

5 Zusammenfassung/Summary

In dieser Arbeit wurde ein Transformationssystem für den *Agrobacterium tumefaciens* – vermittelten Gentransfer in die Körnerleguminose *Vicia faba* etabliert. Epicotylsegmente von steril angezogenen Keimlingen wurden mit den Agrobakterienstämmen EHA101 bzw. EHA105 inokuliert, die die codierenden Sequenzen für (a) *uidA*, (b) ein mutiertes *lysC*-Gen einer *feedback*-insensitiven bakteriellen Aspartatkinase aus *E. coli*, (c) für ein methioninreiches 2S Albumin aus *Helianthus annuus* (*sfa8*) transferierten. Die Gene *lysC* und *sfa8* standen unter Kontrolle samenspezifischer Promotoren.

Auf Kallus-induzierendem Kulturmedium wurden 10-30% Kanamycin- bzw. Phosphinotricin-resistente Kallusse selektiert, deren transgener Status mittels GUS-Assay bzw. PAT-Assay bestätigt werden konnte. Zwischen 1% und 6% der selektierten Kallusse waren in der Lage, in der zweiten Kulturphase auf thidiazuronhaltigem Medium Sprosse zu bilden. Diese wurden in einer dritten Kulturphase auf BAP-haltiges Medium transferiert, vermehrt und nach Bewurzelung bzw. *in vitro*-Pfropfung zu vollständigen Pflanzen regeneriert. Mit verschiedenen Parametern der Kulturbedingungen wie Hormontyp und -konzentration, Kohlenstoffart und -gehalt, Temperatur u.a. wurden Optimierungs-versuche, mit begrenztem Erfolg durchgeführt. Verbesserungen konnten durch Massnahmen wie die Temperaturabsenkung auf 15°C in Phase III oder die Verwendung von Caseinhydrolysat als Zusatz im Kulturmedium erreicht werden.

Alle transgenen Pflanzen wurden mittels Southern Blot Analyse charakterisiert und die Integration des Transgens in das Pflanzengenom bestätigt. Die cytologischen Untersuchungen ergaben überwiegend diploide Pflanzen, aber auch tetraploide Formen und Aneuploidien traten auf, die größtenteils mit einem aberranten Habitus verbunden waren.

Von 12 ausführlich untersuchten Linien wiesen sieben Samenbildung auf. Die Nachkommenschaft der sieben Linien wurde mit PCR-Analysen auf die genetische Stabilität der eingeführten Merkmale über mind. zwei Generationen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die heterologen integrierten Gene als dominantes Merkmal einer Aufspaltung in etwa 3:1 nach den Mendel´schen Gesetzen weitervererbt wurden.

Die Expression der übertragenen Genkonstrukte wurde mit enzymatischen Assays (GUS, PAT, AK), durch Transkriptionsanalyse und mit Hilfe der Immunodetektion nachgewiesen.

Aminosäureanalysen der transgenen, mit *lysC*-transformierten Linien 12-2 und 12-40 ergaben Veränderungen im Profil der freien Aminosäuren, u.a. eine relative Erhöhung von Threonin (8-10x) und Methionin (2-3x) in den Samen gegenüber dem WT. In den Linien 8-5 oder 8-66, die mit dem Gen für das methioninreiche SFA8-Albumin transformiert worden waren, liessen sich keine Veränderungen im Gehalt der schwefelhaltigen proteingebundenen Aminosäuren nachweisen.

Trotz der relativ geringen Transformationsfrequenz und der langen Kulturdauer bietet das vorgestellte Transformationssystem einen geeigneten Ansatz zur stabilen Übertragung

erwünschter Merkmale in die Körnerleguminose *Vicia faba*. Damit wird es erstmalig möglich, auch bei *Vicia faba* gentechnische Methoden in der Pflanzenzüchtung nutzen zu können.

Summary

Among the major grain legume crops, *Vicia faba* belongs to those where the production of transgenic plants has not yet been convincingly reported.

We have produced stably transformed lines of faba bean with an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer system. Stem segments from aseptically germinated seedlings were inoculated with *A.tumefaciens* strains EHA101 or EHA105, carrying binary vectors conferring (1) *uidA*, (2) a mutant *lysC* gene, coding for a bacterial aspartate kinase insensitive to feedback control by threonine or lysine from *E coli*, (3) the coding sequence for a methionine-rich sunflower 2S-albumin.

Kanamycin or Phosphinotricin-resistant calluses were obtained on callus initiation medium at a frequency of 10–30%. Shoot regeneration was achieved on thidiazuron containing medium in a second culture step. A subsequent transfer of shoots to BA-containing medium was necessary for stem elongation and leaf development. Shoots were rooted or grafted onto young seedlings *in vitro* and mature plants were recovered and transferred to the greenhouse. Investigation on factors influencing the regeneration efficiency, e.g. hormone type and concentration or sugar type and concentration, were conducted with lesser results. A decrease in temperature from 20°C to 15°C was found to be beneficial for shoot development in phase III.

Molecular analysis confirmed the integration of the transgenes into the plant genome by Southern blotting. Cytological studies showed chromosomal aberration in 25% of all transgenic lines, mostly correlated with a differing phenotype. From 12 well characterized lines seven were found to be fertile. The introduced DNA is physically transmitted as a dominant Mendelian trait and the inheritance of the transgene up to the -at least- third generation was confirmed by PCR in seed-bearing lines.

Expression of the foreign genes was demonstrated by RT-PCR, Western analysis and enzyme activity assays (GUS, PAT, AK).

HPLC analyses of seed amino acids in *lysC*-containing lines showed changes in the free amino acid composition, above all in threonine content (up to 10fold increase compared to wildtype), and to a lesser extent in methionine content (2-3fold). No change in proteinbound amino acid composition was found in two SFA-lines 8-5 and 8-66 expressing the methionin-rich 2S-albumin from sunflower.

Although at present the system is time-consuming and of relatively low efficiency, it represents a feasible approach for the production of genetically engineered faba beans. Future prospects are discussed.