

ARBEITSBERICHT

Untersuchungen zur Expression und Stabilität von Transgenen
in angiospermen Gehölzen am Beispiel der Zitterpappel (Aspe)

Arbeitsbericht des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung

Nr. 2004/5



**Bundesforschungsanstalt
für Forst- und Holzwirtschaft**

Umweltforschungsplan des Bundesumweltministeriums für Umwelt,
Naturschutz und Reaktorsicherheit
Aufgabenschwerpunkt
Forschungsprojekt 201 67 430/02

Abschlussbericht

zum

Forschungsvorhaben:

**Untersuchungen zur Expression und Stabilität von Transgenen in
angiospermen Gehölzen am Beispiel der Zitterpappel (Aspe)**

Az.576.241.112

für den Zeitraum

01.07. 2001 bis 31.12.2003

verfasst von:

Matthias Fladung

Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft

Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung
Sieker Landstr. 2
D-22927 Großhansdorf

April 2004

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 3 |
| 2. Material und Methoden | 3 |
| 2.1. Pflanzenmaterial und Transformation | 3 |
| 2.2. Quantitative GUS-Messung | 4 |
| 2.3. Molekulare Untersuchungen zum Transgen-Insertionsort | 5 |
| 2.4. Durchführung der Klimakammerversuche | 5 |
| 2.5. Merkmalerhebung bei Beendigung der Klimakammerversuche | 6 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion | 7 |
| 3.1. Rückführung transgener Linien in die Gewebekultur | 7 |
| 3.2. Transformation mit dem <i>rbcS-uidA</i> Konstrukt | 8 |
| 3.3. Optimierung der quantitativen GUS-Messung | 9 |
| 3.4. Klimakammerversuche | 11 |
| 3.5. Molekulare Untersuchungen zum Transgen-Insertionsort | 37 |
| 3.6. Details zur Struktur des Transgen-Insertionsorts | 38 |
| 4. Literaturangaben | 39 |
| 5. Zusammenfassung und Ausblick | 39 |
| 6. Erfolgskontrollbericht | 44 |
| 7. Kurzfassung des Schlussberichts | 45 |

1. Einleitung

Im Rahmen dieses Verbundprojekts sollte die Expression von fremden Genen unter vergleichenden Stressbedingungen (Temperatur, UV-Licht) in kontrollierten Klimakammerversuchen bei vier verschiedenen Gehölzarten (Zitterpappel, Rose, Rhododendron und Lärche) getestet werden. Zur Vereinheitlichung des Pflanzenmaterials wurden transgene Pflanzen ausgewählt, die das Markergen *uidA* (GUS-Expression) unter Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren enthalten: der konstitutiv exprimierende 35S-Promotor und der lichtinduzierte *rbcS*-Promotor. Die Expression des *uidA*-Gens sollte in quantitativen Messungen bestimmt werden. Hierfür sollte auf bereits für krautige Pflanzen etablierte Messsysteme zurückgegriffen werden. Darüber hinaus sollten GUS-Vergleichsmessungen an transgenen Pappeln durchgeführt werden, die zwar andere Gene tragen, aber ebenfalls durch die Promotoren 35S und *rbcS* gesteuert werden (*35S-iaaL* und *rbcS-rolC*).

In diesem Projekt soll die Expression und Stabilität der *35S-uidA* und *rbcS-uidA* sowie der beiden oben genannten Konstrukte in gentechnisch veränderten Zitterpappeln (Aspen) unter Stressbedingungen getestet werden. Während *35S-uidA* transgene Zitterpappeln bereits im Gewächshaus kultiviert wurden und für die geplanten Versuche in die Gewebekultur zurückgeführt werden mussten, waren die *rbcS-uidA* transgenen Zitterpappeln noch herzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial und Transformation

Ursprünglich standen folgende Pappellinien für die Untersuchungen zur Verfügung:

Tabelle 1: Übersicht über die transgenen Pappellinien, die ursprünglich für die Klimakammerversuche verwendet werden sollten

| Transgener Zitterpappelklon | Anz. unabhängiger transgener Linien |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Esch5:35S- <i>uidA</i> | 11 |
| Esch5:35S- <i>iaaL</i> | 3 |
| Esch5: <i>rbcS-rolC</i> | 8 |
| Esch5: <i>rbcS-uidA</i> | Zu erstellen |

Nach Beginn des Projekts hat sich die Anzahl der zur Verfügung stehenden Linien aus folgenden Gründen reduziert:

- (a) Während der Kultur im Gewächshaus (Winter 2000/2001) sind einige vorgesehene Linien eingegangen
- (b) Einige Linien haben sich als nicht transgen herausgestellt
- (c) Die Rückführung der transgenen Linien aus dem Gewächshaus in die *In-vitro*-Kultur war schwieriger als geplant.

Schließlich konnten aus den o.a. Gründen die später in der Tabelle 2 aufgeführten transgenen Pappellinien für die geplanten Klimakammerversuche verwendet werden.

Nach Transformation mit dem *rbcS-uidA* Genkonstrukt wurden insgesamt sieben putative transgene Linien erhalten, von denen vier Linien nach Southern-Blot Experimenten als positiv transformiert getestet wurden. Von diesen konnten drei Linien im Laufe des Projekts in der *In-vitro* Kultur so weit vermehrt werden, dass für Klimakammerversuche eine ausreichende Anzahl von Pflanzen zur Verfügung standen.

Schließlich haben die Arbeiten zur Etablierung der quantitativen GUS-Messung einen unerwartet größeren Umfang angenommen als ursprünglich geplant. Da darüber hinaus für die *rbcS-roIC*- und die *35S-iaaL*-Linien in den Klimakammerversuchen nur Wachstumsanalysen getätigt werden können und keine GUS-Messungen durchführbar sind, können an diesen Linien auch keine Aussagen zur Instabilität gemacht werden. Der ursprüngliche Grund für die Berücksichtigung dieser Klone war, neben nicht-transgenen Kontrollen auch transgene Kontrollen zur Verfügung zu haben. Diese Bedingung war durch die Testung von je einer *rbcS-roIC* und *35S-iaaL*-Linie erfüllt.

2.2. Quantitative GUS-Messung

Für die Durchführung der quantitativen GUS-Messung war vorgesehen, das Standardprotokoll von Jefferson et al. (1987) zu verwenden. Die Messwerte sollten auf den Proteingehalt bezogen werden, der mit dem Analyse-Kit von Biorad, das auf dem Protokoll von Bradford (1976) beruht, bestimmt werden sollte. Die Arbeiten hierzu haben weit mehr Zeit gekostet als ursprünglich veranschlagt, was auf Schwierigkeiten

bei der Proteinisolierung aus Pappeln sowie auf der Optimierung der quantitativen GUS-Messung zurückzuführen war. Das Standardprotokoll von Bradford (1976), auf dem das von uns verwendete beruht, wurde nach Debener in verschiedenen Arbeitsschritten modifiziert, z. B. durch Einsatz anderer Extraktionspuffer. Die meisten der geprüften Variationen brachten jedoch keine oder nur eine geringfügige Verbesserung der Güte der Messungen. Diese wurde anhand ihrer Zuverlässigkeit bestimmt, d.h. es wurde geprüft, ob wiederholte Messungen des Proteingehaltes von dem gleichen Pflanzenmaterial zu annähernd denselben Werten führten. Die Überlegung, die im Fluorometer gemessenen MU-Werte auf den DNA-Gehalt anstatt auf den Proteingehalt zu beziehen, wurden nach Debener wieder verworfen, da eine zuverlässige Messung der DNA-Gehalte im für die MU-Messungen benötigten Extraktionspuffer nicht möglich war. Umgekehrt konnte die GUS-Expression nicht in dem Puffer gemessen werden, der für die DNA-Konzentrationsbestimmung geeignet wäre.

2.3. Molekulare Untersuchungen zum Transgen-Insertionsort

Die Untersuchungen zum Transgen-Insertionsort sollten wie in Kumar und Fladung (2000a) durchgeführt werden. Dazu wurde genomische DNA mit *HindIII* geschnitten und die erhaltenen Fragmente in einem darauf folgenden Schritt selbst ligiert. Mit Hilfe geeigneter Primer wurde eine sogenannte Inverse-PCR oder TAIL-PCR durchgeführt. Bei Bedarf wurden die erhaltenen Fragmente mit Hilfe des Big-Dye[®]-Terminator-Systems sequenziert (ABI-Prism 310 Sequenzer).

Aussagen über die Methylierung des Promotors konnten nach Restriktion der DNA mit methylierungssensitiven Enzymen und anschließender PCR-Reaktion gemacht werden (Kumar und Fladung 2000). Diese Enzyme schneiden nicht, wenn die vorgesehene Restriktionsschnittstelle methyliert ist, was bei entsprechender Wahl der verwendeten Primer eine Amplifikation über die Restriktionsschnittstelle hinweg ermöglicht. So deutet nach der PCR-Reaktion eine erfolgte Amplifikation auf eine Methylierung hin.

2.4. Durchführung der Klimakammerversuche

Für die geplanten Versuche standen zwei bis vier Klimakammern zur Verfügung. In diesen Kammern können die Parameter Licht, Temperatur und Feuchte reguliert

werden. Je nach Umfang der Versuche wurden 6 bis 24 Pflanzen pro Linie getestet, die zuvor aus der Gewebekultur in Erde überführt wurden. Als Stressoren wurden die Parameter Temperatur und UV-Licht bei 254 nm gewählt.

Temperatur:

Die Temperatur dient als Kontroll- und Vergleichstemperatur. Die Versuchsdauer der Experimente beträgt jeweils bis zu 6 Wochen. Folgende Stressbedingungen wurden gewählt.

- 24 Stunden 24 °C (Kontrolle) / 24 Stunden 30 °C /
- 24 Stunden 24 °C (Kontrolle) / 24 Stunden 35 °C

UV-Licht:

Die Behandlung mit UV-Licht wurde wie folgt durchgeführt:

„Hartes“-UV (254 nm), Kurzzeit-Applikation 5 Minuten. Mit dieser Behandlung sollten Schäden auf Blatt-Ebene gesetzt werden.

- 24 Stunden 24 °C, ohne UV (Kontrolle) / 24 Stunden 24 °C, mit UV
- 24 Stunden 30 °C, ohne UV (Kontrolle) / 24 Stunden 30 °C, mit UV
- 24 Stunden 35 °C, ohne UV (Kontrolle) / 24 Stunden 35 °C, mit UV

Aus Kapazitätsgründen konnte für die Mehrzahl der UV-Stressexperimente nur die Versuchsbedingung

- 24 Stunden 24 °C, ohne UV (Kontrolle) / 24 Stunden 24 °C, mit UV
- berücksichtigt werden.

2.5. Merkmalerhebung bei Beendigung der Klimakammerversuche

Nach Beendigung der Klimakammerversuche wurden die folgenden Parameter erhoben:

Quantitative GUS-Expression:

Die GUS-Expression wurde quantitativ in spektrofotometrischen Tests bestimmt.

Phänotypische Merkmale:

Die Pflanzenhöhe sowie die Anzahl der vorhandenen Blätter wurden zu Beginn und bei Beendigung der Versuche von allen Pflanzen erhoben.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Rückführung transgener Linien aus dem Gewächshaus in Sterilkultur und Vermehrung der Pflanzen

Insgesamt war es möglich, bei sieben unabhängigen 35S-*uidA* transgenen Pappellinien (Esch5:35S-*uidA* = E51) sowie bei zwei 35S-*iaaL* transgenen Linien (Esch5:35S-*iaaL* = E10) aus im Gewächshaus kultivierten Pflanzen Sterilkulturen zu etablieren (Abb. 1). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Rückführung der Esch5:35S-*uidA* transgenen Linien aus dem Gewächshaus in die *in vitro*- (Sterilkultur) ist in Tabelle 2 zu finden. Von den genannten sieben Esch5:35S-*uidA* Linien sind von allen Linien eine ausreichend große Zahl gleich alter Pflanzen in der *in vitro*-Kultur erhalten worden. Diese konnten in Erde überführt werden, so dass von allen sieben Linien Klimakammerversuche durchgeführt werden konnten. Ebenfalls ist es bei Esch5:35S-*iaaL* Linie #6 sowie *rbcS-roIC* Linie 18 gelungen, eine ausreichende Anzahl von Pflanzen wieder in Erde zu überführen, so dass auch mit diesen Linien Klimakammerversuche durchgeführt werden konnten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Versuche zur Rückführung der Esch5:35S-*uidA*, Esch5:35S-*iaaL* und Esch5:*rbcS-roIC* transgenen Linien aus dem Gewächshaus in Sterilkultur

| <u>Transgener Aspenklon</u> | <u>Nummer der Linie</u> | <u>Stand Rückführung</u> |
|--------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <u>Esch5:35S-<i>uidA</i></u> | 2 | ++, Versuche durchgeführt |
| | 3 | ++, Versuche durchgeführt |
| | 5 | ++, Versuche durchgeführt |
| | 6 | ++, Versuche durchgeführt |
| | 7 | ++, Versuche durchgeführt |
| | 8 | -, Versuche bisher erfolglos |
| | 9 | ++, Versuche durchgeführt |
| | 10 | ++, Versuche durchgeführt |
| | 11 | -, Versuche bisher erfolglos |
| <u>Esch5:35S-<i>iaaL</i></u> | 6 | ++, Versuche durchgeführt |
| <u>Esch5:<i>rbcS-roIC</i></u> | 18 | ++, Versuche durchgeführt |

