komplexe Zusätze wie flüssiges Kokosnussendosperm, werden bei Versuchsreihen, bei denen sich die Kultur der Explantate schwierig gestaltet, oft mit Erfolg eingesetzt. Die Verwendung von Caseinhydrolysat in Phase I und II in der Konzentration von 100 mg/l zeigte einen positiven Effekt auf die Sproßbildung, da es der Vitrifizierung der Sprosse entgegen wirkte. Dieser Effekt zeigte sich vor allem bei der Sorte Mythos, die stärker von Vitrifizierungserscheinungen betroffen war. Der Ersatz von Caseinhydrolysat durch Kokoswasser führte bei der Sorte Mythos zu schlechteren Ergebnissen, d.h. weniger vitalem Kallus mit weniger globulären Strukturen und dem Ausbleiben von Sproßbildung. Für die Sorte Albatross ergaben sich kaum Veränderungen gegenüber der Casein-Variante bezüglich Bildung von Kallus und globulären Strukturen, die Regeneration von Sprossen trat verzögert auf (Tab. 3.4). Der Zusatz von sterilfiltriertem Kokoswasser und Caseinhydrolysat (100 ml/l bzw. 100 mg/l) zum Grundmedium zeigte eine leichte Erhöhung beim Auftreten globulärer Strukturen nur bei der Sorte Mythos, der Verringerung des Zeitraums bis zur ersten Sproßbildung um 2 Wochen bei Mythos stand eine Verlängerung dieser Zeitspanne um 3 Wochen bei

Albatross gegenüber. Eine erhöhte Regenerationsrate wurde in keinem der Fälle beobachtet, die Varianten mit Kokoswasser wurden deshalb nicht weiter verfolgt.

Tabelle 3.4: Auswirkung komplexer Zusätze (Caseinhydrolysat, Kokoswasser) zum Kallusinduktionsmedium auf die Sproßbildung in Kulturphase II bei *Vicia faba* cv. Mythos und cv. Albatross

| Genotyp | | TNZ mit Caseinhydrolysat | TNZ mit Caseinhydrolysat+ Kokoswasser | TNZ mit Kokoswasser |
|-----------|------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--|
| Mythos | Globuläre Strukt. | 13% | 17% | 7% |
| | Beginn der Sproßregeneration | nach 14 Wochen | 12 Wochen | keine Sproßbildung im Beobachtungszeitraum |
| Albatross | Globuläre Strukt. | 6% | 5% | 5% |
| | Beginn der Sproßregeneration | nach 9 Wochen | 12 Wochen | 14 Wochen |

Die Konzentration von Caseinhydrolysat und Kokosnusswasser im Medium betrug 100 mg/l bzw. 100 ml/l; die Kallusinduktion erfolgte über eine Dauer von 6 Wochen, der Beobachtungszeitraum insgesamt erstreckte sich über 14 Wochen; es wurden je Ansatz 100 Kallusse getestet.

3.1.5 Reaktion unterschiedlicher Explantate

Alle verwendeten Explantate wurden sterilen Kulturen etiolierter Keimlinge von *Vicia faba* cv. Mythos bzw. cv. Albatross entnommen, die bis zu zwei Monaten im Dunkeln bei 4°C gehalten wurden. Zur Verwendung kamen Epicotylsegmente, Petiolen und Blattstücke etiolierter Fiederblättchen. Auf Medien mit Zusatz von Picloram, Zeatin und TDZ ergab sich kein Unterschied in der Reaktion unterschiedlicher Explantate. 90% aller Explantate produzierten grünen, kompakten, homogenen Kallus (Tab. 7.1).

Unterschiede in den Reaktionen von Stengelsegmenten und Fiederblättchen traten bei den anderen getesteten Medien auf: Auf Medien mit TDZ/Zeatin wurde deutlich weniger Kallus produziert, viele Explantate, vor allem die Epicotylsegmente verbräunten und starben ab, Blattexplantate blieben länger grün und bildeten in geringem Umfang Kallus. Bei der Kultur auf Medien, die mit TDZ/NAA supplementiert waren, zeigte sich ein anderes Bild: Blattstücke wurden schnell braun und bildeten Kallus in nur geringem Umfang an den Wundrändern (Tab. 7.1). Petiolen waren besser geeignet als Blätter und bildeten Kallus, ebenso wie Stengelsegmente. Petiolen waren allerdings in viel geringerer Stückzahl verfügbar als Stengelsegmente und ihre Verwendung deshalb mit mehr Arbeitsaufwand verbunden. Für die nachfolgenden Transformationsversuche wurden deshalb Epicotylsegmente verwendet.

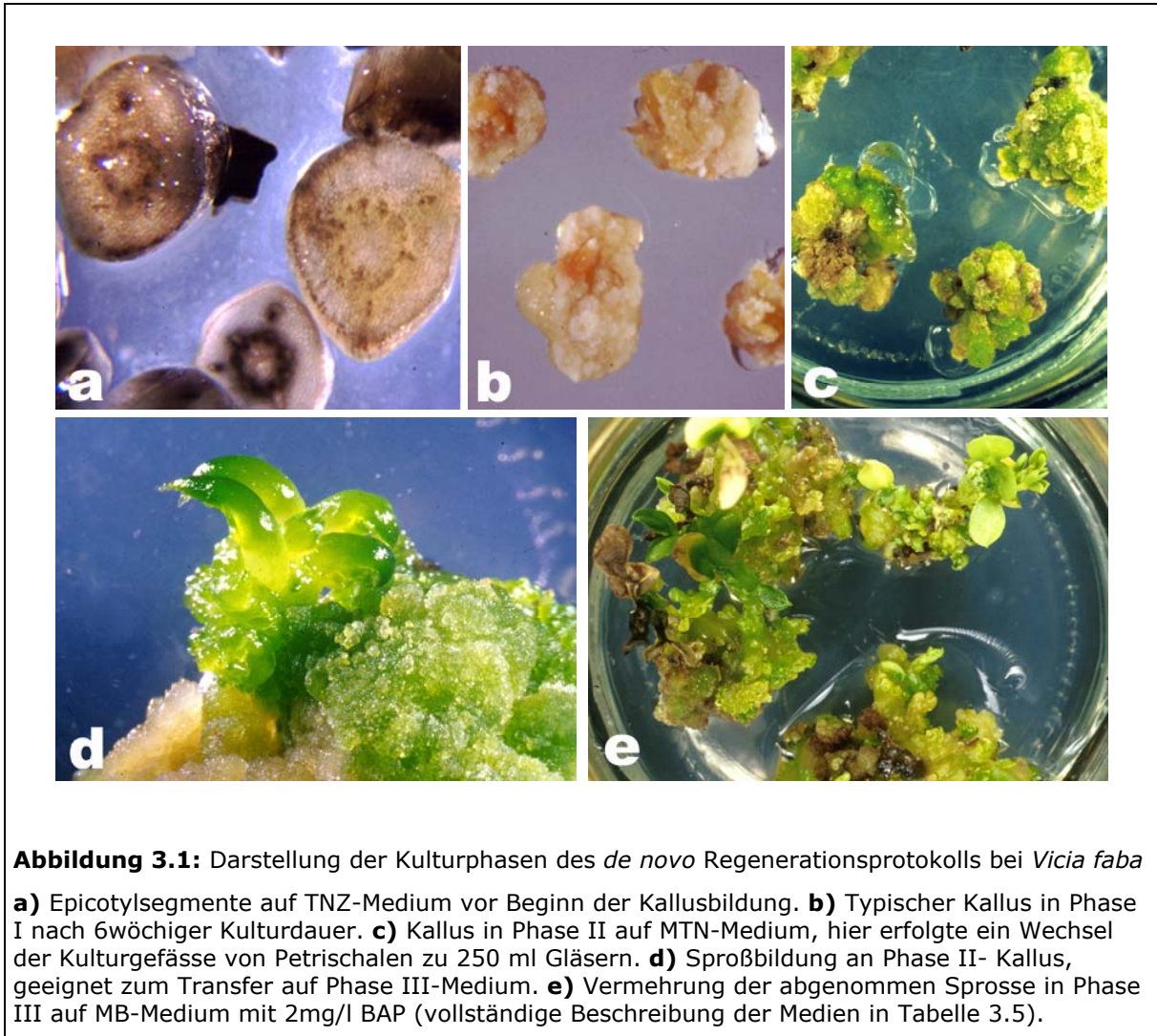


Abbildung 3.1: Darstellung der Kulturphasen des *de novo* Regenerationsprotokolls bei *Vicia faba*
a) Epicotylsegmente auf TNZ-Medium vor Beginn der Kallusbildung. **b)** Typischer Kallus in Phase I nach 6wöchiger Kulturdauer. **c)** Kallus in Phase II auf MTN-Medium, hier erfolgte ein Wechsel der Kulturgefäße von Petrischalen zu 250 ml Gläsern. **d)** Sproßbildung an Phase II- Kallus, geeignet zum Transfer auf Phase III-Medium. **e)** Vermehrung der abgenommenen Sprosse in Phase III auf MB-Medium mit 2mg/l BAP (vollständige Beschreibung der Medien in Tabelle 3.5).

3.2 Transformation von *Vicia faba*

Für die Transformation von *Vicia faba* wurde dem Regenerationssystem eine Kokulturphase mit *Agrobacterium tumefaciens* vorangestellt und die Kallusphase (Phase I) und Phase III mit einer Selektion verbunden (s. Abb. 3.3). Als Agrobakterienstämme wurden EHA101 und EHA105 benutzt, die als besonders geeignet für die Transformation von Leguminosen gelten (vgl. Tabelle 1.1). Die für die Transformation verwendeten Plasmide (s. Abschnitt 2.1.5) übertrugen das Reportergen *uidA* (mit oder ohne Intron), das *lysC*-Gen aus *E. coli* zur Beeinflussung des Aspartatstoffwechsels und ein Gen für die heterologe Expression des Sonnenblumen-Albumin 8-Gens (*sfa8*). Es wurden insgesamt 25 Transformationsreihen mit 7 verschiedenen Vektoren durchgeführt. Dabei wurden, je nach Verfügbarkeit, zwischen 400 und 700 Explantate kokultiviert und einer anschließenden Selektion mit Kanamycin bzw. Phosphinotricin unterzogen. In Kulturphase II fand keine Selektion statt, da die Anwesenheit von Antibiotika im Medium

die Regeneration negativ beeinflusste. Während der Sproßvermehrung (Phase III) wurde wieder eine Selektion durchgeführt, wobei G418 anstelle von Kanamycin für die *nptII*-Selektion verwendet wurde (s. 3.2.4).

Folgende Medien (Tab. 3.5) wurden aufgrund der Ergebnisse der Regenerationsversuche als Standard ermittelt und für die Transformation verwendet, Änderungen mit dem Ziel der Optimierung verschiedener Parameter in den einzelnen Phasen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Tabelle 3.5: Standard-Medien des Arbeitsprotokolls für die Transformation von *Vicia faba*

| Bezeichnung | Verwendung | Zusätze | Selektion |
|-------------|--------------------------------|---|--|
| TNZ | Kokultur und Kallusphase | je 0,5 mg/l 2,4-D, NAA, TDZ (100 mg/l Caseinhydrolysat nur Kallusphase) | 100 mg/l Kanamycin bzw. 2 mg/l Phosphinotricin |
| MTN | Sproßinduktion | 7,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l NAA, 100 mg/l Caseinhydrolysat | - |
| MB | Sproßelongation und Vermehrung | 2 mg/l BAP, 100 mg/l Caseinhydrolysat | 25 mg/l G 418 bzw. 2 mg/l PPT |
| MSR | Bewurzelung | 2 mg/l IBA | - |

Basismedium MS mit Saccharose 3% und Gelrite 0,3%

3.2.1 Inokulation/Kokultur mit *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Vorbereitung der Kokultur wurden den über Nacht angezogenen Agrobakterienkulturen der *log*-Phase Aliquots von je 20 ml entnommen, diese abzentrifugiert und im gleichen Volumen Pflanzenkulturmedium (TNZ) aufgenommen. Verdünnungen der Bakteriensuspension (1:1, 1:2, 1:4) waren in Vorversuchen getestet worden, die Erwartung, dadurch die Bakterienpopulation besser aus dem Pflanzengewebe entfernen zu können, bestätigten sich nicht.

Für die Inokulation wurden steril angezogene Keimlinge geerntet und in einer Glaspetrischale nach Zugabe von einigen Millilitern der Bakteriensuspension mit Rasierklingen in ca. 2 mm dicke Segmente geschnitten. Dünnere Explantate erwiesen sich als zu anfällig gegenüber Verletzungen beim Hantieren mit der Pinzette, dickere Epicotylsegmente bildeten selten Kallus und zeigten sich bei der späteren Gewebekultur als nachteilig, da sich zuviel nekrotisches Gewebe um den transgenen Kallus ansammeln und diesen „vergiften“ konnte.

Die optimale Inkubationszeit der Gewebeexplantate mit der Agrobakteriensuspension lag bei 2-4 Tagen. Während dieser Phase wurde eine hohe Explantatdichte in den Petrischalen angelegt, um das Wachstum der Agrobakterien zu fördern und eine hohe Infektionsrate zu erhalten. Kokulturphasen bis zu 2 Wochen wurden ebenfalls getestet, erwiesen sich aber als nachteilig, da die Bakterienpopulationen nach dieser Zeit kaum

mehr aus dem pflanzlichen Gewebe zu entfernen waren. Alle drei Versuchsansätze, die mit einer verlängerten Kokkulturphase zwischen 7 und 14 Tagen gestartet wurden, zeigten bereits in der ersten Subkultur einen durch Bakterienüberwuchs verursachten Ausfall von 40% der Explantate, nach 8 Wochen waren keine überlebenden Kalluse bzw. Explantate mehr vorhanden. Die erwartete Erhöhung der Transformationsrate durch den verlängerten Kontakt der Bakterien mit dem zu befallenden Pflanzengewebe konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte sich, dass der durch Bakterienüberwuchs an den Explantaten entstandene Schaden zu gravierend war, um dies für den Vorteil einer höheren Infektionsrate in Kauf zu nehmen.

Zur Untersuchung über den Einfluss des Alters und Entwicklungsstandes der Keimlinge wurden in zwei Versuchsansätzen jeweils gleich viele Explantate (zwischen 400 und 450) aus jungen oder älteren *in vitro*-Kulturen inokuliert und getrennt unter gleichen Bedingungen kultiviert (Tab. 3.6). Als junge Kulturen wurden frisch gekeimte Samen mit 2-4 cm langen Primärkeimlingen bezeichnet, die für einige Tage bei 4°C kultiviert worden waren. Etiolierte Keimlinge mit einer Länge von 10-12 cm, die mehrere Nodien und Blättchen entwickelt hatten, wurden dementsprechend als ältere *in vitro*-Kulturen bezeichnet.

Tabelle 3.6: Einfluss des Alters der zur Explantatgewinnung verwendeten Keimlinge auf die Transformationsrate (als Anzahl resistenter Kalluse in Phase I)

| | Resistente Kalluse / Gesamtzahl eingesetzter Explantate | |
|--|---|-------------------|
| | 1. Versuchsansatz | 2. Versuchsansatz |
| Explantate aus frisch gekeimten Samen | 72 / 400 (18%) | 68 / 400 (17%) |
| Explantate aus älteren Keimlingen (> 2 Wochen) | 98 / 400 (24,5%) | 90 / 450 (20%) |

Das Ergebnis dieser Untersuchung lieferte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Transformationsraten, zeigte aber tendenziell eine höhere Ausbeute an resistenten Kallussen bei Verwendung älterer Explantate (Tab 3.6). Als Konsequenz daraus wurden für die nachfolgenden Versuche bevorzugt Keimlinge verwendet, die zwei Wochen oder älter waren.

Zur Beendigung der Kokkultur erfolgten mehrere Waschschrte, um die Bakterienpopulation zu eliminieren. Dazu wurden die Explantate in Schottflaschen mit sterilem Wasser überführt und unter Schütteln mechanisch vom Bakterienaufwuchs befreit. Das Wasser wurde solange erneuert, bis keine Trübung des Wassers mit bloßem Auge mehr zu erkennen war. Dem letzten Waschschrte wurde 1 mg/l Betabactyl (alternativ 1 mg/l Claforan) zugesetzt und die Explantate darin eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschliessend wurden die Explantate auf sterilem

Filterpapier kurz getrocknet; dieser Schritt konnte jedoch ohne negative Auswirkungen bei den nachfolgenden Versuchen weggelassen werden.

