# Etablierung eines Transformationssystems
# und
# gentechnische Ansätze zur Verbesserung der Pilzresistenz
# von Perlhirse (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.)

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biochemie/Molekularbiologie
der Universität Hamburg

Vorgelegt von

**Maram Girgi**

aus Damaskus/Syrien

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor. Dr. H. LÖRZ
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. SCHÄFER

Tag der Disputation: 04. Juli 2003

Hamburg, den 17. Juni 2003

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

**Inhaltsverzeichnis** I

**Abkürzungsverzeichnis** IV

**Einheiten und Größenordnungen** V

**1. Einleitung** 1
1.1. Bedeutung von Perlhirse (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) 1
1.1.1. Pathogene der Perlhirse 2
1.2. Grundlagen der Pathogen-Wirt Interaktion 3
1.2.1. Abwehrmechanismen der Pflanze 5
1.2.1.1. Die vorgebildeten Abwehrmechanismen 5
1.2.1.2. Die induzierbaren Abwehrmechanismen 6
1.3. Genetische Transformation 11
1.4. Gentechnische Ansätze zur Verbesserung der Pilzresistenz 14
1.4.1. Antimikrobielle Proteine aus nicht pflanzlichen Organismen 15
1.4.2. Synthetische Peptide mit antimikrobieller Wirkung 16
1.5. Ziel dieser Arbeit 18

**2. Material und Methoden** 19
2.1. Pflanzengenotypen und Anzuchtbedingungen 19
2.2. Pflanzenmedien 19
2.2.1. Medien für die Gewebekultur von Perlhirse 19
2.2.2. Medien für die Transformation 19
2.3. Plasmide 20
2.4. Oligonukleotide 21
2.5. Etablierung eines Transformationssystems für Perlhirse 22
2.5.1. Parameter für den Partikelbeschuss von Perlhirse 22
2.6. Etablierung einer *in vitro* Suspensionskultur für Perlhirse 23
2.7. Histochemischer GUS-Assay 23
2.8. Molekularbiologische Arbeiten 23

| | | |
|---|---|---|
| 2.8.1. | Extraktion genomischer DNA aus Perlhirse | 23 |
| 2.8.2. | Digoxigenin-Markierung der DNA-Sonden | 24 |
| 2.8.3. | Southern-Blot Analyse | 24 |
| 2.8.4. | RNA-Isolierung | 24 |
| 2.8.5. | RT-PCR Analyse | 24 |
| 2.9. | Phytopathologische Analysen | 25 |
| 2.9.1. | Anzuchtbedingungen von *Pyricularia grisea* | 25 |
| 2.9.2. | Wachstumsinhibition von *Pyricularia grisea* | 25 |
| 2.9.3. | Anzuchtbedingungen von *Puccinia substriata* | 25 |
| 2.9.4. | *In vitro* Infektion von Blattsegmenten mit *Puccinia substriata* | 26 |
| **3.** | **Ergebnisse** | 27 |
| 3.1. | Klonierung des Vektors pubi.leapep20 | 27 |
| 3.2. | Optimierung der Transformationsparameter | 29 |
| 3.2.1. | Transiente Transformation von Perlhirse | 29 |
| 3.2.2. | Einfluss der osmotischen Vorbehandlung auf die Kallusbildung | 30 |
| 3.2.3. | Ermittlung des geeigneten Selektionsdrucks | 31 |
| 3.3. | Stabile Transformation von Perlhirse | 33 |
| 3.3.1. | Kulturbedingungen für die Transformation | 33 |
| 3.3.2. | Verwendete Konstrukte und Transformationsraten | 34 |
| 3.3.3. | Molekulare Analyse der transgenen Pflanzen | 36 |
| 3.3.3.1. | Nachweis des *pat*- bzw. *gus*-Gens in den Linien B1, B2, M1 und 701 | 36 |
| 3.3.3.2. | Untersuchung der GUS-Expression in den Linien B1, B2, M1 und 701 | 39 |
| 3.3.3.3. | Nachweis des *afp*-Gens in den Linien B1, M1 und 701 | 40 |
| 3.3.3.4. | Nachweis des *leapep20*-Gens in den Linien 70L1 und 70L2 | 42 |
| 3.3.3.5. | Segregation des *pat*-Selektionsmarkergens in der $T_1$-Generation | 43 |
| 3.3.3.6. | Selektion homozygoter $T_2$-Linien | 44 |
| 3.4. | Transkriptionsanalysen der antifungalen Gene | 44 |
| 3.4.1. | Transkriptionsanalyse des *afp*-Gens in den Linien B1, M1 und 701 | 44 |
| 3.4.2. | Transkriptionsanalyse des *leapep20*-Gens in den Linien 70L1 und 70L2 | 45 |
| 3.5. | Phytopathologische Untersuchungen | 46 |
| 3.5.1. | Wachstumsinhibition von *Pyricularia grisea* | 47 |
| 3.5.2. | *In vitro* Infektion von Blattsegmenten mit *Puccinia substriata* | 48 |
| 3.6. | Etablierung einer regenerationsfähigen *in vitro* Suspensionskultur | 53 |