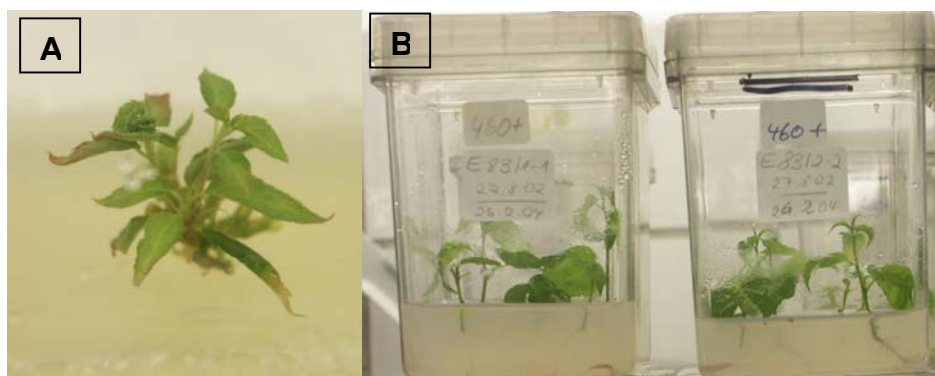
Abbildung 1: Pflanzen der Linie Esch5:35S-*uidA*#6 (E51-6) in der *in vitro* Vermehrung zur Erzeugung einer ausreichenden Anzahl von Pflanzen für einen Klimakammerversuch



3.2. Transformation mit dem *rbcS-uidA* Konstrukt

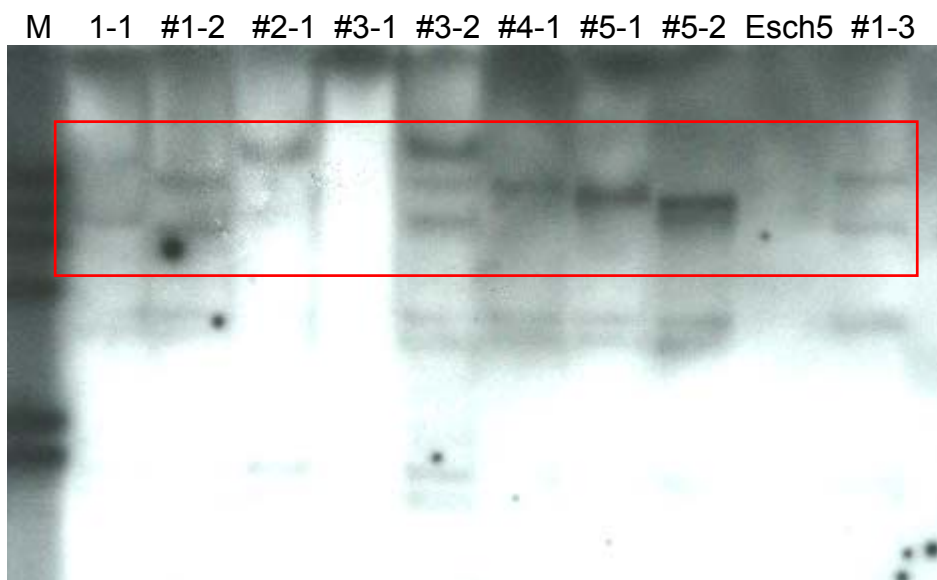
Das *rbcS-uidA* Konstrukt in *Agrobacterium* wurde erst im September 2002 zur Verfügung gestellt, so dass erst danach mit der Erzeugung transgener Linien begonnen werden konnte. Insgesamt wurden drei Transformationsversuche durchgeführt. Aus diesen Arbeiten sind insgesamt sieben putativ transgene Linien (Abb. 2) hervorgegangen. Die molekulare Analyse der Linien wurde anhand PCR Experimente und Southern-Blot Tests durchgeführt. Bei vier Linien konnte eindeutig die Integration des *rbcS-uidA* Konstrukts nachgewiesen werden. In der Projektlaufzeit konnten drei Linien soweit *in vitro* vermehrt werden, dass Klimakammerversuche durchgeführt wurden.

Abbildung 2: *RbcS-uidA* transgene Pflanzen in der *in vitro* Kultur (a) kurz nach der Regeneration (b) in der Vermehrungsphase



Von den insgesamt erhaltenen sieben transgenen Linien wurden fünf in Southern-Blot Analysen untersucht (Abb. 3). Dabei stellte sich heraus, dass alle fünf untersuchten Linien das *rbcS-uidA* Genkonstrukt tragen. Die Anzahl der Kopien ist eine (E83/4, E83/5), zwei (E83/1, E83/2) und drei (E83/3). Die DNA in Spur #3-1 war nicht vollständig mit den verwendeten Restriktionsenzym verdaut. Allerdings konnte bei der Linie E83/3 in Klimakammerversuchen eine nur sehr geringe GUS-Expression gemessen werden, wie sie bei den nicht-transgenen Kontrollen gefunden wurden.

Abbildung 3: Southern-Blot Analyse von fünf putativ *rbcS-uidA* transgenen Pappellinien. Die Kopienanzahl kann aus dem oberen Teil des Blots abgelesen werden (s.a. Kasten)



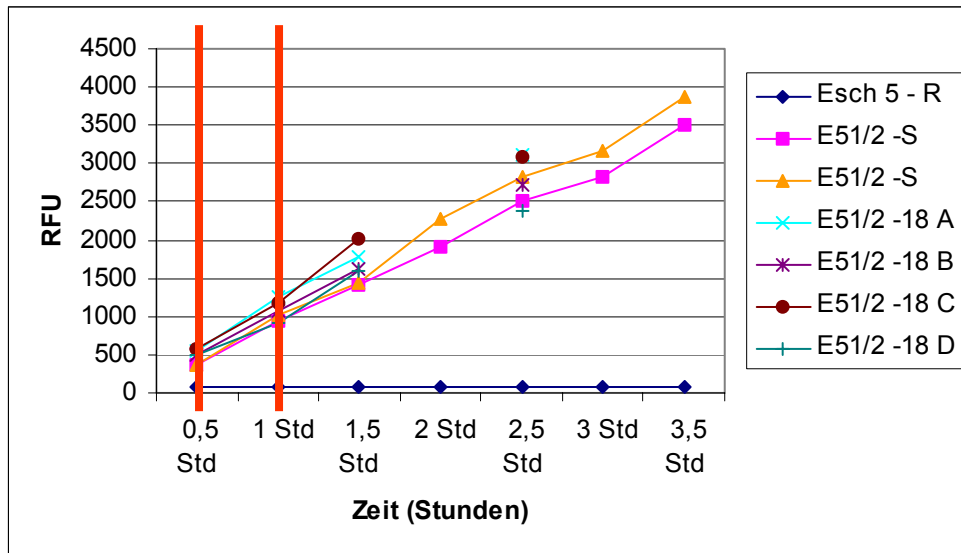
3.3. Optimierung der quantitativen GUS-Messung

Die quantitative GUS-Messung bei der Zitterpappel hat sich im Vergleich zu Tabak und *Arabidopsis* als unerwartet schwierig und teilweise nicht reproduzierbar herausgestellt. Damit die GUS-Messungen auch Werte liefern, die wissenschaftlich verwertet werden können, war es notwendig, die quantitative GUS-Messung zu optimieren. Hierbei haben unsere Arbeiten sehr stark von den Erfahrungen und Ergebnissen der Arbeitsgruppen Debener und Merkt (Inst. für Zierpflanzenzüchtung, Ahrensburg) profitiert.

Eine zunächst vorgenommene Überprüfung der Inkubationszeit von 10 µl Pappelblattextrakt mit dem MUG-Substrat hat gezeigt, dass eine lineare Abhängigkeit

besteht (Abbildung 4). Daher ist es ausreichend, zwischen 30 Minuten und einer Stunde zu inkubieren (senkrechte rote Linien in Abbildung 3).

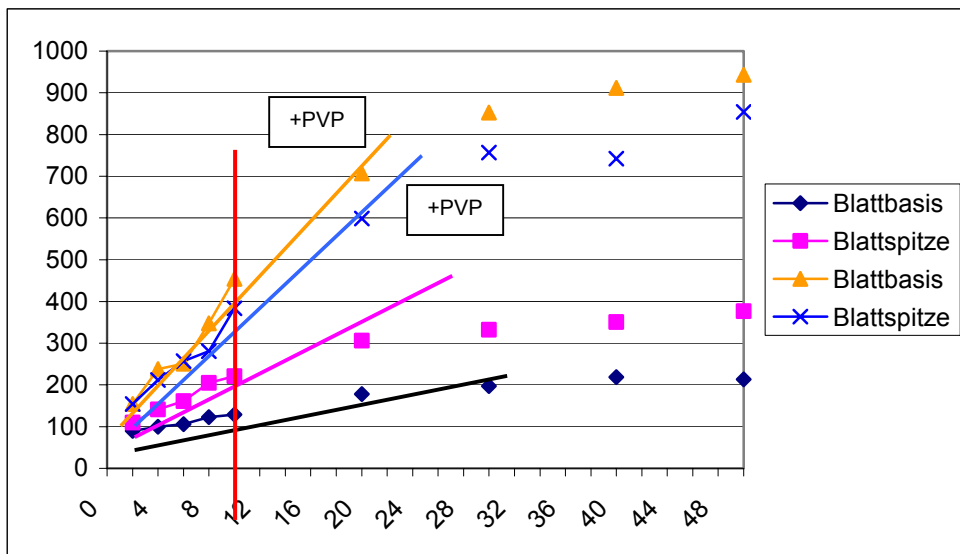
Abbildung 4: Abhängigkeit der Einwirkzeit des MUG-Substrats auf die Enzymkinetik



In der Arbeitsgruppe von Dr. Debener wurde für die Rosen gefunden, dass mit steigender Blattextraktmenge ein Abfall der GUS-Aktivität zu verzeichnen war. Das bedeutet, dass im Rosenblattextrakt Substanzen enthalten sind, die sich inhibierend auf die GUS-Aktivität auswirken. Damit wäre eine Reproduzierbarkeit der GUS-Messungen nicht gegeben. Für Rosen wurde nach Zugabe von 4% PVP zum Extraktionspuffer bei der Aufarbeitung der Proben eine zunehmend lineare Beziehung zwischen der Menge des eingesetzten Substrats und der GUS-Aktivität gefunden.

Für die Zitterpappel wurde ohne Zugabe von 4% PVP zum Blattextrakt eine niedrigere GUS-Aktivität als mit Zugabe von PVP gefunden (Abbildung 5). Jedoch im Gegensatz zu Rosen ist eine lineare Abhängigkeit zwischen Blattextraktmenge und GUS-Aktivität festgestellt worden. Nach Zugabe von PVP fällt die GUS-Aktivität bei höheren Blattextraktmengen wieder ab. Der Vergleich der Position des geernteten Explantats im Blatt zeigt, dass ohne Zugabe von PVP große Unterschiede in der gemessenen GUS-Aktivität zwischen Blattspitze und Blattbasis gefunden werden. Nach Zugabe von PVP aber sind die Unterschiede in der GUS-Aktivität zwischen den verschiedenen Blattpositionen nur gering. Die rote Linie in Abbildung 4 zeigt die Menge Blattextrakt an (10 µl), die zukünftig für die GUS-Messungen eingesetzt werden.

Abbildung 5: Abhängigkeit der GUS-Aktivität von der Menge des eingesetzten Substrats. Senkrechte rote Linie bei 10 µl Blattextrakt.



Die quantitativen GUS-Messungen wurden somit wie folgt durchgeführt: (a) Zugabe von 4% PVP zum Extraktionspuffer (ab Klimakammerversuch II), (b) Menge des Blattextrakts 10µl, (c) Inkubationszeit 30 Minuten.