Die gewaschenen Explantate wurden in Plastikpetrischalen auf TNZ-Medium, versehen mit 0,5 mg/l Betabactyl oder Claforan zur Bakterienkontrolle (mit oder ohne Zugabe von Carbenicillin), ausgelegt. Aufgrund der starken Polyphenolbildung einzelner Explantate und zur Isolierung von etwaigen Infektionen durften diese nicht zu dicht in den Kulturgefäßen plaziert werden, 50 Explantate je Petrischale erwiesen sich als praktikabler Standard. Nach einer Wartezeit von 4 bis 10 Tagen wurde mit der Selektion begonnen.

3.2.2 Selektion mit Kanamycin und Phosphinothricin

In vorangegangenen Versuchsreihen mit Wildtypexplantaten war eine Konzentration von 100 mg/l Kanamycin bzw. 2 mg/l PPT als optimal ermittelt worden, um jegliches Wachstum zu unterbinden. Als Kontrolle wurden bei den Versuchen 1-10 je 300, später je 50 Epicotylexplantate dem gleichen Verfahren – mit Ausnahme der Zugabe der Agrobakterien-Suspension – unterzogen. Innerhalb weniger Wochen auf selektivem Medium wurden die Epicotylsegmente braun und nekrotisch. Nach 4 bis 8 Wochen entwickelten 10-30% der transformierten Explantate Kallus, hingegen zeigte keines der Kontrollexplantate je Kalluswachstum auf den selektiven Medien (Abb. 3.3 b).

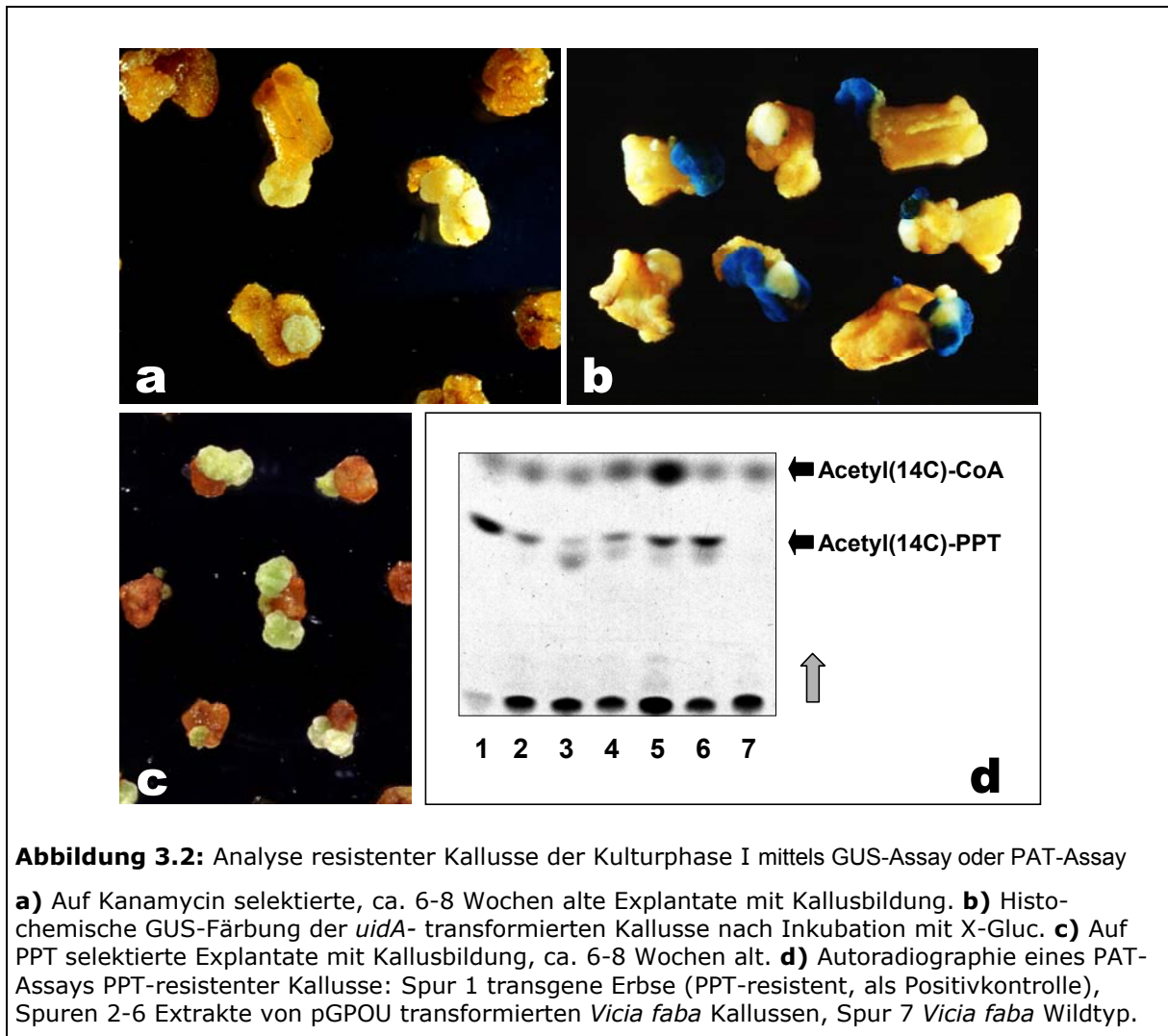
Um das Auftreten von „escapes“ zu vermeiden, wurde die Dauer der Selektionsphase in den ersten Versuchen eher lang (bis 6 Monate) angesetzt, ausserdem wurde die Größe der Kallusse als Kriterium miteinbezogen. Nur Kallusse mit einem Durchmesser von mindestens 5 mm und gesundem Habitus wurden auf das Sproßmedium der Phase II (ohne Selektion, s. Tab. 3.5) transferiert. Später konnte gezeigt werden, dass eine Selektionsdauer von 6-8 Wochen ausreichte und schon kleinste Kallusse von ca. 2 mm Durchmesser gepickt und erfolgreich in die zweite Kulturphase umgesetzt werden konnten.

Innerhalb von 4 Monaten konnten von ca. 10-20% der mit *Agrobacterium* inokulierten und selektierten Explantate Kallusse gewonnen und auf Sproßinduktionsmedium umgesetzt werden. Tabelle 3.7 fasst die Transformationsraten der durchgeführten Versuche, gruppiert nach Vektoren, zusammen.

Während nichttransformiertes Gewebe auf Selektionsmedium braun wurde und abstarb, entwickelte sich aus den transformierten Zellen weisslicher (Selektion auf Kanamycin im Dunkeln, Abb. 3.2 a) bzw. grüner Kallus (Selektion mit Phosphinothricin im Licht, Abb. 3.2 c), der z. T. für weitergehende Analysen verwendet wurde. Kallusse, die groß genug waren, um ohne Totalverlust geteilt zu werden, wurden - je nach vorliegendem Transformationsvektor - einem GUS- bzw. PAT-Assay unterzogen (s. Abb. 3.2).

Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität (GUS-Assay): Kallusse, die mit dem *uidA*-Gen transformiert worden waren, wurden für mehrere Stunden mit X-Gluc inkubiert. Die Expression des *uidA*-Gens führte bei vielen der getesteten Kallusse zu partieller, selten zu

vollständiger Blaufärbung des transgenen Gewebes (Abb. 3.2 b). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Kallussen aus den Versuchen mit den *uidA*-Intron-Vektoren pIBGusInt und pI19 erzielt; dadurch konnte gezeigt werden, dass die Blaufärbung der Zellen auf der Expression des übertragenen *uidA*-Gens beruht und nicht auf die Aktivität der im Pflanzengewebe verbliebenen und noch aktiven Agrobakterien zurückzuführen ist.



Der im Dunkeln gewachsene weissliche Kallus (Abb. 3.2 a) war besonders gut für diesen Test geeignet, da in dieser Phase noch kaum Chlorophylle oder Polyphenole gebildet worden waren, die die charakteristische Blaufärbung der β -Glucuronidase-Aktivität im Pflanzengewebe maskieren könnten. Eine endogene β -Glucuronidase-Aktivität des pflanzlichen Gewebes konnte nicht festgestellt werden, wie in Abbildung 3.2 b deutlich zu erkennen ist, trat die Blaufärbung bei Inkubation mit X-Gluc nur in Zelle des neugebildeten Kallus und nie im Gewebe der ursprünglich inokulierten Explantate auf.

Nachweis der Aktivität der Phosphinotricin-Acetyltransferase (PAT-Assay): Für den Nachweis der Aktivität des *bar*-Gens wurde der Zellextrakt von Kallussen, die mit PPT selektiert worden waren (Abb. 3.2 c), mit Phosphinothricin und radioaktiv markiertem ^{14}C -Acetyl-CoEnzymA inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf einer Kieselgel-beschichteten Glasplatte aufgetrennt und das Ergebnis anhand der Schwärzung eines Röntgenfilms als Radiographie dokumentiert (Abb. 3.2 d). Spur 1 des in Abbildung 3.2. d gezeigten PAT-Assays enthält den Zellextrakt einer *pat*-positiv transgenen Erbse als Positivkontrolle (die Gene *pat* und *bar* wurden aus verschiedenen *Streptomyces* Arten isoliert und codieren beide für eine Phosphinotricin-Acetyltransferase mit vergleichbarer Substrataffinität, s. Wehrmann *et al.* 1996). Spur 7 zeigt den untransformierten Wildtyp. Die fünf in den Spuren 2-6 aufgetragenen Proben weisen alle ein Signal für das Reaktionsprodukt Acetyl-PPT auf (Abb. 3.2. d). Von weiteren 20 untersuchten Kallussen zeigten 60% deutlich positive Signale, 20% nur schwache Signale, die restlichen 20% keine nachweisbare Aktivität der Phosphinotricin-Acetyltransferase (ohne Abbildung).

3.2.3 Sproßregeneration in Phase II

Die auf Medium der Phase II transferierten Kallusse wurden bei 20°C im 16 h Photoperiode in Glaskulturgefäßen weiterkultiviert. Hier entwickelte sich unter nichtselektiven Bedingungen in der Regel ein kräftig-grüner, kompakter und schnellwüchsiger Kallus (Abb. 3.1 c und 3.3 c). Aufgrund der starken Größenzunahme mussten viele Kallusse etwa alle 2-3 Monate zerteilt und auf verschiedene Kulturgläser verteilt werden. In jeder Transformationsserie entstanden auf diese Weise mehrere hundert, z. T. auch über tausend Kallusse, die über 6-12 Monate kultiviert und erhalten werden mussten. Das „Zerbrechen“ der Kallusse mit Hilfe von Pinzetten war dabei dem Zerschneiden mit Rasierklingen vorzuziehen, da Schneiden starke Wundreaktionen mit intensiver Phenolbildung und Schwärzung des Gewebes hervorrief, die mit einer hohen Verlustrate an Material einherging. Der Versuch, die Ausfälle durch Zugabe von Polyvinylpyrrolidon (PVP, als Adsorptionsmittel für Polyphenole) zum Kulturmedium zu verringern, blieben erfolglos. Die Verluste summierten sich in dieser Kulturphase auf etwa 10% des Bestandes.

Die Kultivierung der Kallusse in Phase II erstreckte sich über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten, in denen mit geringer Frequenz (s. Tab. 3.7) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Sproßanlagen (Abb. 3.1 d und 3.3 d) gebildet wurden. Um die Frequenz zu erhöhen, wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die Regeneration getestet. Zum einen wurden die verschiedenen Varianten der TDZ-Konzentrationen und -Kombinationen (s. Tab. 2.5 und 3.3) nochmals mit transgenen Kallussen getestet. Darüber hinaus wurden weitere Maßnahmen, z. B. die Ergänzung des MS-Mediums mit B5-Vitaminen (nach Gamborg *et al.* 1968), oder die Veränderung von Zuckerart und Zuckerkonzentration durchgeführt. Um den Einfluss der Kohlenstoffquelle zu testen, wurden z. B. alle 170 selektierten Kallusse des Transformationsansatzes mit pI19 (*uidA*-

Intron, *nptII*) in drei Chargen aufgeteilt, ein Teil verblieb auf 30 mg/l Saccharose als Standard, Teil 2 der Kallusse wurde auf Kulturmedium mit reduzierten Saccharosegehalt (15 mg/l) umgesetzt, Teil 3 wurde auf 20 mg/l Saccharose und 10 mg/l Glucose umgesetzt, die weitere Kulturzeit betrug für alle drei Ansätze acht Monate.

Keine der hier getesteten Varianten konnte gegenüber den Standard- bzw. Ausgangsbedingungen eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Regenerationsrate oder eine Beschleunigung der Entwicklung bis zum Erscheinen von Sproßanlagen an den Kallussen bewirken. Die frühesten Sproßregenerationen traten nach 3-4 Subkulturen auf, aber auch nach 10 Subkulturen wurden noch neue Regenerationsereignisse beobachtet. Der Zeitpunkt der Entstehung von Sproßanlagen variierte zwischen 4 und 12 Monaten, ohne dass ein eindeutiger Zusammenhang mit den getesteten Parametern hergestellt werden konnte.

Tab. 3.7 Zusammenfassung der durchgeführten Transformationen

| A.t. | Plasmid | Selekt.- marker | Promotor + codierende Sequenz | Anzahl inokul. Explant. | resistente Kallusse Anzahl (%) | Sproß- regenerate Anzahl (%) | Regen.- Frequenz in % |
|------------|-----------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| EHA 101 | pGSGluc1 | <i>nptII</i> | PTR1/2 <i>uidA</i> | 1250 | 144 (11,5) | 4 (2,7) | 0,32 |
| EHA 101 | pIBGusInt | <i>nptII</i> | 35S <i>uidA</i> -Int | 2400 | 200 (8,3) | 2 (1,0) | 0,08 |
| EHA 101 | pI19 | <i>nptII</i> | Pphas <i>uidA</i> - Int | 900 | 170 (18,8) | 5 (2,9) | 0,55 |
| EHA 101 | pAN109 | <i>nptII</i> | Pphas <i>lysC</i> | 500 | 153 (30,6) | 6 (3,9) | 1,2 |
| EHA 105 | pBIOU | <i>nptII</i> | Pusp <i>sfa8</i> | 1600 | 351 (21,9) | 13 (6,0) | 0,8 |
| EHA 105 | pGPOU | <i>bar</i> | Pusp <i>sfa8</i> | 1200 | 189 (15,8) | 3 (1,6) | 0,25 |
| EHA 105 | pPSM2 | <i>bar</i> | PleB4/Pphas <i>sfa8</i> | 1000 | 36 (3,6) | 0 (0) | 0 |

Die Regenerationsfrequenz (Spalte 8) gibt den Anteil transformierter und regenerierender Sproßklone (T_0) an der ursprünglich eingesetzten Anzahl an Gewebeexplantaten an. In Spalte 1 (A.t.) ist der jeweils verwendete Stamm von *Agrobacterium tumefaciens* angegeben.

Insgesamt zeigte sich an 33 der 1243 selektierten Kallusse Sproßknospenbildung, dies bedeutete für die verschiedenen Versuche eine Regenerationsrate, die zwischen 0 und 6% lag. Es ist anzunehmen, dass bei diesen Unterschieden in den Werten der einzelnen Versuchen auch die Konstruktion des Übertragungsvektors eine Rolle spielt, jedoch wurde zu diesem Gegenstand keine weiteren Untersuchungen durchgeführt

30 der Sproßregenerate stammten von *nptII*-resistenten Kallussen. Von den über 200 mit PPT selektierten Kallussen zeigten nur drei Ansätze zur Sproßbildung. Bezogen auf die Anzahl an Explantaten, die ursprünglich mit *Agrobacterium* inokuliert worden waren,

ergab sich damit eine Regenerationsfrequenz zwischen 0,08 und 1,2% für die einzelnen Versuchsanordnungen (s. Tab. 3.7).

Die Untersuchungen der selektierten Kallusse mit Hilfe von GUS-Assay (Tab. 3.7, Zeile 1-3) oder PAT-Assay (Tab. 3.7, Zeile 6+7) zeigten, dass es sich bei den selektierten und regenerierten Zellen i.d.R. um transgenes Material handelte.

3.2.4 Sproßvermehrung und – elongation (Phase III)

Die in Phase II gebildeten Sproßanlagen (Abb. 3.3 d) wurden abgenommen und auf Phase III-Medium (mit 2 mg/l BAP, ohne Zusatz von Thidiazuron) überführt. Es hatte sich gezeigt, dass die Anwesenheit von Thidiazuron im Medium hemmend auf die weitere Sproßentwicklung wirkt und die Streckung der Internodien behindert. Auf BAP-haltigem Medium der Phase III erfolgte die Proliferation von Sprossen und Sproßanlagen. Der Vorteil dieses Schrittes besteht darin, dass aus den seltenen Regenerationsereignissen der Phase II nun jeweils eine Vielzahl von Sproßklonen entstanden, aus denen gutwüchsige Kandidaten ausgewählt und für die weiteren Regenerationssschritte (Bewurzelung, Aufzucht im Gewächshaus, etc.) wiederholt eingesetzt werden konnten. Die Chancen einer erfolgreichen Umwandlung der Sproßanlagen in intakte Pflanzen wuchsen hierdurch entscheidend. Die Erfolgsaussichten einer direkten Bewurzelung oder *in vitro*-Pfropfung der Sproßanlagen ist geringer und bliebe zudem auf einen einzigen Versuch pro Regenerationsereignis beschränkt.