3.4. Klimakammerversuche

Eine Übersicht über die bisher durchgeführten Klimakammerversuche gibt Tabelle 3. Mit jeweils bis zu 24 Pflanzen der transgenen Linien sowie der nicht-transgenen Kontrolle wurden die Temperaturstress- und UV-Lichtstressversuche durchgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über die im Laufe des Projekts durchgeführten Klimakammerversuche

| Versuchsnr. | Verwendete Linien | Stress | Bedingungen (Anzahl Pflanzen/je Linie) | Versuchsaufbau | Anz. Proben |
|-------------|-----------------------|----------------|---|--|-------------------------|
| I | E51/2 + Esch5 | Temperatur | 24°C (6/6), 30°C (8/8), 35°C (8/8) | 3 Blatttagen, pro Blatt 2 Proben 3 Ernten | Messtechnische Probleme |
| II | E51/2 + Esch5 | Temperatur | 24°C (6/6), 30°C (8/8), 35°C (8/8) | 3 Blatttagen, pro Blatt 2 Proben 3 Ernten | 792 |
| III | E51/2 + Esch5 | Temp. + UV | 24°C (6/6), 30°C (8/8), 35°C (8/8), . + jeweils 5 Minuten UV | Pfl. aus Versuch I, 2 Blatttagen, pro Blatt 2 Proben 3 Ernten | 352 |
| IV | E51/2 + Esch5 | Temperatur | 24°C (12/21), 30°C (12/21), 35°C (12/21) | jeweils jüngstes Blatt mit 4 Proben, Verletzungseffekt 2 Ernten | 792 |
| V | E51/6 + Esch5 | Temperatur | 24°C (12/24), 30°C (12/24), 35°C (12/24) | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben, Verletzungseffekt 3 Ernten | 648 |
| VI | E51/6 + Esch5 | Temp. + UV(2x) | 24°C (12/24), 30°C (12/24), 35°C (12/24) . + jeweils 5 Minuten UV (je 16 Pflanzen) | Pfl. aus Versuch V, jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 2 Ernten | 216 |
| VII | E51/3 + E10/6 + Esch5 | Temperatur | 24°C (20/6/6), 30°C (20/6/6), 35°C (20/6/6), | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 576 |
| VIII | E51/3 + E10/6 + Esch5 | nur UV | 24°C (25/4/12), 5 Minuten UV (254 nm) | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 164 |
| IX | E83/1 + Esch5 | Temperatur | 24°C (18/10), 30°C (18/10), 35°C (18/10), | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 504 |
| X | E83/1 + Esch5 | nur UV | 24°C (18/10), 5 Minuten UV (254 nm) | Pfl. aus Versuch IX, jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 2 Ernten | 112 |
| XI | E51/9 + Esch5 | Temperatur | 24°C (20/12), 30°C (20/12), 35°C (20/12), | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 576 |
| XII | E51/9 + Esch5 | nur UV | 24°C (40/20), 5 Minuten UV (254 nm) | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 240 |

| | | | | | |
|-------|------------------------|------------|---|--|-------------|
| XIII | E51/5 + Esch5 | Temperatur | 24°C (20/12), 30°C (20/12), 35°C (20/12), | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 576 |
| XIV | E51/5 + Esch5 | nur UV | 24°C (20/12), 5 Minuten UV (254 nm) | Pfl. Aus Versuch XIII, jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 128 |
| XV | E51/10 + E83/4 + Esch5 | Temperatur | 24°C (12/12/6), 30°C (12/12/6), 35°C (12/12/6), | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 540 |
| XVI | E51/10 + E83/4 + Esch5 | nur UV | 24°C (12/12/6), 5 Minuten UV (254 nm) | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 120 |
| XVII | E83/3 + Esch5 | Temperatur | 24°C (20/6), 30°C (20/6), 35°C (20/6), | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 468 |
| XVIII | E83/3 + Esch5 | nur UV | 24°C (20/6), 5 Minuten UV (254 nm) | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 156 |
| XIX | E51/7 + E14/18 | Temperatur | 24°C (10/8), 30°C (10/8), 35°C (10/8), | jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 3 Ernten | 324 |
| XX | E51/7 + E14/18 | nur UV | 24°C (10/7), 5 Minuten UV (254 nm) | Pfl. Aus Versuch XIX, jeweils jüngstes Blatt mit 2 Proben 2 Ernten | 68 |
| | | | | | 7352 |

Die Tabelle 4 gibt beispielsweise einen Auszug aus dem Protokoll zum 1. Klimakammerversuch wieder, in dem die Bedingungen des Versuchs festgehalten werden. Ebenso wurden alle besonderen Vorkommnisse, die während der Dauer eines Versuchs festgestellt wurden, protokolliert.

Tabelle 4: Versuchsbedingungen zu Beginn des 1. Klimakammerversuchs

| <u>Versuch 1 GUS – Test</u> | | | |
|--|--------------------------|------------------|------------------|
| <u>Temperaturversuch über einen Zeitraum von 4 Wochen</u> | | | |
| Weisskammer 6 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 6 Pflanzen | E51/2 6 Pflanzen |
| Weisskammer 1 | 24 Std. 30°C | Esch5 8 Pflanzen | E51/2 8 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 35°C | Esch5 8 Pflanzen | E51/2 8 Pflanzen |
| Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70% | | | |
| Vorkultur: Aus Gewebekultur in Erde (TKS 1+ Sand ungedüngt) . Einmal mit Alkrisal 3%ig gedüngt. Nach ca. 2 Wochen in 8x8 Töpfe getopft (TKS 2 + Sand gedüngt). Wieder nach 2 Wochen umgetopft in 1 Liter Töpfe. Bevor die Pflanzen in die Weisskammern kommen erfolgt eine erste Bonitur auf Gesamthöhe und Blattanzahl, sowie eine erste Beerntung. | | | |

Eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung der Klimakammerversuche war es, eine möglichst hohe Anzahl einheitlicher Versuchspflanzen zu erhalten, damit statistisch basierte Auswertungen vorgenommen werden konnten. Die Abbildung 6 zeigt die Homogenität der Pflanzen zum Beispiel nach zwei Wochen Dauer des Versuchs I. Die Strategie der Beerntung von Blättern bei den ersten drei Klimakammerversuchen für die quantitative GUS-Messung zeigt Abb. 7. Pro Blatt wurden zwei Proben entnommen und hieraus ein Mittelwert gebildet. Ab dem dritten Klimakammerversuch wurden nur von jeweils dem jüngsten Blatt zwei Proben entnommen, da die GUS-Expression in allen Blattetagen ähnlich war. Nur im 1. Klimakammerexperiment wurde eine Abhängigkeit der GUS-Expression vom Blattalter gefunden, was aber nach Zugabe von 4% PVP zum Extraktionspuffer nicht mehr festzustellen war. Das dritte und vierte Klimakammerexperiment sollte zusätzlich den Einfluss einer gesetzten Verletzung untersuchen. Da für jede Messreihe pro Linie und Behandlung bis zu 24 Pflanzen zur Verfügung standen, basieren die nachfolgend dargelegten Ergebnisse zur GUS-Expression und zur Pflanzenhöhe auf statistisch

absicherbaren Mittelwerten. Auf die Darstellung der Blattanzahl wurde verzichtet, da die Ergebnisse mit der Pflanzenhöhe korrelieren und keine darüber hinaus gehenden Informationen beherbergen.

Abbildung 6: Homogenität der Pflanzen nach zwei Wochen Versuchsdauer

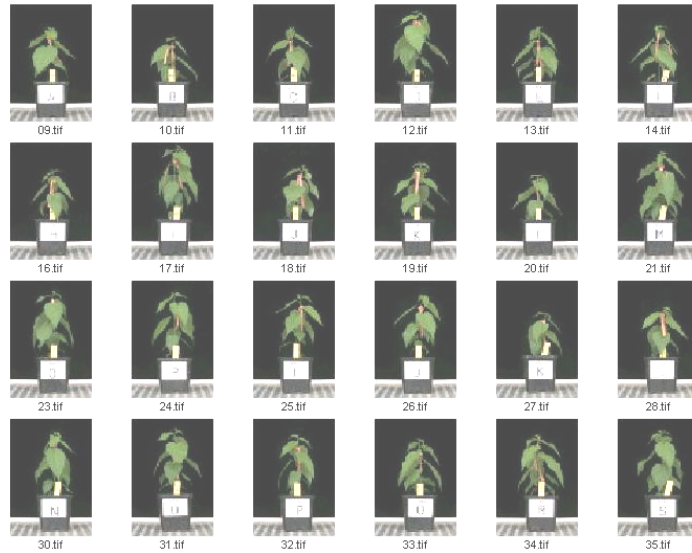
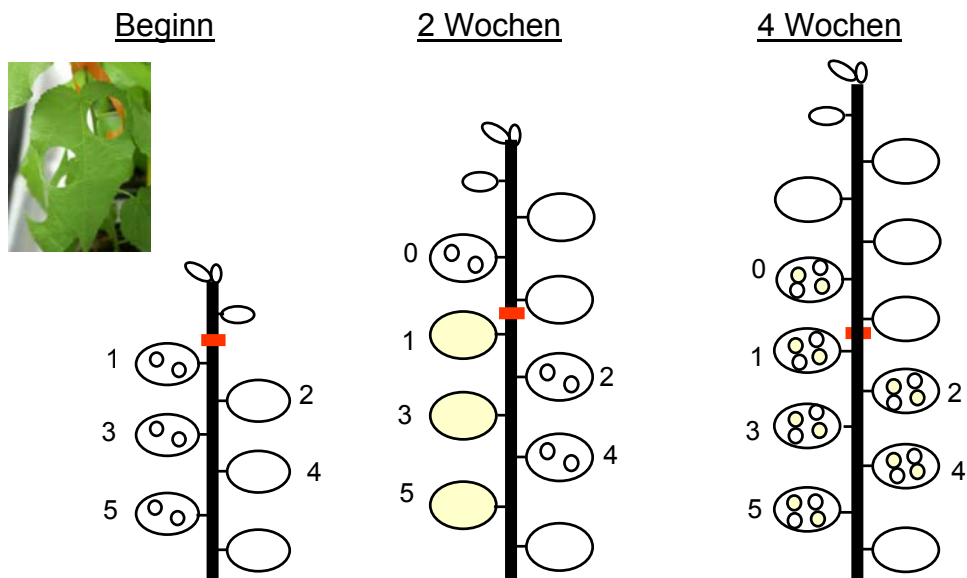


Abbildung 7: Beprobungsstrategie beim 1. Klimakammerversuch. Zahlen stellen Blattnummern dar (vgl. Abb. 8)



Für jeden durchgeführten Versuch werden nachfolgend die erhaltenen GUS-Expressionswerte sowie Höhenmessungen dargestellt. Die Beschreibung der Versuchsbedingungen der einzelnen Versuche ist zur Orientierung kurz in der Kopfleiste dargestellt.

Als Beispiel für die schädigende Wirkung des UV-Lichts auf die Blattepidermis ist in Abb. 8 ein Blatt nach fünf Minuten UV Bestrahlung im Vergleich zu einem unbestrahlten Blatt dargestellt. Deutlich ist die hellgrüne Blutfärbung des bestrahlten Blattes zu erkennen.

Abbildung 8: Ein für fünf Minuten UV-bestrahltes Blatt (rechts) im Vergleich zu einem unbestrahlten Blatt (links)



Zusammenfassung der Ergebnisse der Klimakammerversuche:

Klimakammerversuch I:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 4 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Weisskammer 6 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 6 Pflanzen E51/2 6 Pflanzen |
| Weisskammer 1 | 24 Std. 30°C | Esch5 8 Pflanzen E51/2 8 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 35°C | Esch5 8 Pflanzen E51/2 8 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 9: Messungen zu Versuchsbeginn sowie nach 2 und 4 Wochen
Versuchsdauer (A) Höhe (B) Blattzahl

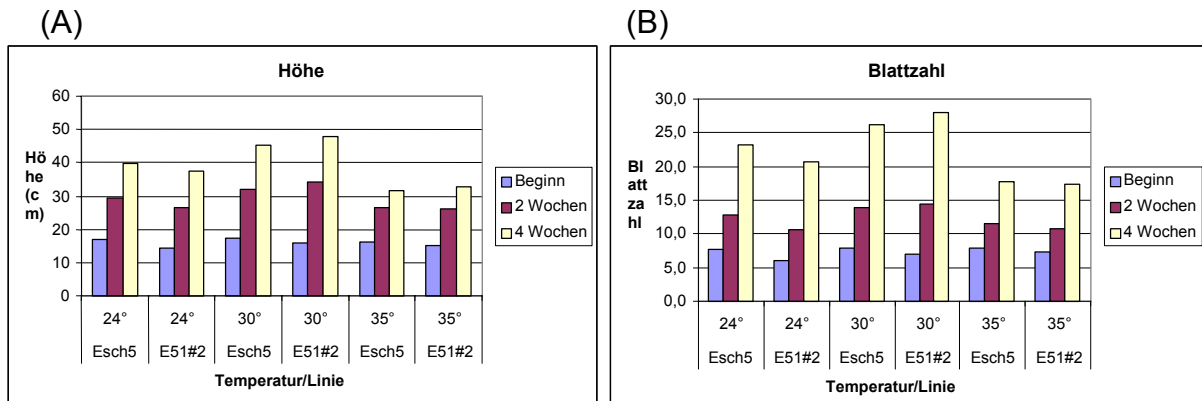
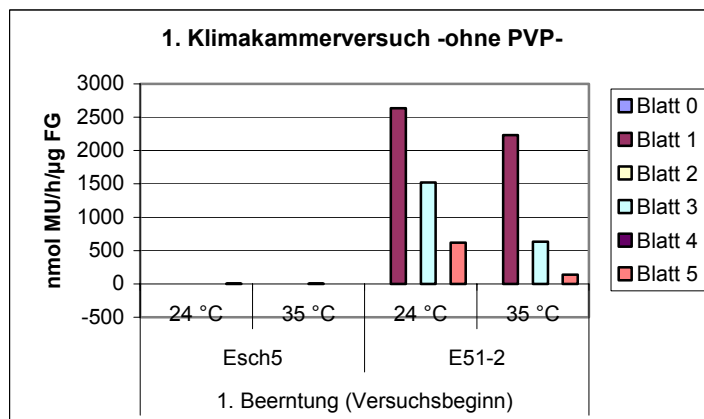


Abbildung 10: Quantitative GUS-Messungen (ohne PVP)



Ergebnisse: Es wurde bei Esch5 und bei E51/2 eine signifikante Wuchsrepression bei 35 °C festgestellt. Sehr hohe GUS-Expressionswerte im jüngsten Blatt, sinkende Werte in älteren Blättern. Nach Zugabe von 4% PVP zum Extraktionspuffer finden sich in jungen und reifen Blattgeweben ähnliche GUS-Expressionswerte. GUS-Messungen bei allen folgenden Klimakammerversuchen werden nach Zugabe von 4% PVP durchgeführt.

Klimakammerversuch II:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 4 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Weisskammer 6 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 6 Pflanzen E51/2 6 Pflanzen |
| Weisskammer 1 | 24 Std. 30°C | Esch5 8 Pflanzen E51/2 8 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 35°C | Esch5 8 Pflanzen E51/2 8 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 11: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

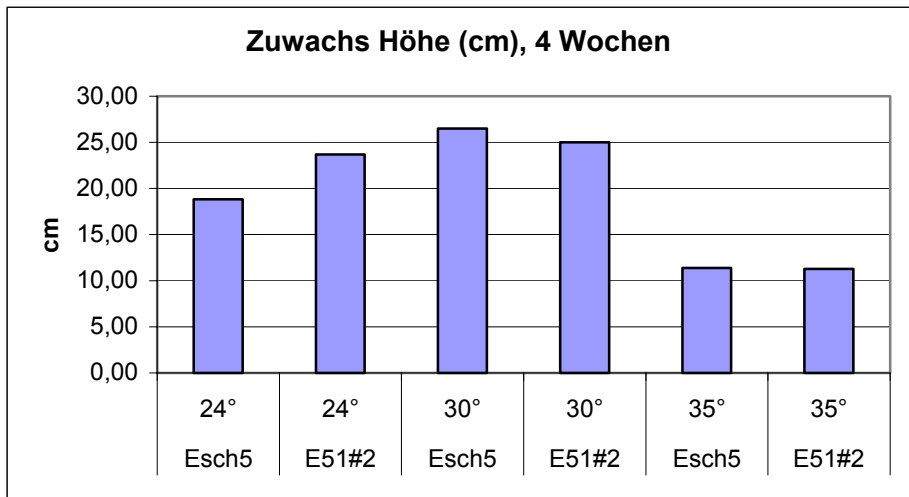
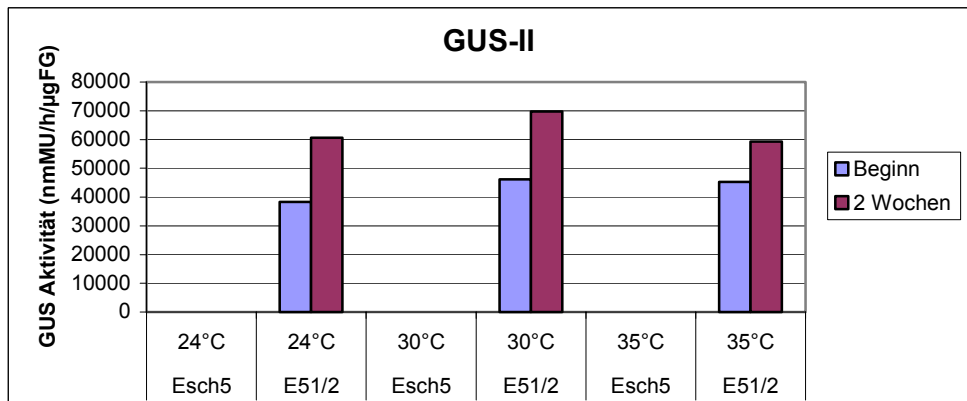


Abbildung 12: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Es wurde eine signifikante Wuchsrepression bei 35 °C festgestellt, GUS-Aktivitäten bei 51/2 unter allen Temperaturregimen nicht signifikant verschieden. Versuch wird wiederholt (siehe GUS-IV), da GUS Messungen nach 4 Wochen aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

Klimakammerversuch III:

Temperaturversuch mit zusätzlichem UV-Stress

| | | |
|---------------|--------------------------|--|
| Weisskammer 6 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 6 Pflanzen davon 4 Pfl. UV gestresst E51/2 6 Pflanzen davon 4 Pfl. UV gestresst |
| Weisskammer 1 | 24 Std. 30°C | Esch5 8 Pflanzen davon 4 Pfl. UV gestresst E51/2 8 Pflanzen davon 6 Pfl. UV gestresst |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 35°C | Esch5 8 Pflanzen davon 4 Pfl. UV gestresst E51/2 8 Pflanzen davon 6 Pfl. UV gestresst |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 13: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

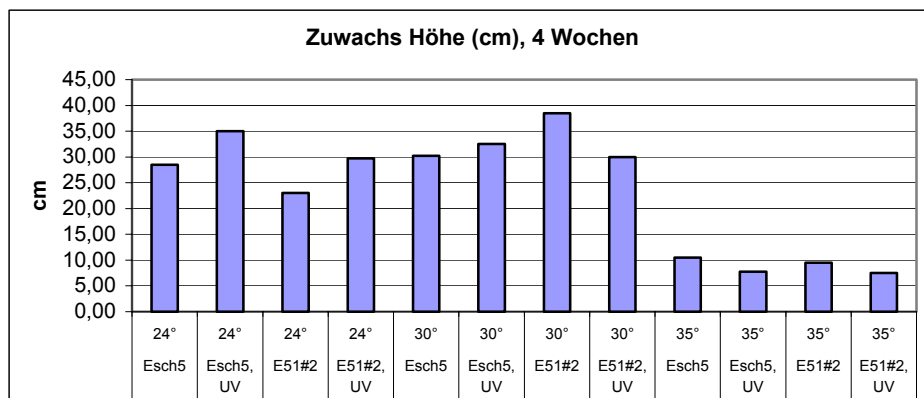
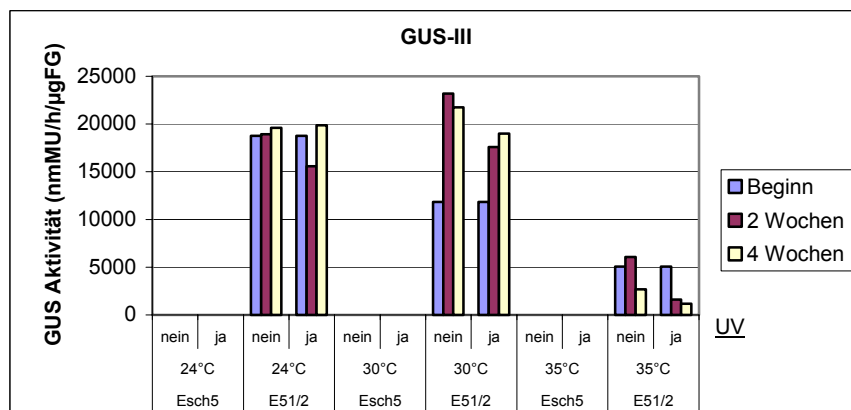


Abbildung 14: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Signifikante Wuchsrepression bei 35 °C bestätigt. Nach 4 Wochen unter 35 °C ist eine signifikante Reduzierung der GUS-Aktivität festzustellen, wobei UV-Stress diesen Effekt verstärkt.

Klimakammerversuch IV:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 6 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|--|
| Weisskammer 6 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 12 Pflanzen E51/2 21 Pflanzen |
| Weisskammer 1 | 24 Std. 30°C | Esch5 12 Pflanzen E51/2 21 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 35°C | Esch5 12 Pflanzen E51/2 21 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 15: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

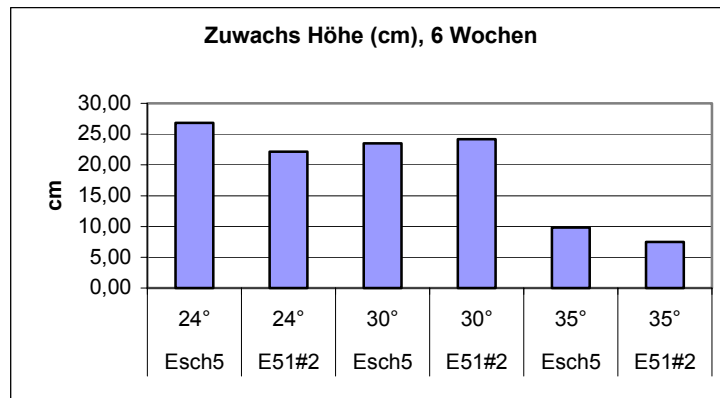
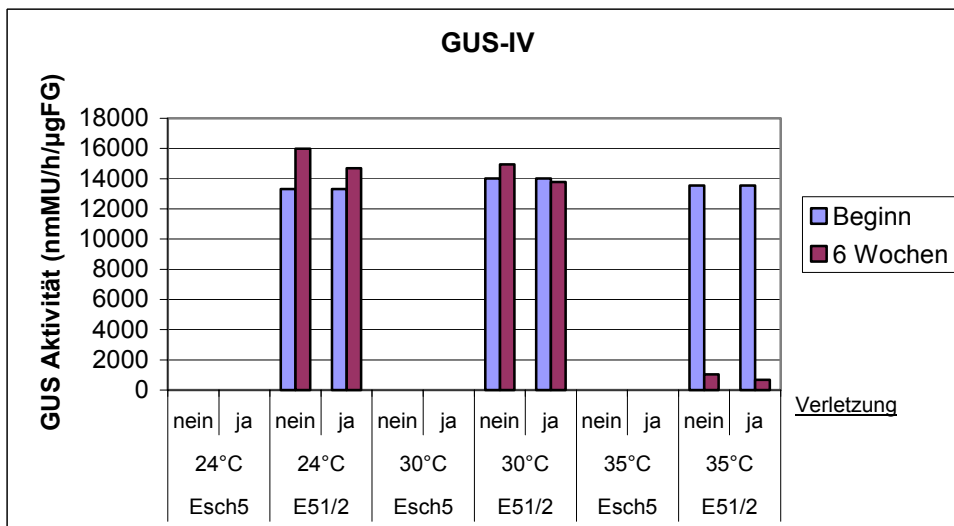


Abbildung 16: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Signifikante Wuchsrepression bei 35 °C für E51/2 bestätigt. Auch für die GUS-Aktivität ist eine deutliche Reduzierung nach 6 Wochen unter 35 °C festzustellen. Eine vorübergehende Verletzung der Blätter hat jedoch keinen Einfluss auf die GUS-Aktivität.

Klimakammerversuch V:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 2 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|--|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 12 Pflanzen E51/6 24 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | Esch5 12 Pflanzen E51/6 24 Pflanzen |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | Esch5 12 Pflanzen E51/6 24 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 17: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

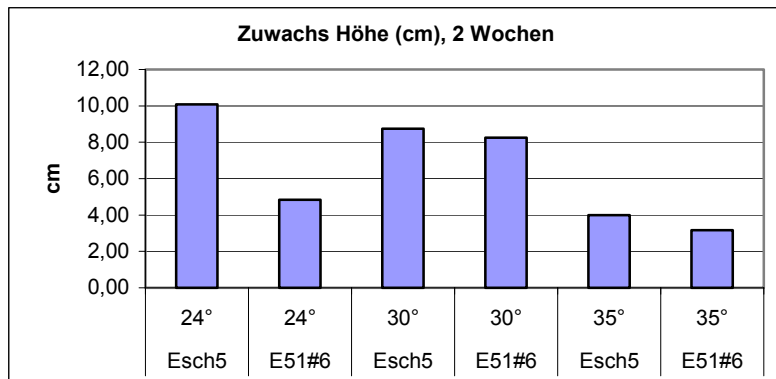
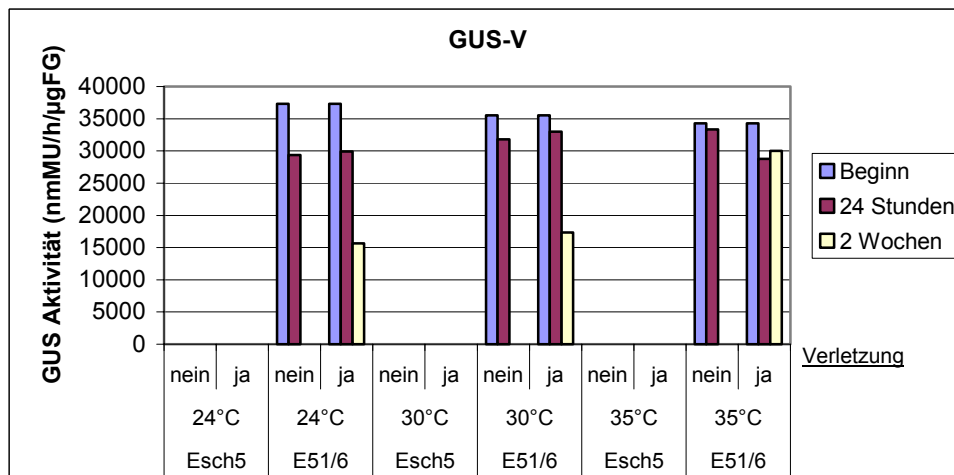


Abbildung 18: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Auch für E51/6 wurde eine signifikante Wuchsrepression bei 35 °C festgestellt. GUS-Aktivitäten unter allen Temperaturregimen nicht signifikant verschieden. Der Einfluss einer gesetzten Verletzung auf die GUS-Aktivität ist nicht einheitlich: bei 24 °C und 30 °C ist eine Reduzierung festzustellen, bei 35 °C jedoch nicht.