Um den transgenen Status der sproßbildenden Kallusse zu verifizieren und zu erhalten, wurden in dieser Phase wieder Kulturmedien mit selektiven Zusätzen verwendet. PPT wurde, wie in Phase I, in einer Konzentration von 2 mg/l verwendet, für die *nptII*-transformierten Klone wurde das in Phase I verwendete Kanamycin durch G418 in einer Konzentration von 25 mg/l ersetzt. Die Verwendung von G418 anstelle von Kanamycin in diesem Stadium hatte sich in Vorversuchen als geeigneter für die Selektion transformierter Pflanzen und deren Wachstum erwiesen. Antibiotika zur Unterdrückung des Bakterienwachstums wurden in Phase III nicht mehr verwendet.

Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, dass eine Absenkung der Temperatur von 20°C (Standardbedingungen) auf 15°C (bei unveränderten Lichtverhältnissen) die in Gewebekulturen von *Vicia faba* häufig auftretende Phenolbildung deutlich reduzierte. Darüber hinaus übte diese Massnahme eine fördernde Wirkung auf das internodale Streckungswachstum und die weitere Blattentwicklung der Sprosse in Phase III aus.

Die Intensität der Sproßproliferation und die Qualität der Sprosse waren auch klonabhängig. Manche der sproßbildenden Klone zeigten ein stark proliferierendes Wachstum, so dass von einem Transformationsereignis zahlreiche Sprosse „geerntet“ werden konnten, andere dagegen brachten vitrifizierte Sprosse hervor, die keine Weiterentwicklung aufwiesen.

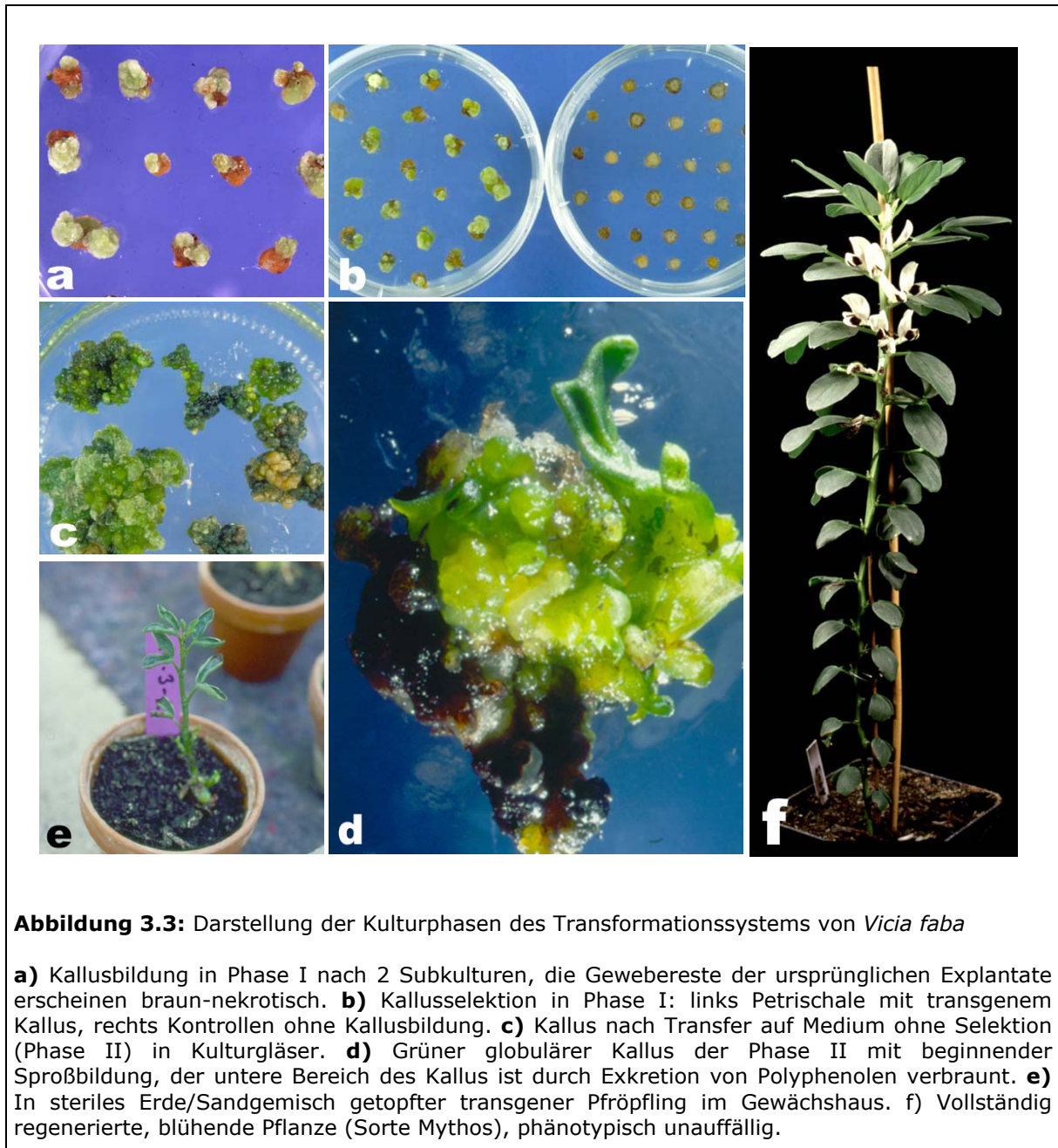


Abbildung 3.3: Darstellung der Kulturphasen des Transformationssystems von *Vicia faba*

a) Kallusbildung in Phase I nach 2 Subkulturen, die Gewebereste der ursprünglichen Explantate erscheinen braun-nekrotisch. **b)** Kallus Selektion in Phase I: links Petrischale mit transgenem Kallus, rechts Kontrollen ohne Kallusbildung. **c)** Kallus nach Transfer auf Medium ohne Selektion (Phase II) in Kulturgläser. **d)** Grüner globulärer Kallus der Phase II mit beginnender Sproßbildung, der untere Bereich des Kallus ist durch Exkretion von Polyphenolen verbraucht. **e)** In steriles Erde/Sandgemisch getopferten transgenen Pflöpfung im Gewächshaus. **f)** Vollständig regenerierte, blühende Pflanze (Sorte Mythos), phänotypisch unauffällig.

Von den im vorigen Abschnitt in Tabelle 3.7 erfassten 33 Regeneraten entwickelten 17 in Phase III gut wachsende und morphologisch annähernd normale Sproßkulturen (vgl. Tab. 3.8), 16 wiesen hingegen eine zu geringe Proliferationsrate auf oder produzierten nur Rasen von vitrifizierten, kurzen Sprossen, die entwicklungsunfähig und auch kaum pflanzbar waren. Es war jedoch möglich, DNA aus diesen Sprossen zu isolieren um mit Hilfe der PCR-Analyse durch Amplifikation der Resistenzgene zu zeigen, dass es sich bei dem Sproßmaterial tatsächlich um transgenes Gewebe handelte.

3.2.5 Pfropfen und Bewurzelung (Phase IV)

Sprosse, die eine Länge von mindestens einem Zentimeter erreicht hatten, wurden mit einer sterilen Rasierklinge abgeschnitten und in MS-Medium mit 3% Saccharose und 2 mg/l IBA bewurzelt. Kleinere oder weniger gut entwickelte Sprosse wurden auf 5-10 Tage alte etiolierte Wildtyp-Keimlinge aus sterilen *in vitro*-Kulturen gepfropft. Dafür wurde der Stengel des transgenen Pfröplings keilförmig zugerichtet und in einen vorbereiteten Längsspalt der dekapitierten Pfröpfungselage geklemmt (Abb. 3.3 e und 3.4 a). Nach ca. 10 Tagen, während dessen möglichst jede Art von Erschütterung durch Transport etc. vermieden wurde, waren mind. 80% der Pfröplinge mit der Unterlage verwachsen. Die Bewurzelungsrate lag durchweg niedriger, so dass bei wenig vorhandenem Material die Pfröpfungsmethode zur Erhaltung der Linie bevorzugt wurde (s. Tab. 3.8).

Tabelle 3.8: Verzeichnis der aus den Transformationsexperimenten hervorgegangenen, zur Weiterkultur geeigneten Klone (potentielle Primärtransformanten)

| Eigenschaften | Bezeichnung | Pfropfe | bewurzelt | Pflanzen/ Gewächshaus | Samenbildung |
|----------------|-------------|---------|-----------|--------------------------|--------------|
| Km+, GUS | A13 | 4 | 0 | 4 | + |
| Km+, GUSIntron | 10-A1 | 7 | 4 | 6 | + |
| | 10-35 | 5 | 0 | 4 | - |
| Km+, AK | 12-1 | 8 | 4 | 12 | + |
| | 12-2 | 3 | 0 | 1 | + |
| | 12-40 | 4 | 2 | 6 | + |
| | 12-3 | 7 | 0 | 3 | - |
| Km+, SFA8 | 26-1 | 6 | 0 | 1 | + |
| | 26-2 | 7 | 0 | 2 | (+) |
| | 26-3 | 5 | 0 | 2 | (+) |
| | 8-5 | 6 | 5 | 8 | + |
| | 8-66 | 1 | 0 | 1 | + |
| | 15-1 | 7 | 0 | 3 | (+) |
| PPT+, SFA8 | 15-21 | 3 | 0 | 3 | (+) |
| | 14-6 | 6 | 0 | 4 | (+) |
| | 14-3 | 3 | 0 | 1 | - |
| | 13-26 | 1 | 0 | - | - |

(+) Bildung steriler Hülsen mit verkümmerten Samen

Bewurzelte Sprosse mit Blattentwicklung wurden sorgfältig von Agarresten befreit und einzeln in kleine Töpfe mit autoklavierter Erde/Sand Mischung getopft. Vor dem Transfer

in das Gewächshaus wurden die Pflanzen in 12er Töpfe mit steriler Erde umgetopft (Abb. 3.3 e+f).

Von 16 Transformationsereignissen konnten jeweils ein bis mehrere Primärtransformanten in das Gewächshaus überführt werden, diese wurden durch Trippen geselbstet und nach dem Abreifen die Samen, wo vorhanden, geerntet (Tab. 3.8). Insgesamt dauerte die Produktion transgener Pflanzen mit der vorgestellten Methode, von der Kokultur bis zu den Samen der T_0 , zwischen 12 und 20 Monaten.

3.3 Charakterisierung der Transformanten

Sämtliche Pflanzen, die aus einem Sproßklon regeneriert worden waren, wurden nummeriert und unter der Klonbezeichnung als Repräsentanten einer Linie aufgefasst. Insgesamt wurden 14 Linien auf Kanamycin und 3 auf PPT selektiert, die in Tabelle 3.8 aufgelistet sind.

Während die T-DNA der Plasmide pGSGluc1, pIBGusInt und pI19 lediglich den Resistenzmarker *nptII* und *uidA* als Reportergen enthielten, übertrugen die Plasmide pAN109, pBIOU und pGPOU Gene, die mit der Modifizierung des Aminosäuregehalts in Zusammenhang standen. Die durchgeführten Analysen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben und alle Daten in Tabelle 3.10 nochmals zusammengefasst. Die PPT-Linien wurden, bis auf den Phänotyp im folgenden Abschnitt, nicht weiter untersucht, da die Analysen dieser wenig vielversprechenden Linien einen unverhältnismässigen Aufwand bedeutet hätten.

3.3.1 Morphologie der Primärtransformanten

Von 16 regenerierten, potentiell transgenen Linien waren alle Pflanzen der Linien A13, 10-A1, 12-1, 12-2, 12-40, 26-1 und 8-5 phänotypisch unauffällig und zur Samenbildung in der Lage. 14-3 und 14-6 entsprachen ebenfalls dem Phänotyp des Wildtyps, wiesen jedoch keine Hülsenbildung (Linie 14-3) bzw. die Bildung von sterilen Hülsen mit verkümmertem Samenansatz auf (Linie 14-6).

Pflanzen der Linie 8-66 (Abb. 3.4 f) zeichneten sich durch eine dunklere, intensiv grüne Laubfärbung, eine festere Blatttextur mit abwärts gekrümmten Blättern (Epinastie), einer reduzierten Blütenbildung und Samenansatz bei höherem Samengewicht und größeren Samen aus. Bei den cytologischen Untersuchungen wurde der tetraploide Status dieser Linie festgestellt (vgl. 3.2.2).

Als ebenfalls tetraploid erwies sich Linie 10-35, die Pflanzen dieser Linie zeichnete buschiger Zwergwuchs mit gestauchten Internodien und schwacher Apikaldominanz aus (Abb. 3.4 a+b). Hülsenbildung trat bei dieser zwergwüchsigen Variante nicht auf.

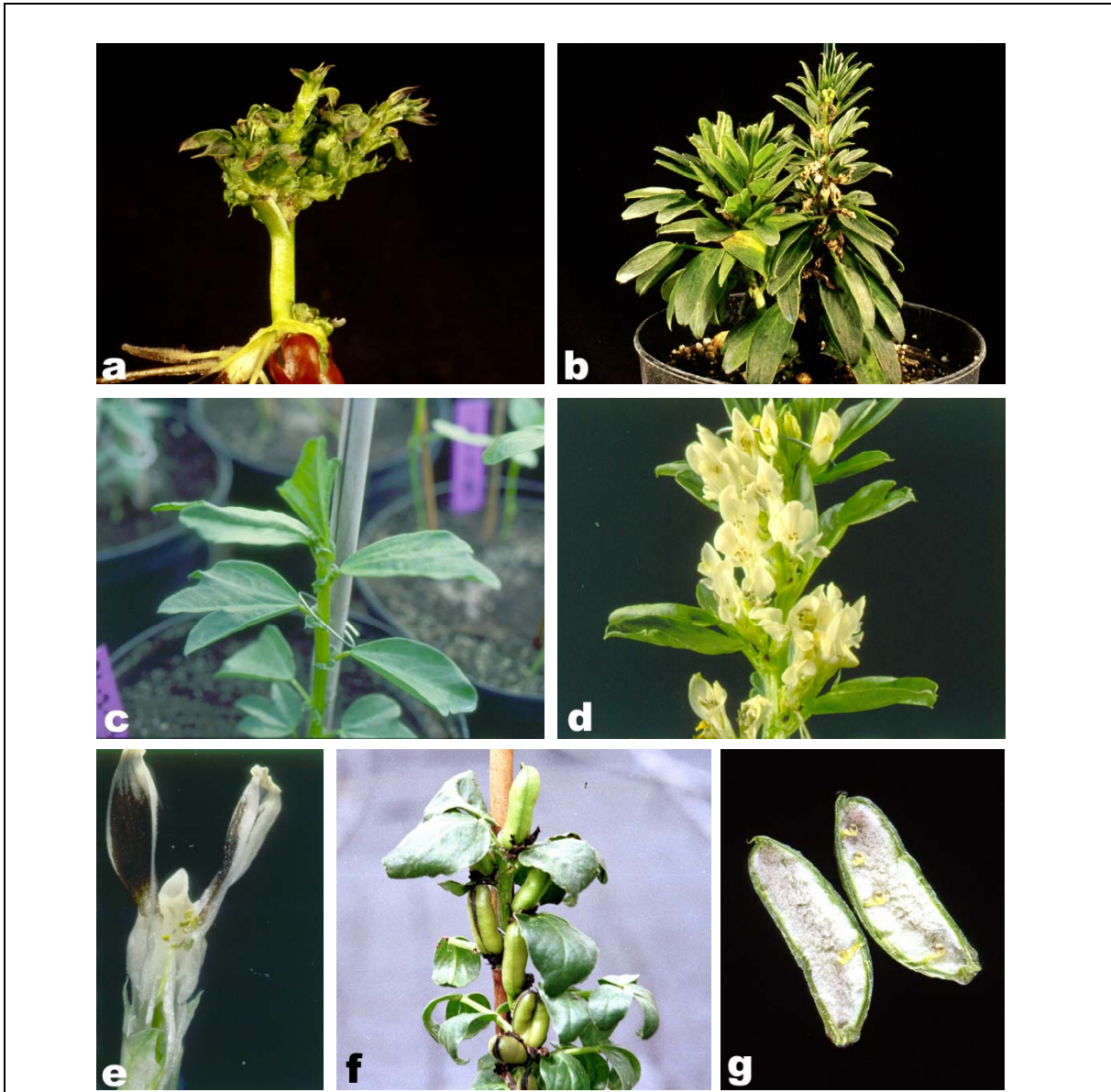


Abbildung 3.4: Morphologie aberranter Phänotypen transgener Linien von *Vicia faba*

a) *In vitro*-Sproß mit mangelnder Internodienstreckung, gepropft auf WT-Keimling als Versuch zur Überwindung des gehemmten Streckungswachstums. **b)** Zwergwüchsige Form von Linie 10-35 mit mehrtriebigem buschigem Habitus. **c)** Die Laubblätter der Linie 26-2 weisen eine vom einfach-gefiederten WT abweichende, dreilappige Blattform auf. **d)** Gestauchte Infloreszenz der Linie 26-3, die Blüten sind nicht fertil. **e)** Missgebildete, sterile Einzelblüte bei Pflanzen der Linie 12-3. **f)** Der Habitus von Linie 8-66 zeigt dunkles, intensiv-grünes Laub, Epinastie der Blätter und reduzierte Hülsenbildung. **g)** Geöffnete, sterile Hülse der Linie 15-1 mit verkümmertem Samenansatz.