Klimakammerversuch VI:

Temperaturversuch und UV – Stress (5min) über 21 Tage

| | | |
|---------------|--------------------------|---|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 12 Pflanzen davon 8 Pflanzen UV-Stress E51/6 24 Pflanzen davon 16 Pflanzen UV-Stress |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | Esch5 12 Pflanzen davon 8 Pflanzen UV-Stress E51/6 24 Pflanzen davon 16 Pflanzen UV-Stress |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | Esch5 12 Pflanzen davon 8 Pflanzen UV-Stress E51/6 24 Pflanzen davon 16 Pflanzen UV-Stress |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 19: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende:

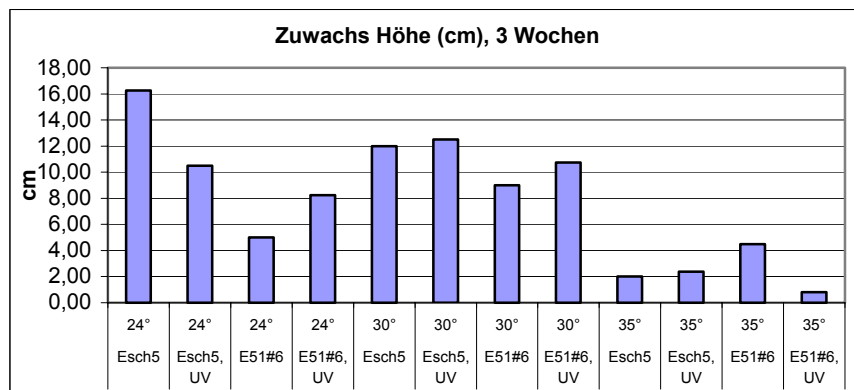
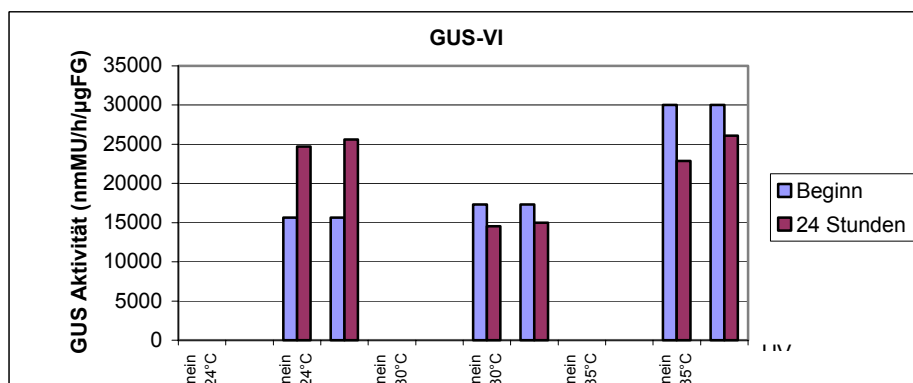


Abbildung 20: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Die signifikante Wuchsrepression für E51/6 bei 35 °C wurde bestätigt. UV-Behandlung bei E51/6 verstärkt die Wuchsrepression bei 35 °C. Allerdings haben weder Temperatur noch UV einen signifikanten Effekt auf die GUS-Aktivität.

Klimakammerversuch VII:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 2 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|---|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 6 Pflanzen E10/6 6 Pflanzen E51/3 20 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | Esch5 6 Pflanzen E10/6 6 Pflanzen E51/3 20 Pflanzen |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | Esch5 6 Pflanzen E51/6 6 Pflanzen E51/3 20 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 21: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende:
Zuwachs in cm

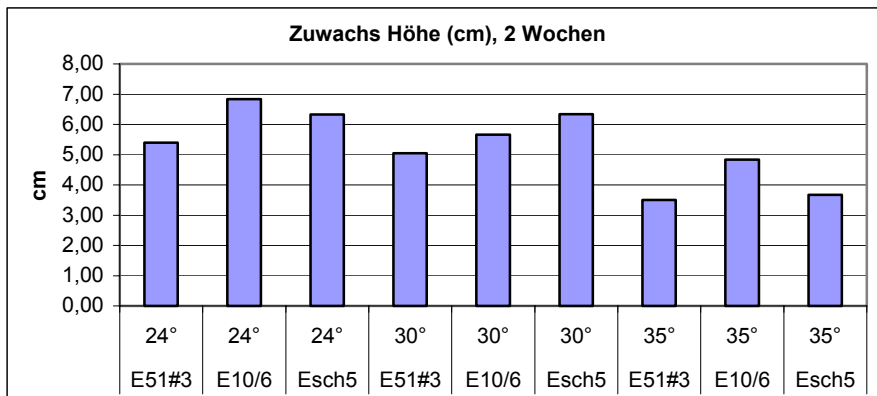
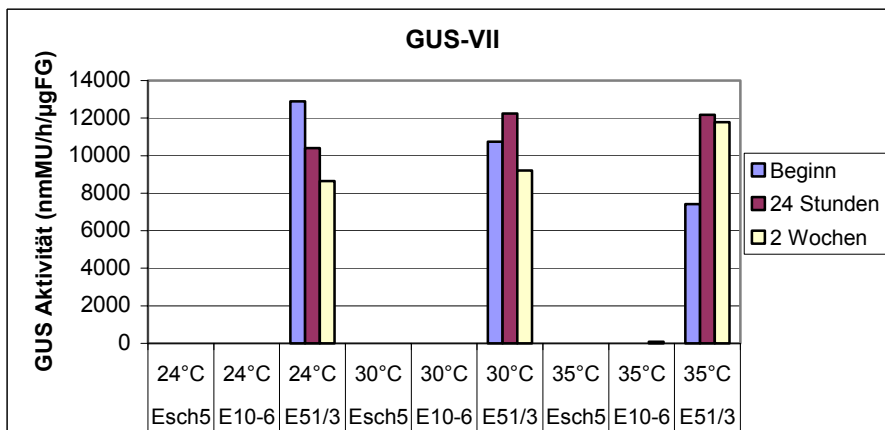


Abbildung 22: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Für E51/3, E10-6 und Esch5 wurden signifikante Wuchsrepressionen bei 35 °C festgestellt. GUS-Aktivitäten unter allen Temperaturregimen nicht signifikant verschieden. E10-6 verhält sich wie eine nicht-transgene Kontrolle.

Klimakammerversuch IX:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 2 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|--|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 10 Pflanzen E83/1 18 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | Esch5 10 Pflanzen E83/1 18 Pflanzen |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | Esch5 10 Pflanzen E83/1 18 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 25: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

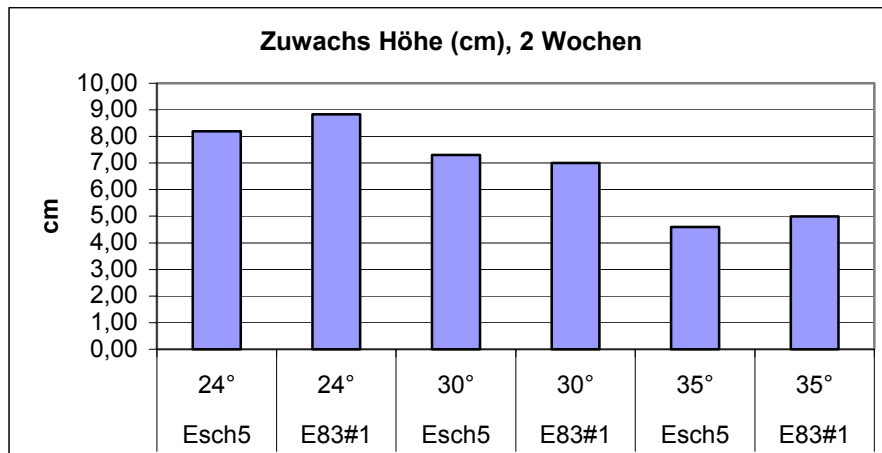
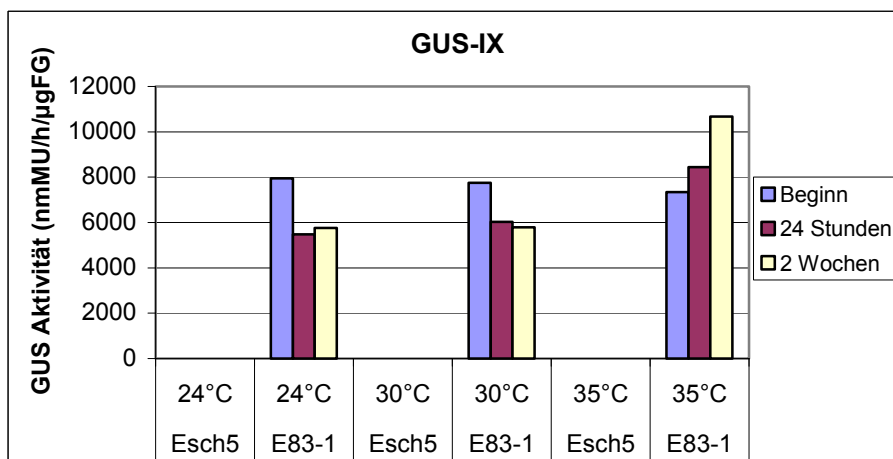


Abbildung 26: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Auch für E81-1 wurden signifikante Wuchsrepressionen bei 35 °C festgestellt. GUS-Aktivitäten bei 24 und 30 °C sind nicht signifikant verschieden, dagegen bei 35 °C nach zwei Wochen Versuchsdauer signifikant höher.

Klimakammerversuch XI:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 2 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|--|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 12 Pflanzen E51/9 20 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | Esch5 12 Pflanzen E51/9 20 Pflanzen |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | Esch5 12 Pflanzen E51/9 20 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 29: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

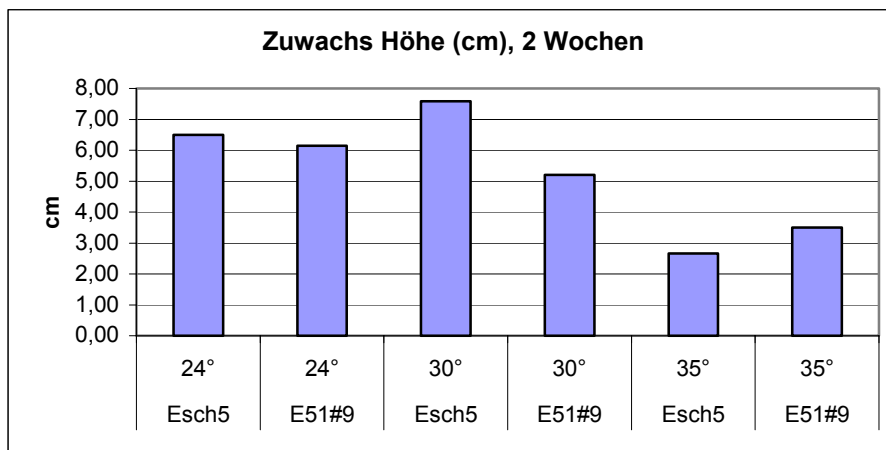
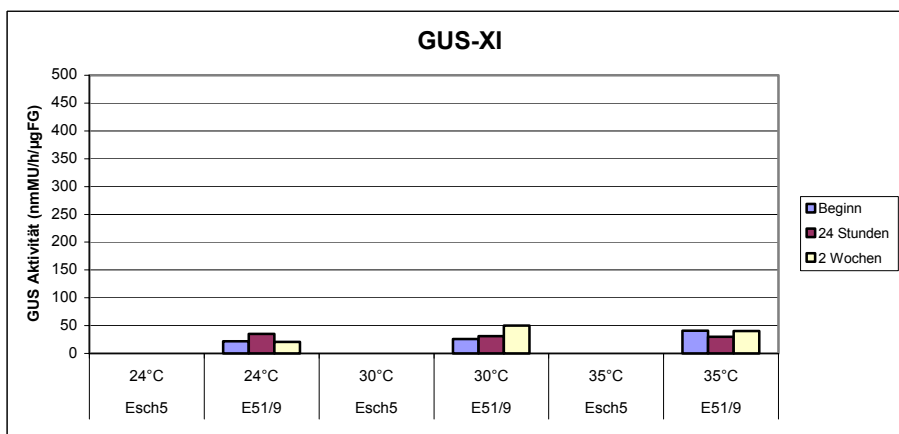


Abbildung 30: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Auch für E51/9 wurde eine signifikante Wuchsrepression bei 35 °C festgestellt. Verglichen mit anderen *uidA*-transgenen Linien sind nur äußerst geringe GUS-Aktivitäten messbar (etwa nur 0,5-1%; s.a. Skalierung!). Allerdings sind die GUS-Aktivitäten bei E51/9 signifikant höher als bei Esch5.