Linie 26-2 zeigte statt der normalen, einfach-gefiederten Blätter des Wildtyps von *Vicia faba* eine veränderte dreilappige Blattform (Abb. 3.4 c); Linie 26-3 produzierte gestauchte traubige Blütenstände (Abb. 3.4 d) und war, bei ansonsten unverändertem

Habitus, nicht fertil, was in Form von vielen, deutlich kleineren Hülsen, die keinen Samen enthielten, auch äusserlich in Erscheinung trat.

Bei Linie 12-3 wiesen die Einzelblüten eine völlig aberrante Morphologie auf: Teile der Blütenkrone waren verkümmert oder fehlten ganz, die Staubblätter und Griffel lagen ungeschützt offen (Abb. 3.4 e). Wie aufgrund des missgebildeten Blütenbaus zu erwarten, war diese Linie nicht fortpflanzungsfähig.

Die Pflanzen der Linie 15-1 bildeten größere Einzelblüten mit sehr dunklen Farbmalen aus; die Hülsen, die normal gestaltet waren, enthielten keine bzw. verkümmerte Samenanlagen (Abb. 3.4 g). Linie 15-21 war phänotypisch normal, der Hülsenansatz war, wie auch bei Linie 15-1, steril.

Damit erwiesen sich 9 der Primärtransformanden als phänotypisch mehr oder weniger unauffällig und zur Vermehrung durch Samenbildung in der Lage. Da die Fertilität der T_0 Generation oft eingeschränkt ist, wies die Anzahl der gebildeten Samen eine große Streuung auf, die meist deutlich unter dem Niveau des Wildtyps lag.

Die Versuche, Linien ohne die Fähigkeit zu eigenem Samenansatz durch Bestäubung der Narben mit WT-Pollen zu erhalten, führte in seltensten Fällen zur Bildung von samenhaltigen Hülsen. Der umgekehrte Weg, der Bestäubung von WT-Blüten mit Pollen von transgenen Pflanzen, wurde ebenfalls besprochen, führte jedoch zu keiner erfolgreichen Befruchtung.

3.3.2 Cytologische Untersuchungen

3.3.2.1 Ergebnisse der *Flow Cytometry*

Mit der Methode der Durchflußzytometrie wurde der Ploidiegrad in Blättern der transgenen Linien bestimmt und als DNA Index formuliert. Der DNA-Index definiert das Verhältnis zwischen dem relativen DNA-Gehalt der Testzellen und dem relativen DNA-Gehalt normaler diploider Zellen. Die Messungen werden in Form von Histogrammen dargestellt (Abb. 3.5). Ein *Peak* bei 1,000 entspricht $2n$ und zeigt den „Normalzustand“ eines diploiden Organismus, dessen Zellkerne sich überwiegend in der G_0/G_1 Phase befinden und einen weiteren, kleinen *Peak* bei 2,000 ($=4n$) der Zellkerne, die sich in der G_2 bzw. M-Phase (Bsp. 3.5 a) befinden.

Es wurden für jede Probe 1000 Zellkerne ausgewertet, die Messung tetraploider Proben wurde zweimal wiederholt. Vier von 18 untersuchten Proben wiesen einen tetraploiden Zustand auf, zwei davon mit signifikanter Abweichung vom Sollwert 2,000. Der DNA-Index der Linie 15-1 (1,833) wies auf Verluste, der der Linie 26-2 (DNA-Index 2,142) auf eine Addition von jeweils etwa 10-15% der Erbsubstanz hin. Die Linien 10-35 und 8-66 erwiesen sich als tetraploid. Die tetraploide Linie 8-66 zeigte einen leicht abweichenden

Phänotyp, ihr tetraploider Status war stabil und konnte bis zur dritten Generation verfolgt werden. Linie 10-35 war morphologisch deutlich aberrant und wies eine zwergwüchsige Wuchsformen auf. Abbildung 3.5 zeigt die Histogramme des Wildtyps und von fünf der selektierten Linien. Die DNA-Indices für alle weiteren Linien befinden sich in Tabelle 3.10.

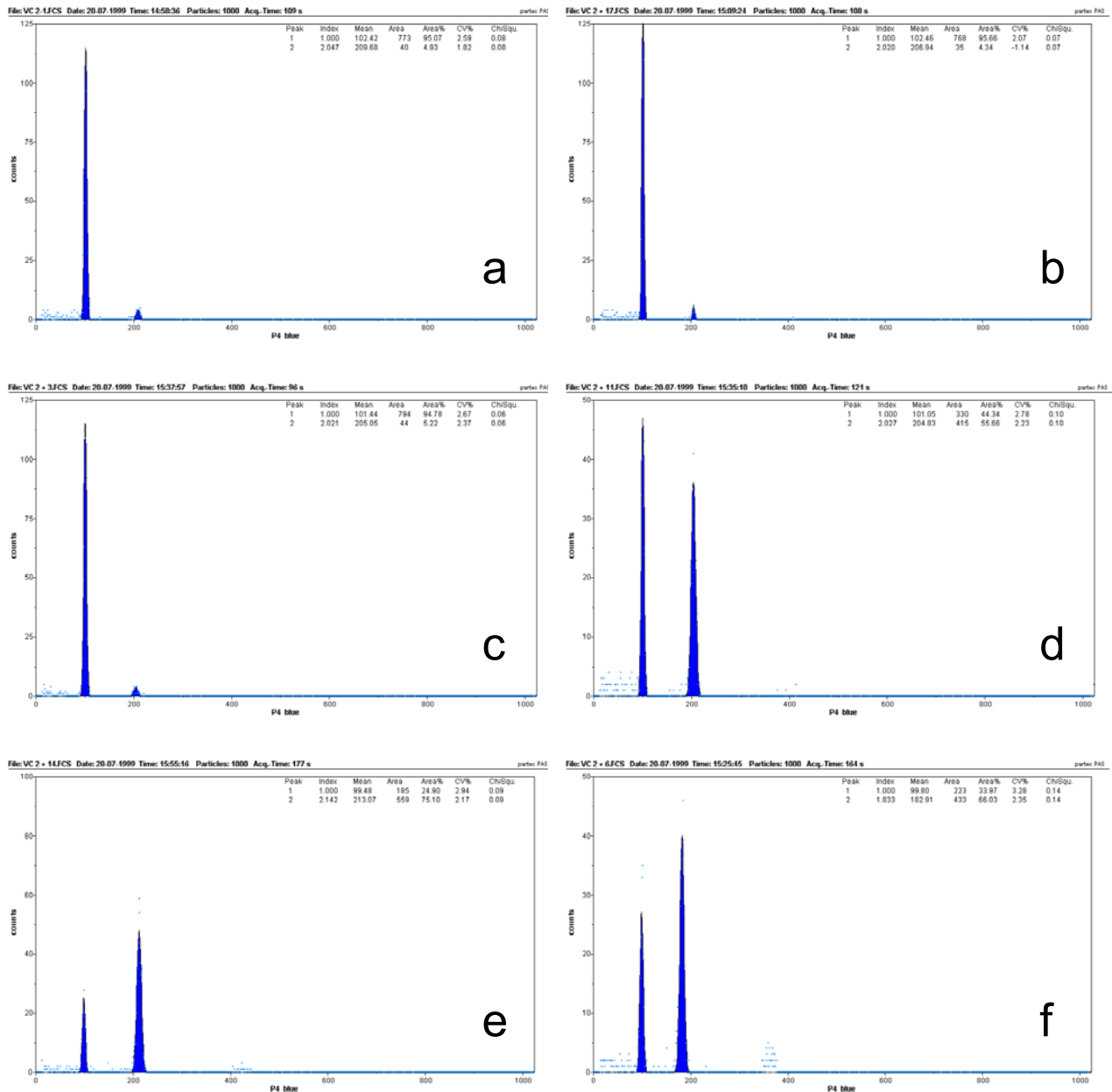
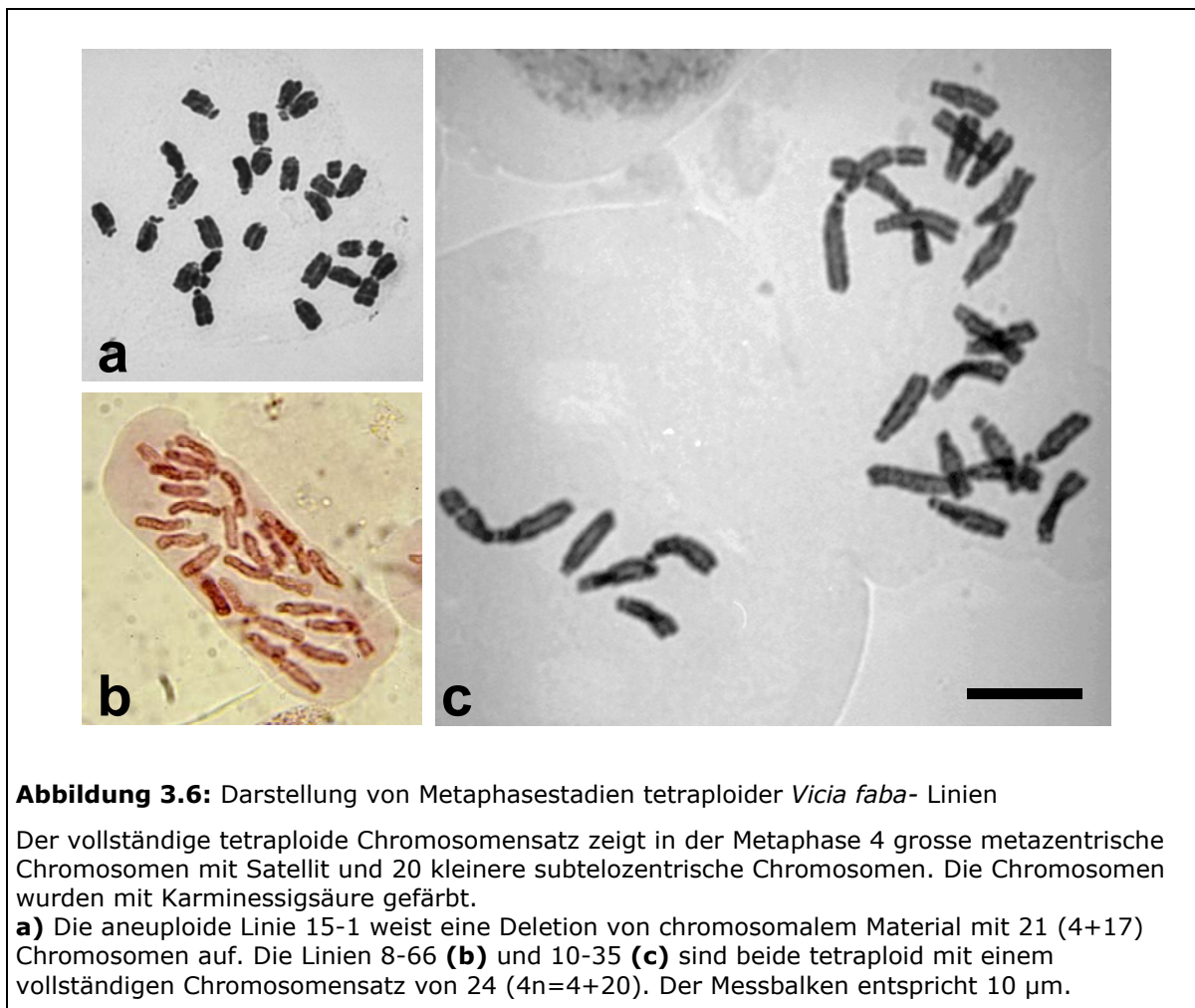


Abbildung 3.5: DNA-Histogramme transgener Linien und WT-Pflanzen von *Vicia faba*

Diploide Pflanzen zeigen in der Durchflußzytometrie einen Karyotyp *Peak* bei 1,000, tetraploide Pflanzen bei 2,000; aneuploide Pflanzen weisen dementsprechend davon abweichende Werte auf. **a)** WT (Karyotyp 2n), **b)** Linie 12-40 (2n), **c)** Linie 8-5 (2n), **d)** Linie 8-66 (4n), **e)** Linie 26-2 (aneuploid, DNA-Index 2,142), **f)** Linie 15-1 (aneuploid, DNA-Index 1,833).

3.3.2.2 Befunde der lichtmikroskopischen Untersuchungen

Wurzelspitzen von *in vitro*-Material und wurzelechten Gewächshauspflanzen oder die Griffel gepfropfter Pflanzen bildeten das Ausgangsmaterial für die cytologischen Untersuchungen. Zur Anreicherung der Metaphasen wurde eine Behandlung mit 0,05%iger Colchicininlösung bzw. mit 2 mM Hydroxychinolin mit gleich guten Ergebnissen durchgeführt. Quetschpräparate solcher Wurzelspitzen bzw. Stempel lieferten meist ausreichend gute Metaphasen zur Darstellung und Bestimmung der Chromosomenzahl.



Der diploide Chromosomensatz bei *Vicia faba* ist $2n = 12$ (2 große metazentrische +10 kleinere subtelozentrische Chromosomen). Abbildung 3.6 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen von tetraploiden Linien mit $4n=24$ Chromosomen. Nur bei Abbildung 3.6. c der tetraploiden Linie 10-35 sind alle 24 Chromosomen gut zu sehen. Abbildung 3.6 b zeigt eine Präparation der Linie 8-66, hier sind ebenfalls $4n = 24$ (4+20) Chromosomen vorhanden, in der Aufnahme sind jedoch nicht alle Chromosomen sichtbar. Abbildung 3.6 a zeigt den vollständigen Chromosomensatz der Linie 15-1, diese Pflanze weist eine

Aneuploidie mit 21 Chromosomen (4+17) auf. Die ebenfalls untersuchten Linien A13, 26-1, 26-3 und 12-2 erwiesen sich als diploid (ohne Abb.). Alle Befunde der Chromosomenpräparation befanden sich in Übereinstimmung mit den durch *Flow Cytometry* ermittelten Werten.

3.3.3 Southern Blot Analyse der T₀/T₁- Pflanzengeneration

Zum Nachweis der Integration der T-DNA und zur Abschätzung der Anzahl der eingefügten Kopien wurde eine Southern Blot Analyse der T₀ bzw. T₁-Generation durchgeführt. Dass manche Pflanzen erst in der T₁ mit Erfolg untersucht werden konnten, lag zum einen daran, dass das hierfür verwendete nichtradioaktive Nachweissystem mit Digoxigeninmarkierung für *Vicia faba* erst etabliert werden musste, zum anderen erwies sich der hohe Materialverbrauch an isolierter DNA als hinderlich. Aufgrund des großen Genoms von *Vicia faba* ($2n = 26$ pg) waren die Signale oft nur schwach zu erkennen (s. Abb. 3.7 a Linie 8-5 und 8-66); dies machte es notwendig, ca. 20 µg DNA pro Spur aufzutragen, um ein Signal erhalten zu können. Der Zellinhalt von älteren Blättern von *Vicia faba* enthielt zudem viele Polyphenole, die den Restriktionsverdau der daraus isolierten DNA störten und die DNA unbrauchbar für die Analyse machten, was viele Wiederholungen erforderlich machte.

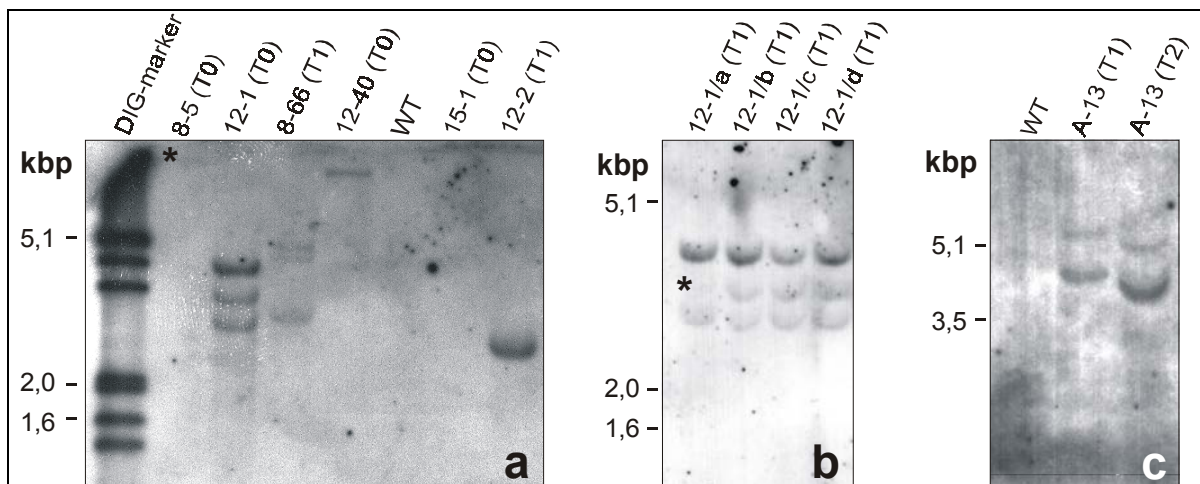


Abbildung 3.7: Southern Blot Analyse der DNA transgener T₀/T₁-Pflanzen mit einer Digoxigenin-markierten, *nptII*-spezifischen Sonde nach Restriktionsverdau mit *Hind*III

a) Die DNA der Linien 8-5, 12-2, 12-40 enthielt jeweils eine Kopie der T-DNA, ebenso 26-1 und 26-2 (nicht abgebildet). Die Bande von Linie 8-5 ist im Original sehr schwach und in der Abbildung kaum zu erkennen (*). Linie A13 zeigte zwei Kopien, die Linien 8-66 und 12-1 enthielten drei T-DNA Kopien. Linie 15-1 zeigte keine Signale und scheint ein nichttransgener „Ausreißer“ (*Escape*) zu sein, der möglicherweise aufgrund seines polyploiden Zustandes (vgl. 3.3.2.2) der Selektion entgehen konnte. Southern Blot Analysen der Folgegenerationen T₁ / T₂ ergaben, dass die Mehrfachkopien des Inserts in der Linie A13 gekoppelt vorlagen (**c**), für Linie 12-1 scheint dies ebenfalls zuzutreffen (**b**), wenn auch die mittlere Bande bei 12-1/a im Original nur schwach und in der Abbildung kaum zu erkennen ist (*).

Die aus jungen Blättern isolierte DNA wurde mit *HindIII* verdaut und auf einem 0,8%igem TBE-Gel aufgetrennt. Als Sonde diente ein DIG-markiertes, 800 bp großes internes *nptII*-Fragment einer *HindIII* Restriktion des Plasmids pHP23 (2.1.4). Die *nptII*-Sonde hybridisierte mit den Übergangssequenzen über die rechte Border der T-DNA hinaus in das Pflanzengenom (vgl. Abb. 3.8). Die Größe der hybridisierenden Fragmente wird durch die nächstgelegene *HindIII*-Schnittstelle im Pflanzengenom bestimmt. Bei vollständiger Integration der T-DNA von der *HindIII*-Schnittstelle bis zur rechten Border muss das signalgebende Fragment mindestens 4 kb für pGSGluc1, bzw. 2,5 kb für pAN109 und pBIOU aufweisen, Fragmente geringerer Größe sind als unvollständig anzusehen. Da die Integration der T-DNA in das Pflanzengenom zufällig erfolgt, müsste jede unabhängig transformierte Linie ein anderes Muster bzw. eine eigene Fragmentgröße aufweisen. Dies erwies sich als zutreffend für alle erzeugten transgenen Linien, d.h. jede Linie zeigte in der Southern Blot Analyse ein anderes Integrationsmuster (Abb. 3.7 a), wobei die sehr schwache Bande der Linie 8-5 aufgrund der Wiedergabequalität in der Abbildung nicht zu erkennen ist. Abbildung 3.7 b zeigt die Luminographie der Southern Blot-Analyse von vier verschiedenen Nachkommen der Linie 12-1. Obwohl die mittlere Bande bei 12-1/a etwas schwächer erscheint, kann dennoch von einer gekoppelten Weitergabe der drei Banden ausgegangen werden. Abbildung 3.7 c zeigt das Hybridisierungsmuster von T₁- und T₂-Pflanzen der Linie A13, welche diesselbe Doppelbande aufweisen. Der „smile“ der Banden rechts in Spur 3 ist ein Überladungseffekt. Weitere Southern Blot Analysen nachfolgender Generationen von A13 wiesen stets das Doppelbandenmuster auf (ohne Abbildung), hier kann mit grosser Wahrscheinlichkeit von einer Kopplung der beiden Kopien ausgegangen werden.

3.3.4 PCR Analysen der Nachkommenschaft transgener Linien

Ein neueingefügtes Gen wirkt als dominantes Merkmal, da ein entsprechender Locus auf dem homologen Chromosom nicht existiert. Bei hemizygoten Linien sollte dementsprechend bei einer Rückkreuzung eine Aufspaltung in der Vererbung des Transgens von 3:1 (nach Mendel) auftreten. Mit den sieben transgenen Linien, die Samen produzierten, wurden Segregationsanalysen durchgeführt und die Weitervererbung der eingefügten heterologen Gene in den Folgegenerationen (T₁ und T₂) mittels PCR untersucht und dokumentiert (Abb. 3.9, Tab. 3.9). Bei den Nachkommen der Linie A13 konnte das Vorhandensein der *nptII*-Sequenz über PCR-Analyse bis zur siebten Generation verfolgt und mit den Ergebnissen der histochemischen GUS-Färbung korreliert werden. Bei den AK- und SFA8-Linien wurden sowohl Primer für den Selektionsmarker (*nptII*) als auch für das „gene of interest“ (*lysC* oder *sfa8*) eingesetzt (Tab. 3.9). In Abbildung 3.8 sind die codierenden Bereiche der drei Vektoren pGSGluc1, pBIOU und pAN109 schematisch dargestellt, die Positionen der verwendeten Primer für die PCR-Amplifikation sind durch Pfeile angegeben. Die PCR-Amplifikation führte mit der Verwendung von 200-500 ng DNA-Template i. d. R. zu den erwarteten Signalen, wenn die extrahierte DNA nicht zu stark durch polyphenolische Zellinhaltsstoffe verunreinigt

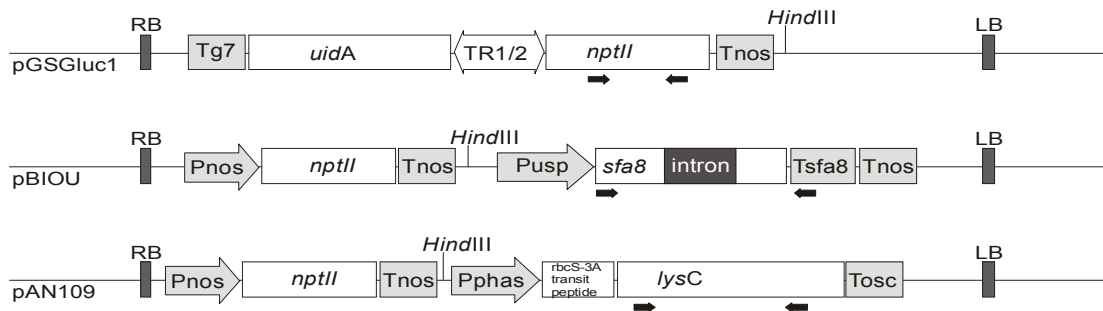


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der T-DNA Bereiche der Vektoren pGSGluc1, pBIOU und pAN109, die Positionen der Primer sind durch schwarze Pfeile angezeigt.

war. Traten zu viele der phenolischen Komponenten als Beimischung auf, war die DNA ungeeignet für die PCR-Amplifikation und lieferte falsch-negative Ergebnisse. Deshalb wurden PCR-Ergebnisse grösstenteils mit einer zweiten DNA-Extraktion abgesichert. Abbildung 3.9 zeigt ein Agarosegel mit dem Ergebnis einer PCR Amplifikation mit spezifischen Primern für die codierenden Sequenzen von *sfa8* und *lysC* aus der Nachkommenschaft der Linien 8-5 und 12-2. Plasmid-DNA der zur Transformation verwendeten Vektoren wurde ebenfalls amplifiziert als Kontrolle für die PCR-Reaktion und die richtige Grösse des Amplifikats.

Die anhand der PCR erstellten Analysen der Nachkommenschaft zeigten in etwa die erwartete 3:1 Aufspaltung nach Mendel, die nach der Selbstbestäubung der Pflanzen auftreten sollte (Tab. 3.9). Eine statistische Auswertung war nicht möglich, da die reduzierte Vitalität der T_0/T_1 Pflanzen eine zu geringe Anzahl an Samen für diesen Zweck hervorbrachte.

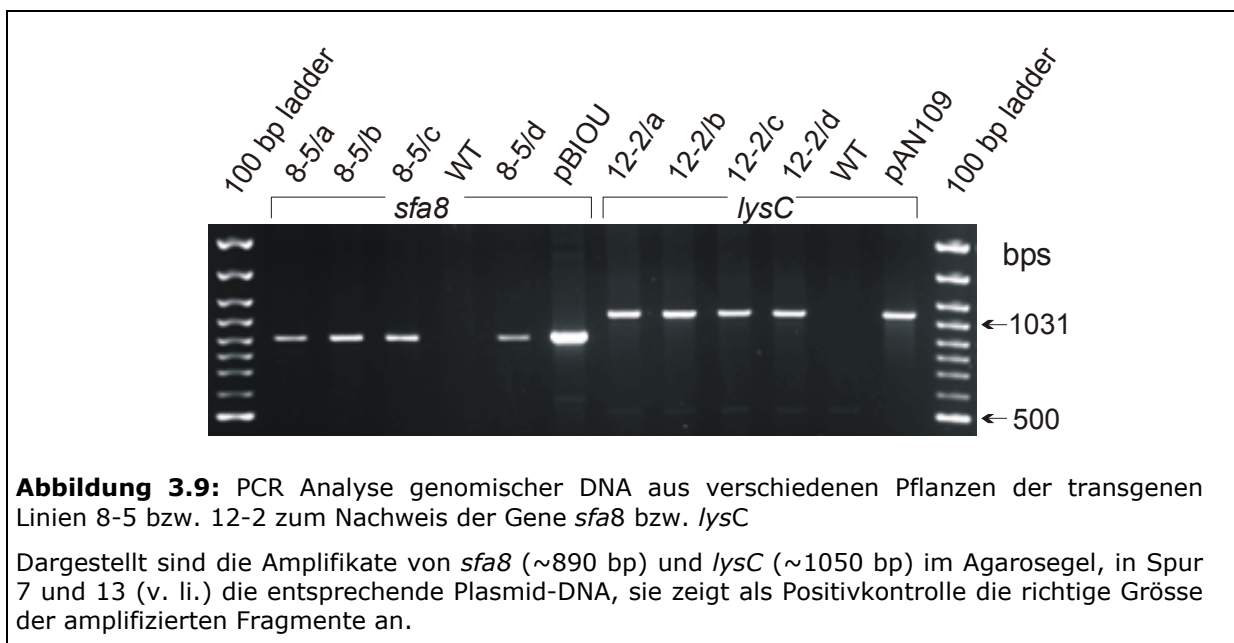


Abbildung 3.9: PCR Analyse genomischer DNA aus verschiedenen Pflanzen der transgenen Linien 8-5 bzw. 12-2 zum Nachweis der Gene *sfa8* bzw. *lysC*

Dargestellt sind die Amplifikate von *sfa8* (~890 bp) und *lysC* (~1050 bp) im Agarosegel, in Spur 7 und 13 (v. li.) die entsprechende Plasmid-DNA, sie zeigt als Positivkontrolle die richtige Grösse der amplifizierten Fragmente an.

Ein PCR *Screening* der transgenen Populationen führte zur Identifizierung homozygoter Pflanzen bzw. Sublinien, wenn die Segregationsanalyse in der Folgegeneration keine negativ-ausspaltenden Pflanzen mehr aufwies. Dies erwies sich als zutreffend für Linie 12-2, die in der T₂ eine Aufspaltung des Transgens von 15(+):0(-) zeigte, bezogen auf die amplifizierte PCR Signale von *nptII* und *lysC* (Tab. 3.9). Alle nachfolgend getesteten Pflanzen dieser Linie zeigten durchgängig positive Signale bezüglich *nptII* und *sfa8*, sowohl in der PCR-Analyse als auch bei weitergehenden Untersuchungen wie enzymatischen AK-Assays oder Western Blot-Analysen (vgl. 3.3.6.3).

Tabelle 3.9: PCR Analyse der Nachkommenschaft transgener Linien zur Aufspaltung der transgen-vermittelten Merkmale

Die Integration des Transgens wurde für alle Linien durch Southern Blot Analyse in der T₀ oder T₁ bestätigt. Die vorgefundene Aufspaltung in positive und negativ-transgene Nachkommen entsprach in etwa den (nach Mendel) erwarteten Werten von 3:1 für die Vererbung eines transgenen Locus als dominantes Merkmal. Die Werte für die Nachkommen der *uidA*-transformierten Linie A13 wurden ergänzt durch die Ergebnisse der histochemischen GUS-Assays.

| Linie | T ₀ Southern Blot Analyse | T ₁ | | | | T ₂ | | | |
|-------|---|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | | PCR <i>nptII</i> | PCR <i>lysC</i> | PCR <i>sfa8</i> | GUS- Aktivität | PCR <i>nptII</i> | PCR <i>lysC</i> | PCR <i>sfa8</i> | GUS- Aktivität |
| A13 | (+) ¹ | 9:2 ² | - | - | 12:4 | 7:2 | - | - | 11:4 |
| 8-5 | (+) ¹ | 10:3 | - | 10:3 | - | 8:3 | - | 8:3 | - |
| 8-66 | + | 1:0 | - | 1:0 | - | 4:1 | - | 4:1 | - |
| 26-1 | + | 1:0 | - | 1:0 | - | nd | - | nd | - |
| 12-1 | + | 9:0 | 9:0 | - | - | nd | 16:3 | - | - |
| 12-2 | (+) ¹ | 1:0 | 1:0 | - | - | 15:0 ³ | 15:0 | - | - |
| 12-40 | + | nd | 4:2 | - | - | 3:1 | 3:1 | - | - |

¹T-DNA Nachweis in der T₁, ²positiv/negativ, ³vermutlich homozygot

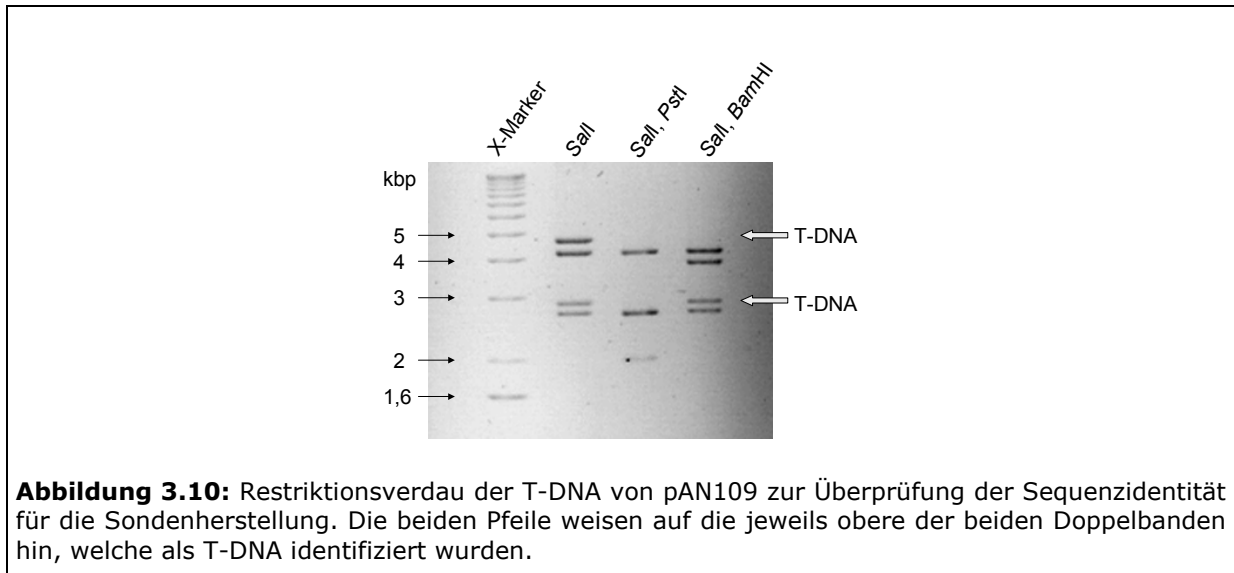
Eine homozygote Sublinie der Linie A13 wurde in der T₃ anhand der *nptII* Amplifikation und der GUS-Expression identifiziert, beide Merkmale konnten bis zur 7. Generation verfolgt und stabil nachgewiesen werden. Ebenfalls in der T₃ wurde eine homozygote Sublinie von 8-5 identifiziert, sie wies jedoch einen stark reduzierten Samenansatz auf und war aufgrund dessen schwierig weiterzuverfolgen. Für Linie 12-1 konnte bislang keine homozygote Sublinie selektiert werden.