Klimakammerversuch XIII:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 2 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|--|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 12 Pflanzen E51/5 20 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | Esch5 12 Pflanzen E51/5 20 Pflanzen |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | Esch5 12 Pflanzen E51/5 20 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 33: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

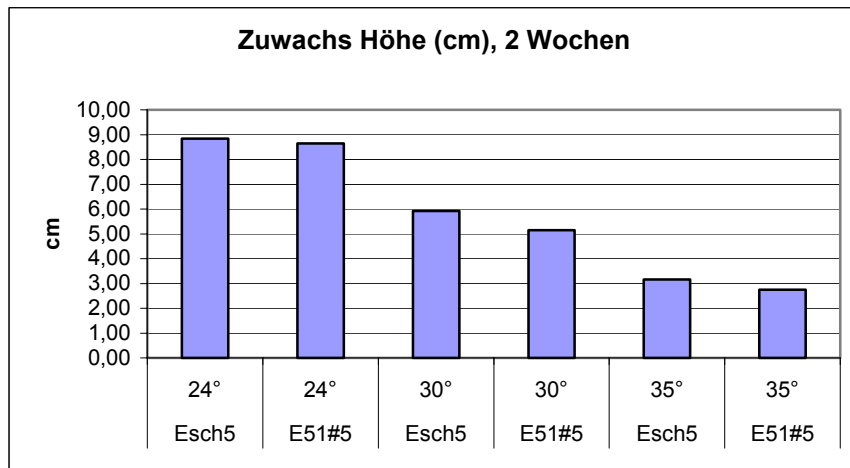
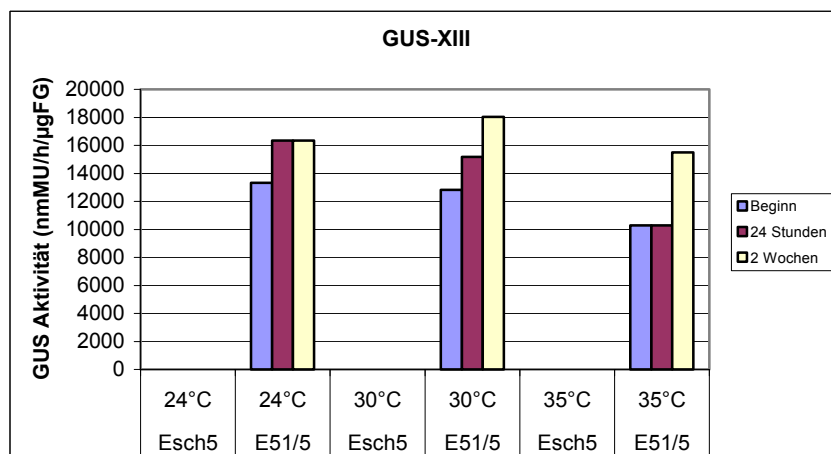


Abbildung 34: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Auch für E51/5 wurde eine signifikante Wuchsrepression bei 35 °C festgestellt, diese Linie zeigt auch bei 30 °C einen signifikanten Rückgang des Wachstums. Allerdings ist kein Einfluss der Temperatur auf die GUS-Aktivität zu bemerken.

Klimakammerversuch XV:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 2 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|---|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 6 Pflanzen E51/10 12 Pflanzen E83/4 12 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | Esch5 6 Pflanzen E51/10 12 Pflanzen E83/4 12 Pflanzen |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | Esch5 6 Pflanzen E51/10 12 Pflanzen E83/4 12 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 37: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende:
Zuwachs in cm

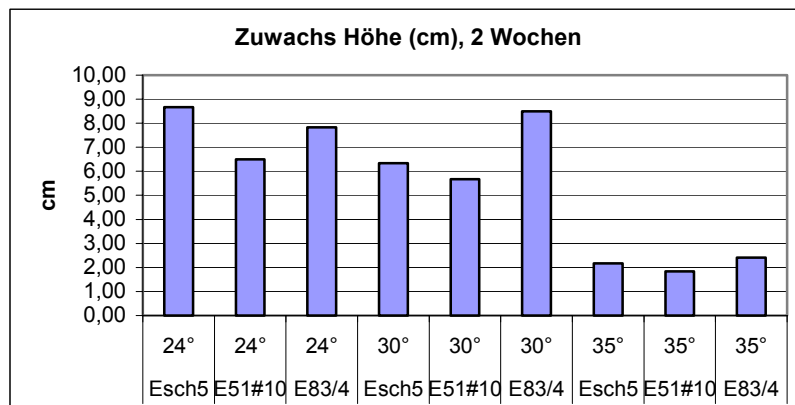
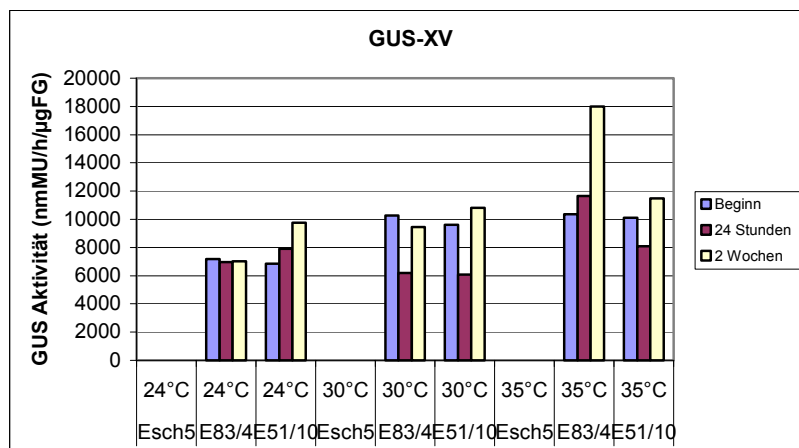


Abbildung 38: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Bei allen Linien wurde eine signifikante Wuchsrepression bei 35 °C festgestellt. Die GUS-Aktivitäten sind unter allen Temperaturregimen mit der Ausnahme E83/4 bei 35 °C nicht signifikant verschieden. E83/4 reagiert bei hoher Temperatur mit einer signifikanten GUS-Aktivitätssteigerung.

Klimakammerversuch XVII:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 2 Wochen

| | | |
|---------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | Esch5 6 Pflanzen E83/3 20 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | Esch5 6 Pflanzen E83/3 20 Pflanzen |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | Esch5 6 Pflanzen E83/3 20 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 41: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

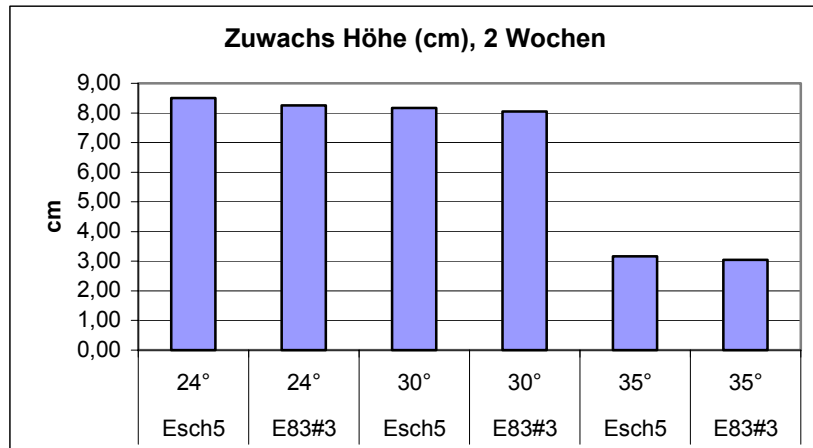
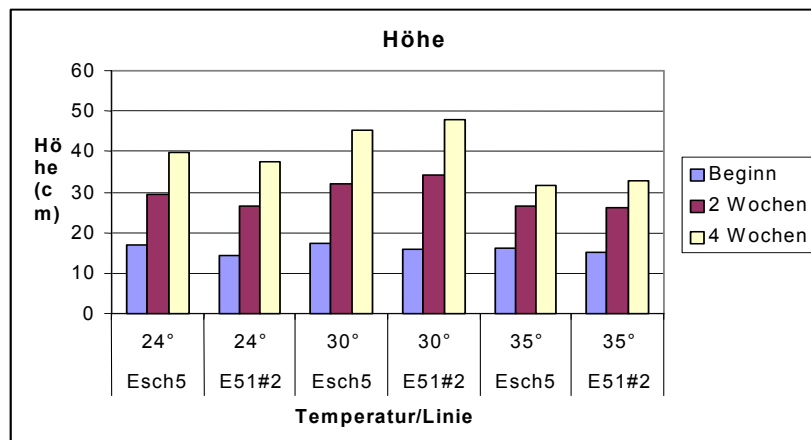


Abbildung 42: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Es wurde eine signifikante Wuchsrepression bei 35 °C festgestellt. E83/3 hat wie Esch5 keine GUS-Aktivität.

Klimakammerversuch XIX:

Temperaturversuch über einen Zeitraum von 10 Tagen

| | | |
|---------------|--------------------------|--|
| Weisskammer 4 | 24 Std. 24°C (Kontrolle) | E14/18 8 Pflanzen E51/7 10 Pflanzen |
| Weisskammer 2 | 24 Std. 30°C | E14/18 8 Pflanzen E51/7 10 Pflanzen |
| Weisskammer 3 | 24 Std. 35°C | E14/18 7 Pflanzen E51/7 10 Pflanzen |

Tag 16 Std. Nacht 8 Std. Luftfeuchtigkeit ca. 70%

Abbildung 45: Messungen der Pflanzenhöhe zu Versuchsbeginn und Versuchsende: Zuwachs in cm

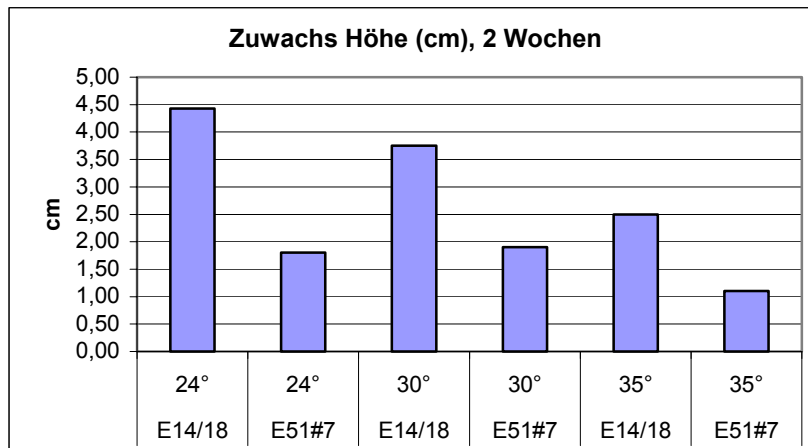
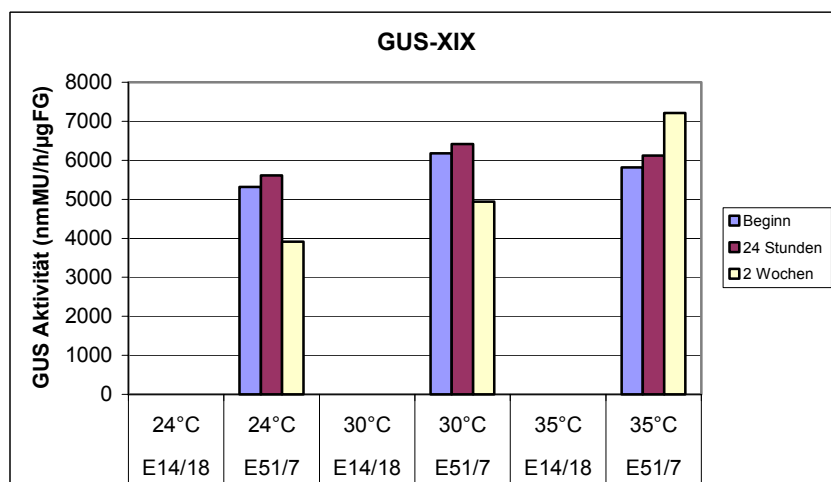


Abbildung 46: Quantitative GUS-Messungen



Ergebnisse: Es wurde bei beiden Linien eine signifikante Wuchsrepression bei 35 °C festgestellt. Die GUS-Aktivität war für E51/7 bei 24 und 30 °C nicht signifikant verschieden, bei 35 °C war ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen.