3.3.5 Cytogenetische Untersuchungen der Linien 12-1 und 12-2: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Ziel der Untersuchungen war es, die Anzahl und physikalische Lokalisierung des Transgens auf den Chromosomen der Linien 12-1 (hemizygot, 3 gekoppelte T-DNA Kopien plus einer fragmentarischen Kopie) und 12-2 (homozygot, T-DNA Einzelkopie) zu charakterisieren. Dazu wurden von beiden transgenen Linien Chromosomenpräparate angefertigt und diese mit fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisiert.

Für die Durchführung von Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ist die Herstellung qualitativ hochwertiger Chromosomenpräparate unabdingbar. Die in der Lichtmikroskopie üblichen Quetschpräparate waren hierfür nicht geeignet, da sie normalerweise zuviel Zelltrümmer enthielten. Die Präparation der Chromosomen erfolgte mit Hilfe enzymatischen Zellwandabbaus und anschließendem Auftropfen der gereinigten Zellsuspension auf gereinigte, vorgekühlte Objektträger. Die DAPI-Färbung der Präparate zeigte gut verteilte, nahezu cytoplasmafreie Chromosomen. Vor der Verwendung für die *in situ*-Hybridisierung wurden geeignete Präparate mit mindestens 4-5 guten Metaphasen mit vollständiger Chromosomenzahl im Phasenkontrastmikroskop ausgewählt und markiert.

Zur Herstellung einer Sonde für die *in situ*-Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen sollte die 8 kb große T-DNA des Übertragungsvektors verwendet werden. Da in *A. tumefaciens* keine großen Mengen an Plasmid-DNA angereichert werden, wurde der Vektor in kompetente *E. coli* übertragen und dort vermehrt. Die daraus isolierte Plasmid-DNA wurde zur Verifizierung mit mehreren Restriktionsenzymen verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Zur Trennung der T-DNA von der *backbone*-Sequenz an der linken und rechten Border wurde mit *SalI* geschnitten. Diese Schnittstelle ist viermal im Vektor vorhanden und teilt das Plasmid in vier nahezu gleich große Sektoren. Durch Schneiden mit weiteren Restriktionsenzymen (*PstI* bzw. *BamHI*) konnte die jeweils obere der beiden Doppelbanden als die beiden Teile der T-DNA identifiziert werden (Abb. 3.10).



Mit Hilfe eines präparativen Gels wurden die Fragmente aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Die Konzentration der eluierten T-DNA betrug 50 ng/μl. Vor der Sondenmarkierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC (grün) oder CY3 (rot) über *nick translation* wurde die DNA durch 5minütiges Autoklavieren geschert, die dabei entstandenen Fragmente wiesen eine Größe zwischen 200 und 500 bp auf.

Präparate der Linie 12-2 wurden mit der FITC-markierten spezifischen T-DNA Sonde und einer 25S rDNA CY3-markierten Sonde aus *Arabidopsis thaliana* (Snowdon *et al.* 2000) als Positivkontrolle hybridisiert. In mehreren Metaphasenpräparationen der Linie 12-2 konnte die Detektion des grün fluoreszierenden Hybridisierungssignals der Sonde gezeigt werden (Abb. 3.11 a-c). Die Doppelsignale der beiden Chromatiden konnten im distalen

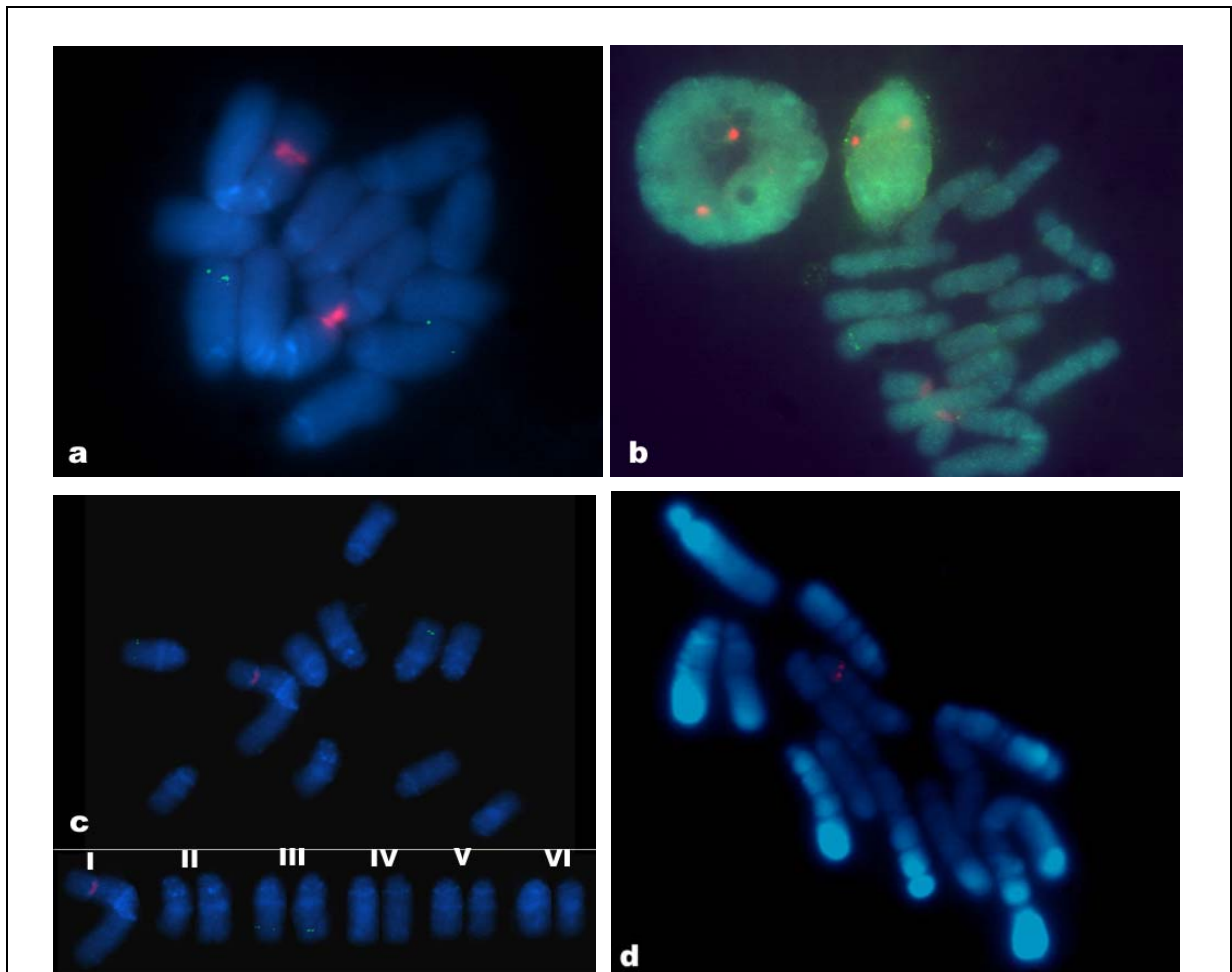


Abbildung 3.11: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung des 8 kb großen T-DNA Inserts in Metaphase- und Interphase-Chromosomen der Linie 12-1 und 12-2; die Gegenfärbung der chromosomalen DNA mit DAPI zeigt blaue Fluoreszenz.

a) Metaphase der Linie 12-2 zeigt alle 12 Chromosomen des diploiden Chromosomensatzes von *Vicia faba* mit Hybridisierungs-Signalen der 25S rDNA (rot) auf dem grossen Chromosom I und des 8 kb T-DNA Inserts (grün) auf beiden homologen Chromosomen.

b) 12-2 Metaphasenchromosomen und Interphasenkerne zeigen Hybridisierungssignale wie unter a) beschrieben.

c) Karyogramm von 12-2: Chromosom I ist nur einmal zu sehen, das Hybridisierungssignal der T-DNA-Sonde lokalisiert das Insert im distalen Bereich des längeren Arms von Chromosom III, Chromosomen-Nomenklatur (römische Ziffern) nach Fuchs *et al.* 1998.

d) Metaphasenpräparation der hemizygoten Linie 12-1, das Hybridisierungssignal der CY3-markierten Sonde (rot) des T-DNA-Inserts ist nur einmal zu erkennen.

Bereich des längeren Arms von *Vicia faba* Chromosom III lokalisiert werden. Auch bei einigen Interphasekernen (Abb. 3.11 b) war das Hybridisierungssignal des Einzelkopie T-DNA-Inserts nachweisbar. Die rot fluoreszierende 25S rDNA-Sonde war als Positivkontrolle zuverlässig in allen Präparationen auf dem grossen metazentrischen Chromosom I zu erkennen.

Chromosomenpräparate der Linie 12-1 wurden mit der CY3-markierten Sonde hybridisiert, das T-DNA-Insert erscheint rot (Abb. 3.11 d). Die hier vorgefundenen Ergebnisse zeigten sich uneinheitlich, es wurden seltener Hybridisierungssignale entdeckt. Dies wurde dem hemizygoten Status der Linie zugeschrieben, da bei Probennahme der Wurzelspitzen der genetische Status der jeweiligen Pflanze noch nicht bestimmt war. Bei keiner der untersuchten Chromosomenpräparationen dieser Linie wurden mehrere Integrationsorte für die T-DNA gefunden. Die Gegenfärbung mit DAPI der markierten Chromosomen zeigt im Fluoreszenzmikroskop A/T-reiche Regionen an. Die dadurch zustande kommende charakteristische Bänderung der Chromosomen erleichtert ihre Zuordnung, ähnlich der Giemsa-Färbung für das Lichtmikroskop.

3.3.6 Expressionsanalysen

Die Expressionsanalysen in den folgenden Abschnitten sind entsprechend den unterschiedlichen Eigenschaften der übertragenen Gene nach Linien und nicht nach Methoden geordnet. Zur besseren Übersicht werden die *lysC*-transformierten Linien zusammenfassend als AK-Linien, die mit *sfa8*-transformierten als SFA8-Linien bezeichnet.

3.3.6.1. Analyse der GUS – Expression in Linie A13

Pflanzen einer in der T₃ selektierten homozygoten Sublinie von A13 wurden auf die Expression des TR1/2-gesteuerten *uidA*-Gens untersucht. Die charakteristische Blaufärbung, verursacht durch die β -Glucuronidase-Aktivität in transgenen Zellen bei Inkubation mit X-Gluc, konnte in verschiedenen Teilen des pflanzlichen Gewebes nachgewiesen werden: in Wurzelspitzen, im parenchymatischem Gewebe der Wurzelknöllchen und in den Cotyledonen unreifer und reifer Samen sowie der inneren Zellschicht der Samenhülle (Abb. 3.12 a-e). GUS-Aktivität in jungen Blättern trat nur nach Verwundung auf, eine Folge der bekannten Gewebespezifität und Wundinduzierbarkeit des TR1/2-Promotors (Saito *et al.* 1991). Die GUS-Aktivität in den homozygoten Sublinien von A13 konnte bis in die 7. Generation als stabil vererbbares Merkmal verfolgt werden.

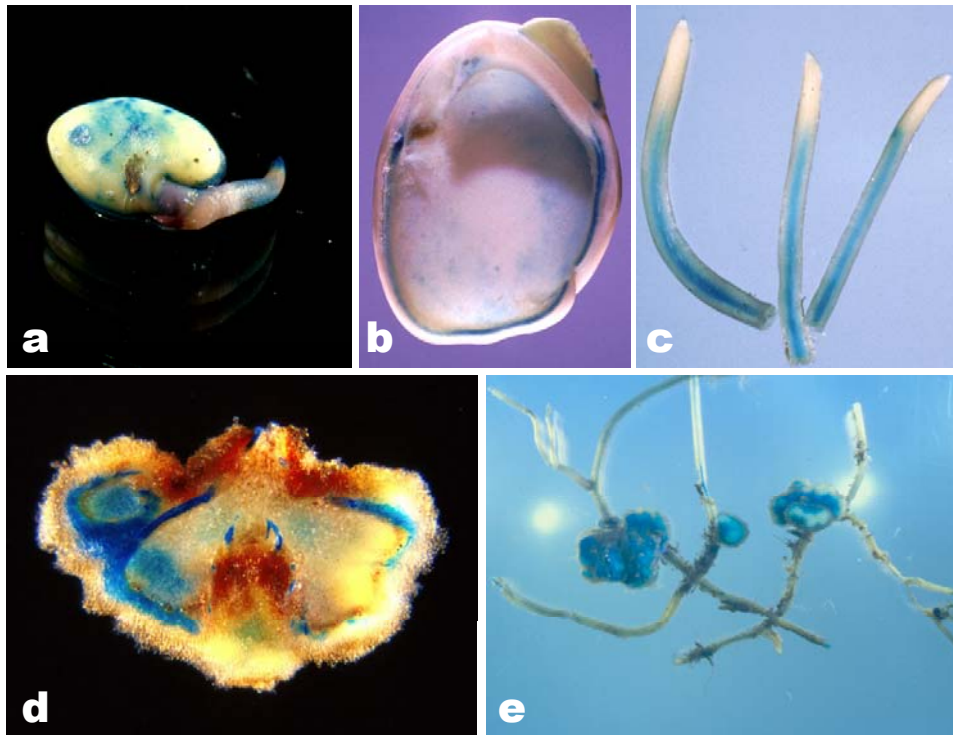


Abbildung 3.12: Histologischer GUS-Assay der *uidA*-Expression bei *Vicia faba* A13 in verschiedenen Geweben und Pflanzenteilen

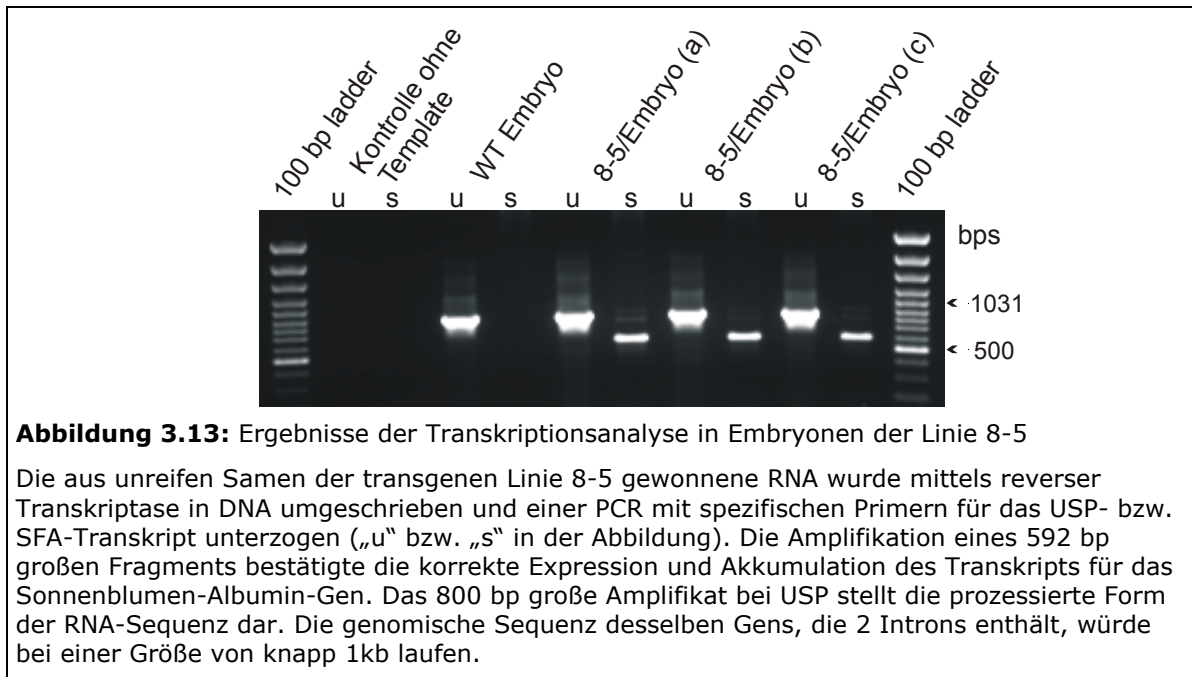
Durch Blaufärbung des pflanzlichen Gewebes wird die Aktivität der β -Glucuronidase, dem Genprodukt des übertragenen *uidA*-Gens, in verschiedenen Geweben der transgenen Linie A13 sichtbar gemacht. **a)** Blaufärbung eines unverletzten Samens nach der Keimung ohne Samenschale, **b)** Samenschale geöffnet, Innenansicht, **c)** GUS-exprimierende Wurzelspitzen, **d)** Schnitt durch ein Wurzelknöllchen zeigt parenchymatisches Gewebe mit GUS-Aktivität, **e)** junge Wurzeln mit Wurzelknöllchen in Aussenansicht.