3.5. Molekulare Untersuchungen zum Transgen-Insertionsort

Untersuchungen über das Vorliegen eines vollständigen Repeats am T-DNA-Integrationsort wurden bei den Esch5:35S-*uidA*, Esch5:35S-*iaaL* und Esch5:*rbcS-roIC* transgenen Linien durchgeführt (Tab. 5).

Tabelle 5: Ergebnisse der Transgen-Wiederholung und der C-Methylierung aufgeschlüsselt nach den Linien der verschiedenen Aspenklone

| Transgener Aspenklon | Nummer der Linie | Transgen-Repeat | C-Methylierung |
|--------------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| <u>Esch5:35S-<i>uidA</i></u> | 1 | Nicht transgen | Nicht transgen |
| | 2 | - | - |
| | 3 | - | - |
| | 4 | Nicht transgen | Nicht transgen |
| | 5 | + | + |
| | 6 | - | - |
| | 7 | - | - |
| | 8 | - | - |
| | 9 | + | + |
| | 10 | + | + |
| | 11 | + | + |
| <u>Esch5:35S-<i>iaaL</i></u> | 4 | - | - |
| | 6 | + | + |
| | 8 | - | - |
| <u>Esch5:<i>rbcS-roIC</i></u> | 4 | - | - |
| | 18 | - | - |

Es stellte sich zunächst heraus, dass von den ursprünglich elf unabhängigen Esch5:35S-*uidA* Linien neun Linien das *uidA* Gen beinhalten. Von diesen zeigten fünf Linien eine Kopie des Gens, und vier Linien wiesen zwei Kopien auf, die aber jeweils als direkte Wiederholung („direct repeat“) am Integrationsort vorliegen.

Bei den ursprünglich neun vorhandenen unabhängigen Esch5:35S-*iaaL* waren nur noch sieben im Gewächshaus verfügbar, von denen aber nur drei erfolgreich in die Gewebekultur rücküberführbar waren. Diese sehr niedrige Rücküberführungsrate könnte auf die Wirkung des *iaaL*-Gens zurückgeführt werden, da das *iaaL*-Protein in den Hormonhaushalt eingreift. Dieser Umstand könnte auch erklären, warum die

Bewurzelung der drei erfolgreich in die Gewebekultur rücküberführten Linien so außerordentlich schwierig ist. Von diesen drei Linien zeigte nur eine Linie das Vorliegen eines direkten Repeats. Bei beiden Esch5:rbcS-ro/C transgenen Linien zeigten beide Linien jeweils nur eine Kopie.

Eine Analyse der C-Methylierung wurde ebenfalls bei den genannten Linien vorgenommen. In der Literatur wird davon berichtet, dass in transgenen Pflanzen mit der Ausbildung von Repeats auch eine C-Methylierung von Promotor und/oder Transgen in den übertragenen Konstrukten einhergeht. Mit der von uns entwickelten Methode, vor der PCR Reaktion die DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen zu verdauen, lassen sich wenig zeitaufwendig und kostengünstig qualitativ Aussagen über die Methylierung von Sequenzen machen. Alle hier untersuchten Pappellinien, die über einen Repeat verfügen, zeigen auch methylierte C-Nukleotide (Tab. 5).

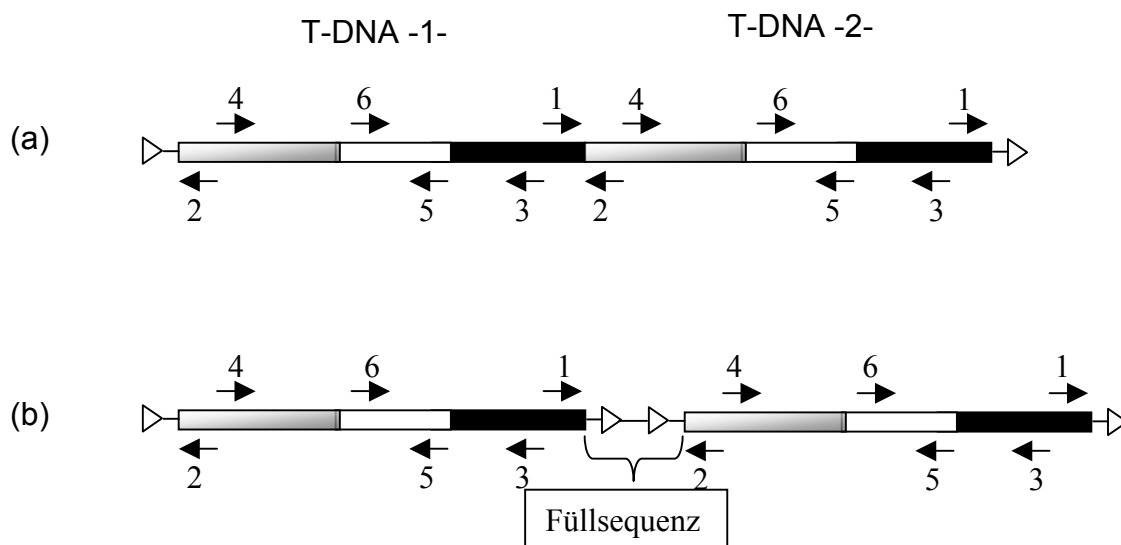
3.6. Details zur Struktur des Transgen-Insertionsorts

Bei einigen Linien, die einen vollständigen Repeat aufweisen, konnte die Sequenz zwischen beiden T-DNAs („Repeat junction“) bestimmt werden. Es wurden zwei Klassen von Repeat junctions gefunden. Bei den sogenannten „präzisen Verbindungen“ sind die beiden T-DNAs ohne Füllsequenzen direkt miteinander verbunden (Abb. 9a), während bei den „unpräzisen Verbindungen“ Füllsequenzen zwischen beiden T-DNAs von wenigen Nukleotiden bis zu mehreren Hundert Nukleotiden vorkommen (Abb. 9b). Die Herkunft dieser Füllsequenzen ist nicht immer eindeutig zuzuordnen: häufig stellen die Füllsequenzen kopierte Sequenzen des verwendeten Plasmids dar, manchmal ist es auch möglich, einen genomischen Ursprung anzunehmen.

Für die beiden transgenen Linien Esch5:35S-*uidA*#5 und -#9 wurde jeweils eine präzise Verbindung zwischen den T-DNAs im Repeat gefunden. Die aktuelle Verbindungssequenz zwischen beiden T-DNAs kann sowohl mit der rechten Border der ersten T-DNA als auch mit der linken Border der 2. T-DNA (-6 Basenpaare) aligned werden. Damit sind beide Repeat junctions gleich. Für die Linie Esch5:35S-*uidA*#10 wurde auch eine präzise Verbindung zwischen den T-DNAs im Repeat bestimmt, wobei aber etwa 2,9 kb der linken Border deletiert sind. Für Esch5:35S-*iaaL*#2 wurde eine unpräzise Verbindung detektiert, wobei sich zwischen beiden T-

DNA Molekülen 265 Baasenpaare befinden, die genomischer DNA zugeordnet werden konnte.

Abbildung 49: Zwei Möglichkeiten beim Vorliegen eines vollständigen Repeats. (a) mit „präziser Verbindung“, (b) mit „unpräziser Verbindung“



4. Literaturangaben

- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Fladung, M., Kumar, S. (2002) Gene stability in transgenic aspen-*Populus*.III. T-DNA repeats influence transgene expression differentially among different transgenic lines. *Plant Biol.* 4, 329-338.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan M.W. (1987) GUS-fusions: β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.
- Kumar, S., Fladung, M. (2001) Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta* 213, 731-740.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammengefasst wurden im Rahmen des Projekts überdurchschnittlich viele und verwertbare Ergebnisse erbracht. Nach anfänglichen Schwierigkeiten wurde die Mehrzahl der Linien erfolgreich in die *in vitro* Kultur gebracht. Mit allen überführten Linien sind Klimakammerversuche mit den Stressfaktoren Temperatur und UV-Licht durchgeführt worden. Auch hinsichtlich der Erzeugung der Esch5:rbcS-*uidA* transgenen Linien gab es zwar zu Beginn des Projekts bedingt durch die Nicht-Verfügbarkeit des Konstrukts Verzögerungen, die aber in der restlichen Projektlaufzeit kompensiert werden konnten. So wurden auch mit drei Esch5:rbcS-*uidA* transgenen

In den Tabellen 6 und 7 sind die Ergebnisse aus den 20 durchgeführten Klimakammerversuchen aufgeschlüsselt nach Temperatur und UV-Behandlung in Abhängigkeit zur verwendeten Linie schlaglichtartig zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Klimakammerversuche mit UV-Behandlung.
 Ergebnisse zum Wachstum und zur GUS-Aktivität sind wie folgt aufgeführt:
 - reduziert; -- fast keine
 + gut bzw. hoch; ++ erhöht

| UV | nein | ja | nein | ja |
|------------------|-----------------|----------------|----------------------|-------|
| Linie | <i>Wachstum</i> | | <i>GUS-Aktivität</i> | |
| Kontrolle | | | | |
| Esch5 | + | Meist + | keine | keine |
| rbcS-roIC | | | | |
| E14/18 | + | - | keine | keine |
| 35S-iaaL | | | | |
| E10/6 | + | - | keine | keine |
| 35S-uidA | | | | |
| E51/2 | + | + | + | + |
| E51/3 | + | - | + | + |
| E51/5 | + | - | + | + |
| E51/6 | + | + | + | + |
| E51/7 | + | + | + | + |
| E51/9 | + | + | -- | -- |
| E51/10 | + | + | + | + |
| rbcS-uidA | | | | |
| E83-1 | + | - | + | + |
| E83-3 | + | + | -- | -- |
| E83-4 | + | - | + | + |

Zunächst muss festgestellt werden, dass keine Hinweise auf prinzipielle Instabilitäten der GUS-Expression gefunden werden konnten, die durch die eingesetzten Stressfaktoren Temperatur und UV-Licht ausgelöst wurden. Dennoch sind linien- und Konstruktspezifische Variationen gefunden worden, die noch mal kurz zusammengefasst werden sollen:

Bei allen Linien zeigte sich sowohl bei 24 °C als auch bei 30 °C ein gutes Wachstum, das in allen Fällen nicht signifikant verschieden war. Dagegen war eine Temperatur von 35 °C als Stress anzusehen, da im Vergleich zu unter 24 und 30 °C kultivierten Pflanzen eine signifikante Wachstumsrepression zu verzeichnen war, wobei die Größenzunahme der Pflanzen während der Laufzeit der Klimakammerversuche um bis zu 50% verringert war.

Bei der Mehrzahl der 35S-*uidA* transgenen Linien war kein Einfluss gemäßigter (30 °C) sowie hoher Temperatur (35 °C) auf die GUS-Aktivität festzustellen. Für E51/2 konnte eine Abnahme der GUS-Aktivität sowie für E51/7 eine Zunahme der GUS-Aktivität gemessen werden. Dagegen reagierten die beiden *rbcS-uidA* transgenen Linien E83/1 und E83/4 unter 35 °C signifikant mit einer Zunahme der GUS-Aktivität. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass der *rbcS*-Promotor lichtaktivierbar ist und in Blättern eine hohe, mit dem 35S-Promotor vergleichbare Transgen-Aktivität, im Spross oder in der Wurzel dagegen nur eine sehr geringe Transgen-Aktivität induziert. Der *rbcS*-Promotor kann somit als blattspezifisch bezeichnet werden. Möglicherweise sind die gefundenen Unterschiede auf die speziellen Eigenschaften des *rbcS*-Promotors zurückzuführen.

Eine UV-Behandlung für fünf Minuten erwies sich als schädigend für die Versuchspflanzen, was sich kurz nach der Behandlung in der Ausbleichung der bestrahlten Blätter zeigte. Nach Beendigung der Klimakammerversuche war bei der Kontrolllinie Esch5 in der überwiegenden Anzahl der Versuche keine signifikante Reduktion des Größenzuwachses festzustellen. Bei den transgenen Linien E14/18 und E10/6, die hinsichtlich der GUS-Expression auch als Kontrolllinien aufzufassen sind, zeigte sich jedoch ein hemmender Einfluss der UV-Bestrahlung auf die Größenzunahme. Die 35S-*uidA* transgenen Linien zeigten mit Ausnahme von E51/3 und E51/5 keine Beeinflussung ihres Wachstums nach UV-Behandlung, was auch in allen Linien mit nicht signifikant verschiedenen GUS-Aktivitätswerten einherging. Dagegen reagierten beide *rbcS-uidA* transgenen Linien E83/1 und E83/4 nach UV-Behandlung mit einer signifikanten Verringerung der Größenzunahme, allerdings ohne signifikante Beeinflussung der GUS-Aktivität. Wieder zeigte die Linie E83/3 überhaupt keine Transgen-Aktivität.