3.3.6.2 Nachweis der Aktivität des 2S-Albumin 8-Gens (*sfa8*)

3.3.6.2.1 Analyse der Transkriptionsaktivität über RT-PCR

Zum Nachweis der Expression des *sfa8*-Gens aus *Helianthus annuus* wurde aus unreifen Samen der Linie 8-5 (25 Tage nach der Befruchtung) RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Der dem *sfa8*-Gen vorgeschaltete samenspezifische USP-Promoter hat seine stärkste Aktivität während der Samenentwicklung von *Vicia faba* (Bassüner *et al.* 1988), wo große Mengen des Transkripts akkumulieren. Die Transkriptaktivität des endogenen *usp*-Gens konnte deshalb als interne Kontrolle für die cDNA-Synthese und die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Das Ergebnis der RT-PCR zeigte für *sfa8* die Amplifikation eines 592 bp großen Fragments (Abb. 3.13). Die um 300 bp geringere Größe des amplifizierten Fragments gegenüber der genomischen PCR entspricht der Größe des Introns. Die Identität der amplifizierten cDNA wurde darüber hinaus durch

Sequenzierung bestätigt. Das amplifizierte *usp* Fragment wies mit 800 bp eine klar unterscheidbare Größe gegenüber der genomischen Sequenz desselben Gens auf, die zwei Introns mit 110 und 81 bp aufweist (Bäumlein *et al.* 1991). Das Signal des *usp*-Gens war durchgehend stärker als das von *sfa8*, was eine schwächere Expression des Konstrukts gegenüber dem endogenen Gen bei gleichem Promotor anzeigt.

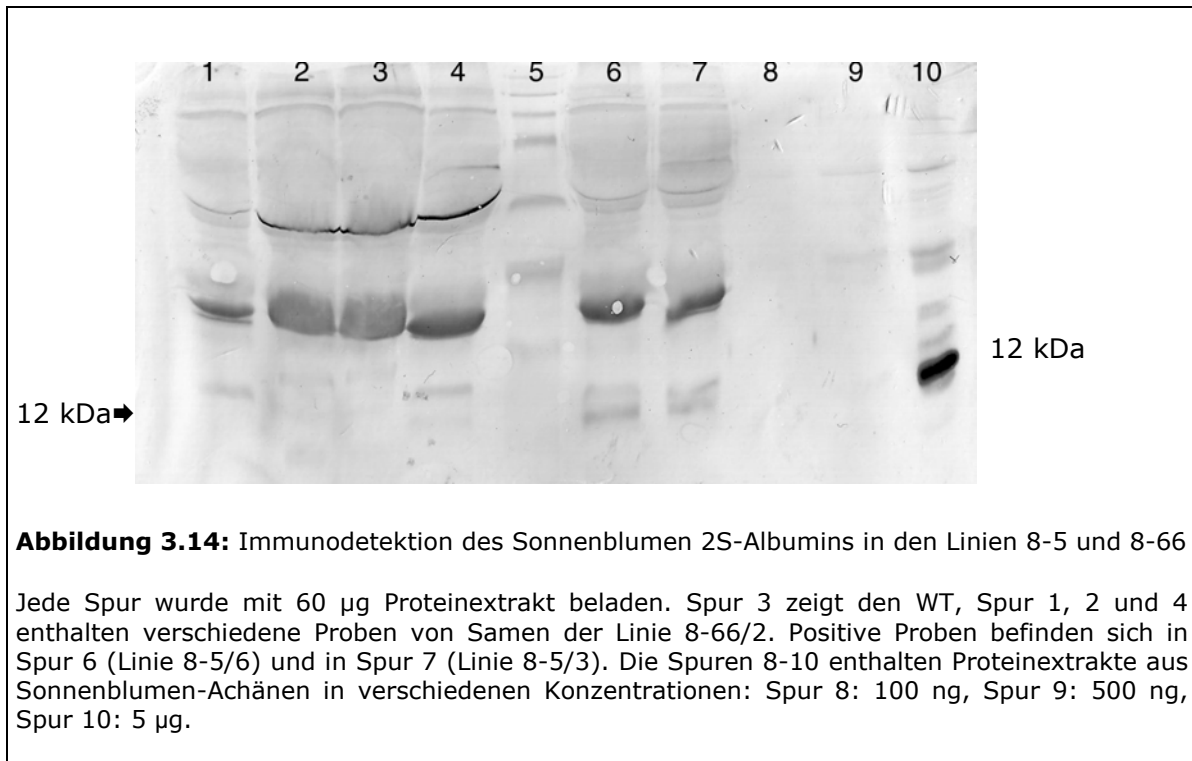


3.3.6.2.2 Western Blot Analyse der SFA8-Linien

Aus Mehl der T₁-Samen der Linien 8-5 und 8-66 wurden Proteine extrahiert und die gewonnene Proteinfraktion auf die Akkumulation des Sonnenblumen 2S-Albumins untersucht. Die in der Arbeitsgruppe von H. Schroeder (CSIRO, Canberra, Australien) durchgeführte Western Blot Analyse zeigte bei 4 Proben 3 negative und 1 schwach positives Ergebnis in der Linie 8-5 (ohne Abbildung).

Weitere Untersuchungen wurden mit Nachkommen der Sublinien 8-5/2 (homozygot für *sfa8*), 8-5/3, und 8-5/6 (beide hemizygot) durchgeführt. Proteinextrakte gleicher Mengen, die in einem 15%igen PAGE-SDS Mini-Gel aufgetrennt worden waren, wurden über Nacht mit dem SFA8-spezifischen Polypeptid-Antikörper aus Kaninchen der Fa. Eurogentec (Belgien) inkubiert. Die Spezifität des Antikörpers wurde mit einem Proteinextrakt aus Achänen von *Helianthus annuus* getestet, der ca. 6-7% Anteile des entsprechenden Albumins im Gesamtprotein enthält. Im Nanogrammbereich (100-500 ng Protein) waren keine Signale zu sehen, deutliche Bandensignale wurden ab 5 µg Protein erzielt (Abb. 3.14). Das Immunoserum zeigte deutliche Kreuzreaktionen mit anderen Polypeptiden der untersuchten Proteinextrakte, die jedoch unterscheidbar zu der spezifischen Reaktion blieben. Die getesteten Samen zeigten mehr negative als positive

Proben, in einem Verhältnis von ca. 3:1. Alle auftretenden positiven Expressionssignale waren nur schwach bei ca. 12 kDa zu erkennen (Abb. 3.14). Die geringe Bandenintensität im Vergleich mit dem Proteinstandard liess im besten Fall auf eine Akkumulation von höchstens 0,2% Anteil am Gesamtprotein schließen.



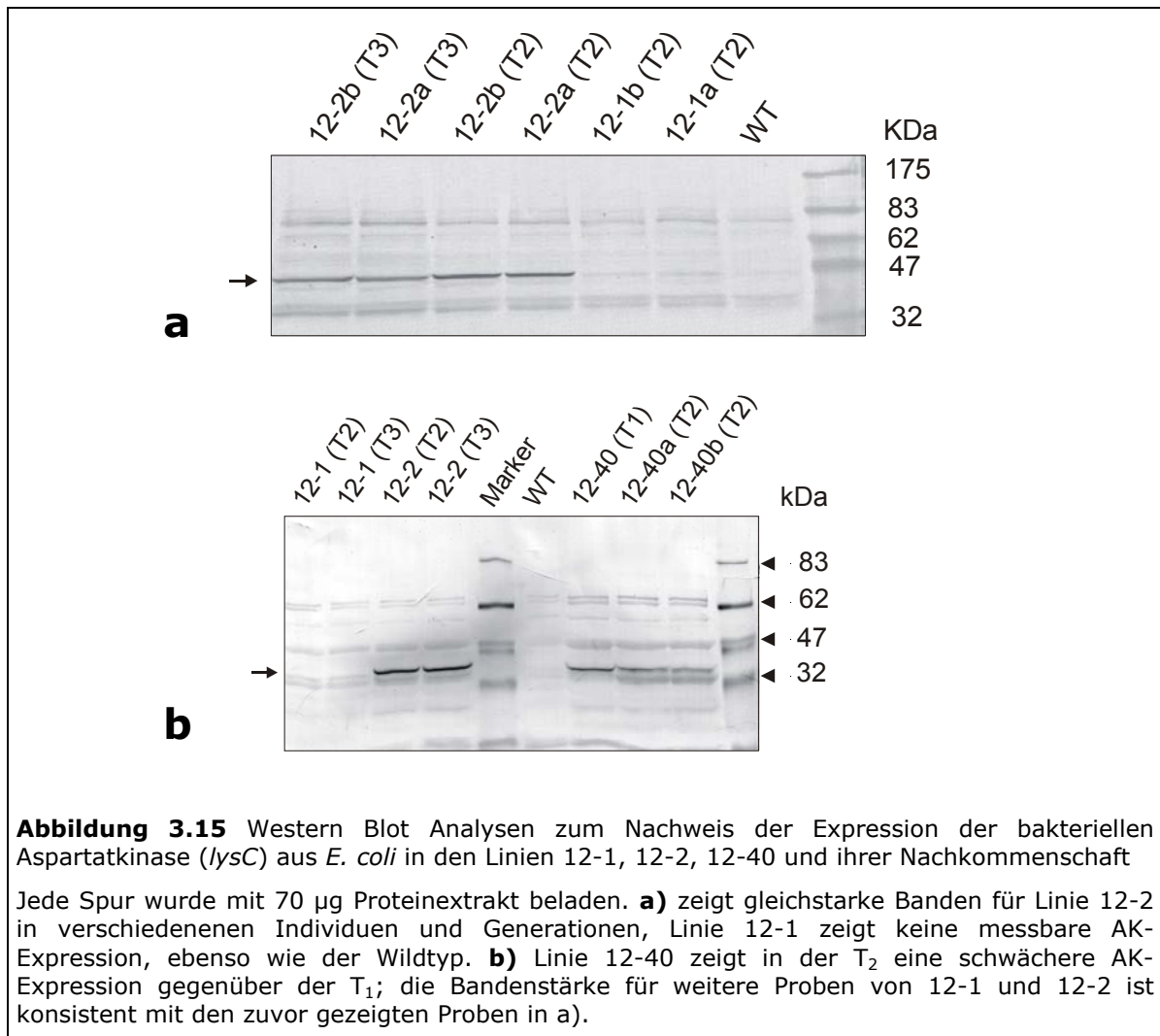
3.3.6.3 Nachweis der Genexpression von *lysC* in den AK-Linien

3.3.6.3.1 Nachweis der bakteriellen Aspartatkinase durch Western Blot Analyse

Proteinextrakte reifer Samen der transgenen AK-Linien 12-1, 12-2, 12-40 wurden einer Western Blot Analyse mit einem polyklonalen Antikörper unterzogen, der spezifisch für die bakterielle *feedback*-insensitive Aspartatkinase, dem Genprodukt von *lysC* ist. Für jede Probe wurden 70 µg Protein auf ein 10%iges Polyacrylamid-Gel geladen und aufgetrennt, zur Größenbestimmung wurde ein Standardproteinmarker von New England Biolabs aufgetragen.

Das Aspartatkinase-Protein konnte in Samen der Linien 12-2 und 12-40 bei 47 kDa detektiert werden (Abb. 3.15 a+b). Weitere auftretende schwächere Banden konnten als Background gut von dem deutlich stärkeren spezifischen Signal unterschieden werden. Bei keinem der Samen der auf DNA-Ebene positiven Klone oder Nachkommen der Linie 12-1 wurde in der Immunodetektion spezifische Signale für die Expression von *lysC* gefunden (Abb. 3.15 a+b). Weitere untersuchte Proben der Linien 12-1 und 12-2

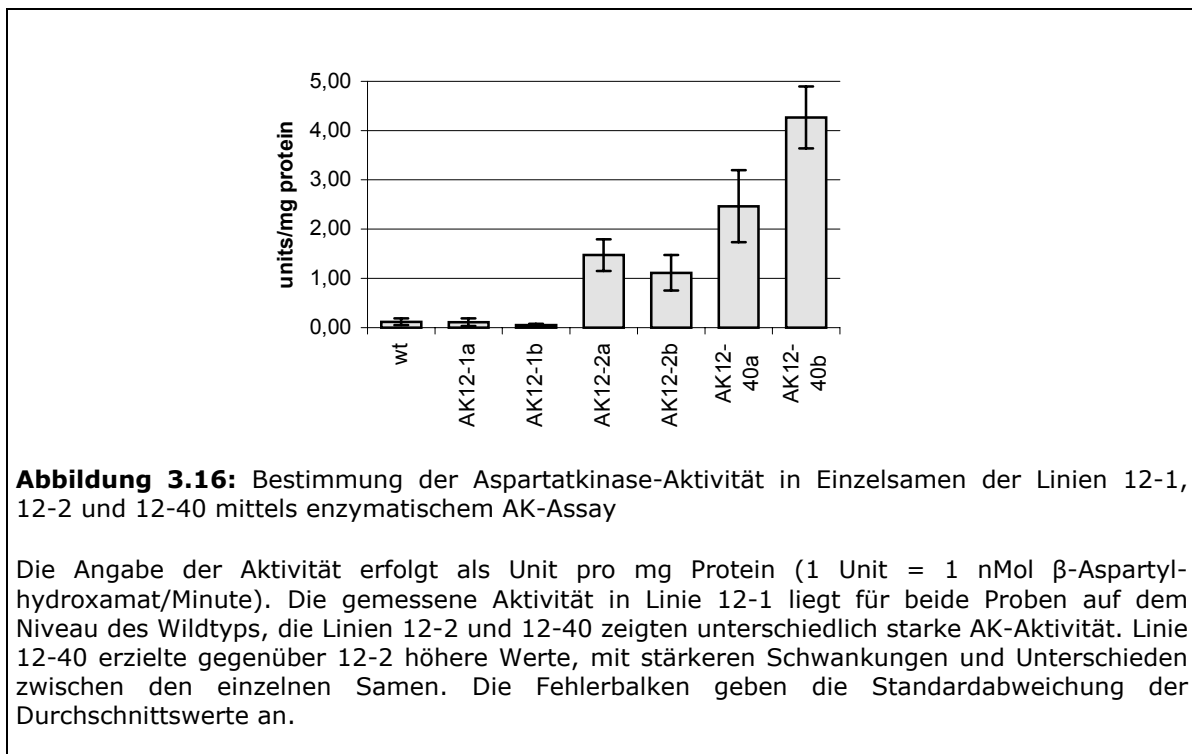
bestätigten die Konstanz der für diese beiden Linien gefundenen Werte. So lieferte Linie 12-2 in allen untersuchten Proben stets positive, gleichstarke Signale, Linie 12-1 dagegen erwies sich in allen Untersuchungen zur Expression des Transgens stets negativ.



Für Linie 12-40 wurden positive und negative Proben gefunden, dies korrespondierte mit dem auf DNA-Ebene ermittelten hemizygoten Zustand dieser Linie. Es zeigte sich, dass Banden der Proben aus der T₂ weniger stark als die der Proben aus der T₁ waren (Abb. 3.15 b). Dies könnte als ein Gen-Dosis-Effekt des hemi- bzw. homozygoten Zustands einzelner Pflanzen für das Transgen gewertet werden, da alle Spuren des Gels mit identischen Mengen an Proteinextrakt beladen wurden und dies im Gel mit Coomassie-Färbung überprüft worden war (ohne Abb.). Da für Linie 12-40 bislang keine homozygote Sublinie ermittelt werden konnte, liess sich kein Vergleich der Expression homozygoter und hemizygoter Sublinien erstellen.

3.3.6.3.2 Darstellung der Aspartat Kinase Aktivität (AK-Assay)

Die Bestimmung der Aspartatkinase-Aktivität erfolgte nach einer Methode von Shaul & Galili (1992). Für diesen Test waren Teile der Cotyledonen reifer Samen einzeln zu Samenmehl verarbeitet und gleichgrosse Mengen an Protein des Rohextrakts auf die enzymatische Aktivität der Aspartatkinase untersucht worden. Die Aktivität der Aspartatkinase wurde bei positiven Proben durch Farbumschlag des Hydroxylamin-haltigen Reaktionspuffers von gelb nach rot sichtbar gemacht. Für die Angabe der spezifischen Aktivität wurde der Substrat-Umsatz je Zeiteinheit und mg Protein zu Hydroxamat ermittelt, dazu wurden die im Photometer bestimmten OD₄₉₀-Werte mit einer Hydroxamat Standardreihe verglichen und bestimmt. Jede Messung wurde dreimal wiederholt. Abbildung 3.16 zeigt die ermittelten Durchschnittswerte der Messungen, Schwankungen der Messwerte werden durch Fehlerbalken angegeben.



Alle aus der T₂ und T₃ getesteten Samen der Linie 12-2 waren durchgängig positiv für die Expression der Aspartatkinase, mit annähernd gleichmäßiger Stärke der Aktivität. Die untersuchten Samen der Linie 12-1 zeigten keine messbare AK-Aktivität.

Linie 12-40 zeigte eine Aufspaltung in AK-positive und negative Nachkommen, entsprechend dem Hemizygoten Zustand dieser Linie, wobei die Stärke der AK-Aktivität in den AK-positiven Samen über einen größeren Bereich verteilt war als bei der homozygoten Linie 12-2 (Abb. 3.16).

Die Ergebnisse dieser Messungen standen in Übereinstimmung mit den bei der Western Blot-Analyse ermittelten Werten: in allen Fällen wurde keine Proteinakkumulation der bakteriellen Aspartokinase bei den Samen der Linie 12-1 nachgewiesen, Linie 12-2 zeigte eine beständige AK-Expression in allen durchgeführten Messungen. AK-Aktivität konnte bei Linie 12-40 in mehr als 50% der Proben nachgewiesen werden.

3.3.7 Zusammenfassung der etablierten Linien und ihrer Eigenschaften

Die folgende Tabelle fasst die im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisierten Linien zusammen. Von den 12 ausführlich untersuchten Linien erwiesen sich zwei (10-35 und 15-1) in den genomischen Analysen als nicht-transgen, möglicherweise versetzte sie ihr tetraploider Status in die Lage, die Selektion mit einer erhöhten Stoffwechselrate zu überstehen. Die beiden PPT-resistenten Primärtransformanten 14-3 und 14-6 sind in der Tabelle 3.10 nicht mehr aufgeführt, da - bis auf PAT-Assays - keine weiteren Untersuchungsergebnisse vorlagen.

Tabelle 3.10: Zusammenfassung der aus der Kanamycin-Selektion hervorgegangenen Linien und ihrer morphologischen, cytologischen sowie molekularbiologischen Charakteristika.

| Linie | Übertragene Gene | Southern-Blot Analyse T ₀ | DNA-Index (Flow Cytometry) | Phänotyp | Nachkommen-schaft | Southern-Blot Analyse T ₁ /T ₂ | Expressions-Analysen T ₁ /T ₂ |
|--------|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------|-------------------|--|---|
| A13 | <i>nptII/uidA</i> | nd | 1.000 | normal | + | 2 Kopien (gekoppelt) | GUS-Aktivität (+) |
| 10-35* | <i>nptII/uidA</i> -Intron | negativ | 2.051 | aberrant | - | - | - |
| 8-5 | <i>nptII/sfa8</i> | Einzelkopie | 1.000 | normal | + | Einzelkopie | Western Blot (+) RT-PCR (+) |
| 8-66 | <i>nptII/sfa8</i> | nd | 2.014 ¹ | aberrant | + | 3 Kopien ² | Western Blot (+) ² |
| 26-1 | <i>nptII/sfa8</i> | Einzelkopie | nd | normal | + | nd | nd |
| 26-2 | <i>nptII/sfa8</i> | Einzelkopie | 2.142 | aberrant | - | - | - |
| 26-3 | <i>nptII/sfa8</i> | Einzelkopie | 1.000 | normal | - | - | - |
| 15-1* | <i>nptII/sfa8</i> | negativ | 1.833 | aberrant | - | - | - |
| 12-1 | <i>nptII/lysC</i> | 3 Kopien + Fragment | nd | normal | + | 3 Kopien (vermutlich gekoppelt) | Western Blot (-) AK-Assay (-) |
| 12-2 | <i>nptII/lysC</i> | nd | nd | normal | + | Einzelkopie | Western Blot (+) AK-Assay (+) |
| 12-3 | <i>nptII/lysC</i> | Einzelkopie | 1.667 | aberrant | - | - | - |
| 12-40 | <i>nptII/lysC</i> | Einzelkopie | 1.000 | normal | + | nd | Western Blot (+) AK-Assay (+) |

¹ keine signifikante Abweichung von 2.0, ² Untersuchung einer einzelnen Pflanze, nd = nicht bestimmt, *nicht transgen

3.4 Modifizierung der Aminosäurezusammensetzung in den Samen

Für beide Strategien zur Erhöhung des Methioningehalts, die in dieser Arbeit verfolgt wurden, ließen sich transgene Linien erzeugen. Die Übertragung des Sonnenblumen 2S-Albumins (SFA8) in *Vicia faba* führte zu den drei samenbildenden (SFA8)-Linien 8-5, 8-66 und 26-1. Nur bei Linie 8-5 war allerdings die Samenmenge ausreichend groß genug, um weitergehende Analysen durchführen zu können. Drei Sublinien der Linie 8-5 wurden mittels eines PCR-Screenings genetisch charakterisiert und die Aktivität des Transgens über RT-PCR überprüft und bestätigt. Anhand von Western Blots konnte eine schwache Akkumulation des Sonnenblumen-2S-Albumins in Samen der Sublinien 8-5/3, 8-5/6 und 8-5/2 und in 2 Samen der Linie 8-66 nachgewiesen werden.

Drei transgene Linien entstanden im Rahmen der zweiten Strategie, der Entkopplung der Methioninbiosynthese von ihrer *feedback*-Hemmung durch Expression eines mutierten, bakteriellen Aspartatkinasegens. Die drei AK-Linien sind phänotypisch unauffällig und erwiesen sich als fertil. Zwei der Linien (12-2 und 12-40) besitzen jeweils eine Kopie des Transgens mit nachweisbarer Expression des übertragenen Gens (Abb. 3.14). Linie 12-1 mit drei Kopien des Transgens (plus eines kleineren Fragments) zeigte hingegen keine Aktivität der bakteriellen Aspartatkinase.

Aufgrund der geringen Samenanzahl der transgenen Linien konnten nur wenige, stichprobenartige Messungen durchgeführt werden, die den Weiterbestand der Linie nicht gefährdeten. Die Ergebnisse sind daher vorläufig und zeigen höchstens Tendenzen auf. Zudem war meist nicht bekannt, ob die getesteten Samen homo- oder hemizygot für die übertragenen Gene waren. Der Zygotiezustand besitzt unter Umständen Einfluß auf die Höhe der Genexpression.

3.4.1 Freie Aminosäuren in Samen der Linien 12-2 und 12-40

Für die Bestimmung des relativen Gehalts an freien Aminosäuren in Samen verschiedener Linien von *Vicia faba* waren HPLC-Analysen mit Extrakten aus reifen Samen des Wildtyps und der *lysC*-exprimierenden Linien 12-2 und 12-40 von Johann Schaller und Urs Kämpfer (ARS-Universität Bern, Schweiz) durchgeführt worden. Der Gesamtgehalt an freien Aminosäuren war zuvor photometrisch mit Hilfe einer Glutamin-Standard Eichkurve bestimmt worden. Die hier untersuchten Proben 12-2 und 12-40 sind identisch mit denjenigen aus Abbildung 3.15, d. h. die Aktivität der *lysC*-Aspartatkinase war zuvor mittels AK-Assay getestet und nachgewiesen worden.

Zu erwarten sind zunächst Veränderungen in den Aspartataminosäuren Methionin und Threonin (s. Karchi *et al.* 1993). Methionin zeigte sich in den Proben 12-2a deutlich und in 12-2b leicht erhöht, nicht hingegen in den Proben der Linie 12-40 (Tab. 3.11). In beiden Proben von 12-2 ist außerdem Threonin sehr deutlich erhöht (7-11fache des Wildtyps), in etwas geringerem Maße trifft dies auch für 12-40b zu. Auch wenn die geringe Probenzahl keine endgültigen Aussagen zuläßt, ist es wahrscheinlich, dass diese

Veränderungen, zumindest in Linie 12-2, nicht zufällig sind, sondern auf die Aktivität der bakteriellen Aspartatkinase zurückgehen.

Alle Proben der *lysC*-exprimierenden Transformanden wiesen gegenüber dem Wildtyp erhöhte Werte für die Aminosäuren Serin und Glycin auf. Ob diese Abweichungen im Zusammenhang mit der Transformation stehen, ist nicht geklärt.

Andere Veränderungen im Aminosäureprofil waren nicht konsistent, bei zwei von vier Linien war der Gehalt an Aspartat auf 25-30% des Wildtyp-Werts gefallen; ebenso sanken die Werte für Isoleucin, dem Folgeprodukt von Threonin, in drei der transgenen Linien ab, die Lysinwerte waren uneinheitlich und entsprachen eher natürlichen oder messbedingten Schwankungen als der Expression des Fremdgens. Um messungsbedingte Schwankungen von transgen-vermittelten Veränderungen sicher abzugrenzen, wäre eine deutlich größere Anzahl von untersuchten Proben notwendig gewesen.

Tabelle 3.11: Bestimmung der Anteile freier Aminosäuren am Aminosäuren-Gesamtgehalt durch HPLC in je zwei Einzelsamen des Wildtyps und der transgenen Linien 12-2 und 12-40

| | WT 1 | WT 2 | 12-2a | 12-2b | 12-40a | 12-40b |
|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Asp | 100,48 | 101,77 | 199 | 18,96 | 107,91 | 32,90 |
| Glu | 131,74 | 113,91 | 185,89 | 126,96 | 158,19 | 76,13 |
| Asn | 377,67 | 401,55 | 143,63 | 476,83 | 85,82 | 179,44 |
| Ser | 0,0 | 0,0 | 13,05 | 26,38 | 9,99 | 12,08 |
| Gln | 3,54 | 6,08 | 0,0 | 8,31 | 4,12 | 0,0 |
| Gly | 12,24 | 15,88 | 52,86 | 44,33 | 31,98 | 62,17 |
| His | 5,54 | 4,06 | 10,46 | 5,06 | 9,06 | 8,01 |
| Arg | 269,04 | 267,30 | 188,73 | 188,75 | 469,71 | 549,90 |
| Thr | 5,18 | 5,83 | 67,15 | 44,35 | 6,99 | 18,15 |
| Ala | 14,53 | 12,85 | 29,97 | 12,32 | 45,38 | 18,64 |
| Pro | 9,97 | 10,36 | 18,51 | 5,99 | 12,93 | 6,98 |
| Tyr | 5,01 | 6,17 | 8,62 | 4,52 | 5,33 | 4,06 |
| Val | 17,06 | 9,80 | 16,07 | 6,95 | 8,02 | 4,49 |
| Met | 0,0 | 1,38 | 3,63 | 1,97 | 1,04 | 1,46 |
| Ile | 8,81 | 4,81 | 6,80 | 3,52 | 3,43 | 2,30 |
| Leu | 7,68 | 6,37 | 9,39 | 5,25 | 4,41 | 3,08 |
| Phe | 21,68 | 18,20 | 25,60 | 9,05 | 13,17 | 7,93 |
| Trp | 7,35 | 11,30 | 16,78 | 8,54 | 15,10 | 7,94 |
| Lys | 2,49 | 2,40 | 3,85 | 1,95 | 7,42 | 4,33 |

Angaben in Anteilen am Aminosäuren-Gesamtgehalt in ‰, Gesamtgehalt = 1000

3.4.2 Proteingebundene Aminosäuren in den Samen der Linien 8-5, 12-1 und 12-2

Die Analysen der proteingebundenen Aminosäuren wurden von Dr. Fontaine/Degussa-Hüls AG durchgeführt. Das hierfür verwendete Samenmehl stammte von Wildtyppflanzen bzw. den transgenen Linien 8-5/6, 12-1 und 12-2, die unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus aufgezogen worden waren. Die Proben vereinigten Material von jeweils mehreren Samen zu einer Menge von mindestens 0,5 g. Zur Quantifizierung der Aminosäuren wurden die Proben oxidiert, gefolgt von saurer Hydrolyse (pers. Mitteilung Dr. Heimbeck/Dr. Fontaine). Die Auftrennung erfolgte in einem Aminosäuren-Analyser mit anschließender Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin. Asparagin und Aspartat bzw. Glutamin und Glutamat wurden aufgrund der Analysenmethode jeweils als ein gemeinsamer Wert (als AspX bzw. Glux) angegeben.

Tabelle 3.12: Profil der proteingebundenen Aminosäuren in reifen Samen von Kontrollpflanzen und transgenen Linien von *Vicia faba*; die Werte geben den Anteil der AS in % am Rohproteingehalt an

| | WT | 8-5/6a | 8-5/6b | 8-5/6c | 8-5/6d | 12-1 | 12-2 |
|-------------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Met | 0,68 | 0,61 | 0,62 | 0,56 | 0,60 | 0,68 | 0,65 |
| Cys | 1,58 | 1,40 | 1,46 | 1,34 | 1,33 | 1,69 | 1,51 |
| M+C | 2,26 | 2,01 | 2,08 | 1,9 | 1,93 | 2,37 | 2,16 |
| Lys | 5,81 | 5,84 | 5,70 | 5,69 | 5,61 | 6,27 | 5,83 |
| Thre | 3,42 | 3,45 | 3,35 | 3,33 | 3,30 | 3,54 | 3,65 |
| Arg | 9,71 | 11,09 | 10,94 | 10,45 | 11,23 | 8,40 | 9,42 |
| Ile | 3,97 | 3,93 | 4,09 | 3,81 | 3,80 | 4,15 | 4,01 |
| Leu | 6,93 | 7,1 | 7,11 | 6,92 | 6,76 | 7,18 | 7,09 |
| Val | 4,43 | 4,38 | 4,51 | 4,19 | 4,24 | 4,61 | 4,42 |
| His | 2,49 | 2,48 | 2,47 | 2,38 | 2,37 | 2,62 | 2,50 |
| Phe | 3,97 | 3,97 | 3,99 | 3,91 | 3,76 | 4,13 | 4,04 |
| Gly | 3,95 | 3,93 | 3,92 | 3,74 | 3,71 | 4,14 | 4,07 |
| Ser | 4,44 | 4,59 | 4,42 | 4,54 | 4,25 | 4,63 | 4,82 |
| Pro | 4,96 | 4,86 | 4,97 | 4,62 | 4,62 | 4,82 | 4,91 |
| Ala | 3,85 | 3,91 | 3,81 | 3,69 | 3,67 | 4,03 | 3,90 |
| Aspx | 10,71 | 11,13 | 10,56 | 11,54 | 11,51 | 10,94 | 10,73 |
| Glux | 15,49 | 15,98 | 15,84 | 15,28 | 14,95 | 16,24 | 16,28 |
| RP | 30,82 | 33,61 | 33,71 | 35,61 | 37,43 | 25,79 | 29,94 |

RP= Rohprotein in % der Originalsubstanz

Die Proben der Linien mit integriertem Sonnenblumen-Albumingen wiesen einen um 10-20% höheren Rohproteingehalt gegenüber dem Wildtyp oder den AK-Linien auf (Tab. 3.12). Dies zeigte sich vor allem in einem Anstieg des Gehalts an Arginin. Ob ein Zusammenhang mit der Expression des Sonnenblumen-Albumingens besteht, ist unbekannt, da keine weiteren Untersuchungen, z.B. über die anteilige Zusammensetzung des Aminosäuregehalts in negativ-ausspaltenden Nachkommen, durchgeführt werden konnten. Hinsichtlich den schwefelhaltigen proteingebundenen Aminosäuren waren keine messbaren Veränderungen festzustellen.