Ebenfalls konnte kein Einfluss einer vorher gesetzten Verletzung auf die GUS-Aktivität festgestellt werden.

Bei einer 35S-*uidA* transgenen Linie E51/9 konnte eine nur sehr geringe GUS-Expression gemessen und somit eindeutig jeweils eine Geninaktivierung des *uidA*-Gens festgestellt werden. In früheren Untersuchungen mit dieser Linie wurde nach qualitativer GUS-Färbung von Blättern eine partielle Inaktivierung gefunden. Es wird vermutet, dass zwischenzeitlich eine fast vollständige Geninaktivierung eingetreten ist, da die gemessenen GUS-Aktivitäten immer signifikant höher als die von nicht-transgenen Kontrollen waren. Dagegen zeigte die Linie E83/3 überhaupt keine GUS-Aktivität. Im Southern-Blot konnten drei Kopien festgestellt werden, was für eine Transgen-Wiederholung spricht. Da somit nach molekularen Untersuchungen diese Linie das übertragene Gen besitzt und somit als gentechnisch verändert eingestuft werden muss, wird angenommen, dass bereits kurz nach der Transformation eine Geninaktivierung stattgefunden hat.

Die in den Linien E51/9 und E83/3 gefundenen Geninaktivierungen waren bereits vor Beginn der Klimakammerexperimente eingetreten und sind somit unabhängig von den Stressbedingungen der Klimakammerversuche zu sehen. Die Inaktivierung des *uidA*-Gens ist in beiden Linien jeweils wahrscheinlich auf die spezielle Situation am Transgen-Integrationsort, nämlich das Vorliegen einer Transgen-Wiederholung, zurückzuführen. Dieses Ergebnis bestätigt entsprechende frühere Ergebnisse, die an 35S-*rolC* transgenen Pappeln beobachtet wurden. Allerdings muss auch bemerkt werden, dass bei zwei weiteren, 35S-*uidA* transgenen Linien, die ebenfalls eine Transgen-Wiederholung am Insertionsort aufweisen, keine Hinweise auf Inaktivierung des *uidA*-Gens selbst unter Stressbedingungen gefunden werden konnte.

Zusammengefasst konnten nach der Analyse von insgesamt etwa 1.000 transgenen Pappelpflanzen, die in insgesamt 20 Klimakammerversuchen Temperatur- und UV-Stress unterworfen wurden, keine Hinweise auf eine instabile Expression des *uidA*-Gens, die unter Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren stehen, gefunden werden. Bei zwei Linien wurde eine Transgen-Inaktivierung beobachtet, die allerdings unabhängig von den Stressexperimenten bereits zu Beginn der Untersuchungen vorlag. Auch wurde gefunden, dass die Expression fremder Gene in transgenen Pappeln nach Applikation von Stress zwischen den verschiedenen untersuchten Linien mit nur einer T-DNA Kopie variiert. Gründe für die beobachteten linienabhängigen GUS-Expressionsmuster können der unterschiedliche Promotor (*rbcS versus 35S*) sowie jeweils verschiedene genomische T-DNA-Integrationsorte sein (Kumar und

Fladung 2001, Fladung und Kumar 2002). Das Vorliegen einer Transgen-Wiederholung am Insertionsort (zwei T-DNA Kopien) kann, muss aber nicht zwingend zu einer Inaktivierung des Transgens führen (Kumar und Fladung 2001).

6. Erfolgskontrollbericht

In diesem Projekt sollte die Expression und Stabilität von *35S-uidA* und *rbcS-uidA* sowie von zwei weiteren Konstrukten in gentechnisch veränderten Zitterpappeln (Aspen) unter Stressbedingungen getestet werden. Während *35S-uidA* transgene sowie die mit den beiden anderen Genkonstrukten transformierten Zitterpappeln bereits im Gewächshaus kultiviert wurden und für die geplanten Versuche in die Gewebekultur zurückgeführt werden mussten, waren die *rbcS-uidA* transgenen Zitterpappeln noch herzustellen.

Förderungspolitischer Bezug

Im Rahmen dieses Verbundprojekts sollte die Expression von fremden Genen unter vergleichenden Stressbedingungen (Temperatur, UV-Licht) in kontrollierten Klimakammerversuchen bei vier verschiedenen Gehölzarten (Zitterpappel, Rose, Rhododendron und Lärche) getestet werden. Zur Vereinheitlichung des Pflanzenmaterials wurden transgene Pflanzen ausgewählt, die das Markergen *uidA* (GUS-Expression) unter Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren enthalten: der konstitutiv exprimierende *35S*-Promotor und der lichtinduzierte *rbcS*-Promotor. Die Expression des *uidA*-Gens sollte in quantitativen Messungen bestimmt werden. Mit dem Gesamtprojekt sollten somit Antworten auf Fragen zur Stabilität fremder Gene in ausgewählten Gehölzarten gefunden werden. Damit ist der förderungspolitische Bezug zur Forschung im Bereich 'Biologische Sicherheit und Risikoabschätzung von Transgenen' sofort erkennbar.

Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

Die im Rahmen aus 20 durchgeführten Klimakammerversuchen gefundenen Ergebnisse aufgeschlüsselt nach Temperatur und UV-Behandlung haben gezeigt, dass keine Hinweise auf prinzipielle Instabilitäten der GUS-Expression gefunden werden konnten, die durch die eingesetzten Stressfaktoren Temperatur und UV-Licht

ausgelöst wurden. Dennoch sind linien- und konstruktsspezifische Variationen gefunden worden.

Bei zwei Linien wurde eine Transgen-Inaktivierung beobachtet, die allerdings unabhängig von den Stressexperimenten bereits zu Beginn der Untersuchungen vorlag. Auch wurde gefunden, dass die Expression fremder Gene in transgenen Pappeln nach Applikation von Stress zwischen den verschiedenen untersuchten Linien mit nur einer T-DNA Kopie variiert. Gründe für die beobachteten linienabhängigen GUS-Expressionsmuster können der unterschiedliche Promotor (*rbcS versus 35S*) sowie jeweils verschiedene genomische T-DNA-Integrationsorte sein. Das Vorliegen einer Transgen-Wiederholung am Insertionsort (zwei T-DNA Kopien) kann, muss aber nicht zwingend zu einer Inaktivierung des Transgens führen.

Verwertungsplan

Die vorhandenen Daten lassen Rückschlüsse auf die Stabilität von fremden Genen in der Zitterpappel zu. Da keine Hinweise auf prinzipielle Instabilitäten der GUS-Expression gefunden werden konnten, die durch die eingesetzten Stressfaktoren Temperatur und UV-Licht ausgelöst wurden, ist grundsätzlich auch in Bäumen von einer stabilen Expression fremder Gene auszugehen. Dennoch müssen linienspezifische Besonderheiten wie das Vorliegen einer Transgen-Wiederholung am Insertionsort sowie der so genannte Positionseffekt auf die Transgen-Expression berücksichtigt werden.

Einhaltung der Finanz- und Zeitplanung

Insgesamt ist unter Berücksichtigung kleinerer Verzögerungen die im Antrag dargelegte Finanz- sowie Zeitplanung eingehalten worden.

7. Kurzfassung des Schlussberichts

Die im Rahmen aus 20 durchgeführten Klimakammerversuchen nach der Analyse von insgesamt etwa 1.000 transgenen Pappelpflanzen gefundenen Ergebnisse haben gezeigt, dass nach Applikation der Stressoren Temperatur und UV-Licht keine Hinweise auf eine instabile Expression des *uidA*-Gens, das unter Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren stand, gefunden werden konnten. Dennoch sind folgende linien- und konstruktsspezifische Variationen gefunden worden.

- Bei allen Linien zeigte sich sowohl bei 24 °C als auch bei 30 °C ein gutes Wachstum, das in allen Fällen nicht signifikant verschieden war. Dagegen war eine Temperatur von 35 °C als Stress anzusehen, da im Vergleich zu unter 24 und 30 °C kultivierten Pflanzen eine signifikante Wachstumsrepression zu verzeichnen war, wobei die Größenzunahme der Pflanzen während der Laufzeit der Klimakammerversuche um bis zu 50% verringert war.
- Bei der Mehrzahl der 35S-*uidA* transgenen Linien war kein Einfluss gemäßigter (30 °C) sowie hoher Temperatur (35 °C) auf die GUS-Aktivität festzustellen. Für E51/2 konnte eine Abnahme der GUS-Aktivität sowie für E51/7 eine Zunahme der GUS-Aktivität gemessen werden. Dagegen reagierten die beiden *rbcS-uidA* transgenen Linien E83/1 und E83/4 unter 35 °C signifikant mit einer Zunahme der GUS-Aktivität.
- Eine UV-Behandlung für fünf Minuten erwies sich als schädigend für die Versuchspflanzen, was sich kurz nach der Behandlung in der Ausbleichung der bestrahlten Blätter zeigte. Nach Beendigung der Klimakammerversuche war bei der Kontrolllinie Esch5 in der überwiegenden Anzahl der Versuche keine signifikante Reduktion des Größenzuwachses festzustellen. Bei den transgenen Linien E14/18 und E10/6, die hinsichtlich der GUS-Expression auch als Kontrolllinien aufzufassen sind, zeigte sich jedoch ein hemmender Einfluss der UV-Bestrahlung auf die Größenzunahme. Die 35S-*uidA* transgenen Linien zeigten mit Ausnahme von E51/3 und E51/5 keine Beeinflussung ihres Wachstums nach UV-Behandlung, was auch in allen Linien mit nicht signifikant verschiedenen GUS-Aktivitätswerten einherging. Dagegen reagierten beide *rbcS-uidA* transgenen Linien E83/1 und E83/4 nach UV-Behandlung mit einer signifikanten Verringerung der Größenzunahme, allerdings ohne signifikante Beeinflussung der GUS-Aktivität. Wieder zeigte die Linie E83/3 überhaupt keine Transgen-Aktivität.
- Ebenfalls konnte kein Einfluss einer vorher gesetzten Verletzung auf die GUS-Aktivität festgestellt werden.
- Bei einer 35S-*uidA* transgenen Linie E51/9 konnte eine nur sehr geringe GUS-Expression gemessen und somit eindeutig jeweils eine Geninaktivierung des *uidA*-Gens festgestellt werden. In früheren Untersuchungen mit dieser Linie wurde nach qualitativer GUS-Färbung von Blättern eine partielle Inaktivierung

gefunden. Es wird vermutet, dass zwischenzeitlich eine fast vollständige Geninaktivierung eingetreten ist, da die gemessenen GUS-Aktivitäten immer signifikant höher als die von nicht-transgenen Kontrollen waren.

- Dagegen zeigte die Linie E83/3 überhaupt keine GUS-Aktivität. Im Southern-Blot konnten drei Kopien festgestellt werden, was für eine Transgen-Wiederholung spricht. Da somit nach molekularen Untersuchungen diese Linie das übertragene Gen besitzt und somit als gentechnisch verändert eingestuft werden muss, wird angenommen, dass bereits kurz nach der Transformation eine Geninaktivierung eingetreten ist.
- Die in den Linien E51/9 und E83/3 gefundenen Geninaktivierungen waren bereits vor Beginn der Klimakammerexperimente eingetreten und sind somit unabhängig von den Stressbedingungen der Klimakammerversuche zu sehen. Die Inaktivierung des *uidA*-Gens ist in beiden Linien jeweils wahrscheinlich auf die spezielle Situation am Transgen-Integrationsort, nämlich das Vorliegen einer Transgen-Wiederholung, zurückzuführen. Dieses Ergebnis bestätigt entsprechende frühere Ergebnisse, die an 35S-*rolC* transgenen Pappeln beobachtet wurden. Allerdings muss auch bemerkt werden, dass bei zwei weiteren, 35S-*uidA* transgenen Linien, die ebenfalls eine Transgen-Wiederholung am Insertionsort aufweisen, keine Hinweise auf Inaktivierung des *uidA*-Gens selbst unter Stressbedingungen gefunden werden konnte.

Zusammengefasst wird festgestellt, dass die Expression fremder Gene in transgenen Pappeln nach Applikation von Stress zwischen den verschiedenen untersuchten Linien mit nur einer T-DNA Kopie variiert. Gründe für die beobachteten linienabhängigen GUS-Expressionsmuster können der unterschiedliche Promotor (*rbcS versus 35S*) sowie jeweils verschiedene genomische T-DNA-Integrationsorte sein. Das Vorliegen einer Transgen-Wiederholung am Insertionsort (zwei T-DNA Kopien) kann, muss aber nicht zwingend zu einer Inaktivierung des Transgens führen.