3.6.1. Pflanzenregeneration aus der Suspensionskultur 55
3.6.2. Vergleich der Regenerationssysteme 59

**4. Diskussion** 60
4.1. Genetische Transformation von *Pennisetum glaucum* 60
4.1.1. Optimierung der Transformationsparameter 60
4.1.2. Aktivität und Vererbung der inserierten Gene 64
4.1.3. Effizienz des Transformationssystems 68
4.2. Etablierung einer regenerationsfähigen *in vitro* Suspensionskultur 71
4.3. Phytopathologische Untersuchungen 73
4.4. Ausblick 77

**5. Zusammenfassung** 79

**6. Literatur** 80

**7. Anhang** 101

**Danksagung**

**Lebenslauf**

**Abkürzungsverzeichnis:**

| | |
|---|---|
| 2,4-D | 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure |
| Abb. | Abbildung |
| *Ag*-AFP | Antifungales Protein aus *Aspergillus giganteus* |
| *Avr*-Gen | Avirulenzgen |
| BAP | 6-Benzylaminopurin |
| *CaMV* | *Cauliflower mosaic virus* |
| *c*DNA | *complementary* DNA |
| DIG | Digoxygenin |
| *f. sp.* | *forma specialis* |
| FAO | *Food and Agriculture Organization of the United Nations* |
| GRP | Glycinreiche Proteine |
| HPRG | Hydroxyprolinreiche Glykoproteine |
| *HR* | *Hypersensitive response* |
| *ICRISAT* | *International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics* |
| *ISR* | *Induced systemic resistance* |
| *JA* | *Jasmonic acid* |
| *LRR* | *Leucine rich repeat* |
| *MAR* | *Matrix attachment regions* |
| *MIC* | *Minimal inhibitory concentration* |
| *m*RNA | *messenger* RNA |
| *NBS* | *Nucleotide binding site* |
| *ori* | *origin of replication* |
| *pat*-Gen | Phosphinotrizin-Acetyltransferase Gen |
| *PIG* | *Partikel inflow gun* |
| PRP | Prolinreiche Proteine |
| *PR*-Proteine | *Pathogenesis related proteins* |
| *PTGS* | *Posttranscriptional gene silencing* |
| *RdDM* | *RNA directed DNA methylation* |
| *R*-Gen | Resistenzgen |
| *RIGS* | *Repeat induced gene silencing* |
| *RIP* | *Ribosome inctivating proteins* |
| *ROS* | *Reactive oxygen species* |
| *SA* | *Salicylic acid* |
| *SAR* | *Systemic aquiered resistance* |
| *SARI* | *Savannah African Research Institute* |
| STABW | Standard Abweichung |
| $T_0$ | Direktes transgenes Regenerat |
| $T_1$ | Generation, die aus Selbstung der $T_0$ entstanden ist |
| $T_2$ | Generation, die aus Selbstung der $T_1$ entstanden ist |
| *TGS* | *Transcriptional gene silencing* |
| *ubi*1-Promotor | Ubiquitin1-Promotor |
| *uid*A, *gus*-Gen | β-Glukuronidase Gen |
| Wt | Wildtyp |
| X-Gluc | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glukuronsäure |

Weitere Abkürzungen sind direkt im Text erklärt.

**Einheiten:**

| | |
|---|---|
| °C | Grad Celsius |
| bp | Basenpaare |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| kb | Kilobasen |
| l | Liter |
| m | Meter |
| M | Molar |
| min | Minute |
| Os | Osmol |
| psi | *Pounds per square inch* |
| rpm | *Rounds per minute* |
| u | *Units* |

**Größenordnungen:**

| | | |
|---|---|---|
| n | nano | $10^{-9}$ |
| µ | mikro | $10^{-6}$ |
| m | milli | $10^{-3}$ |
| c | zenti | $10^{-2}$ |
| k | kilo | $10^{3}$ |

Alle Maßeinheiten wurden nach dem SI-System „Systeme International d'Unites, 1969" verwendet.

# 1. Einleitung

## 1.1. Bedeutung von Perlhirse (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.)

Perlhirse gehört zu den wichtigsten Kulturpflanzen und steht heute in der Ertragsproduktion unter den Getreidearten an sechster Stelle. Weltweit wurden 1998 auf einer Anbaufläche von 25 Millionen Hektar 29 Millionen Tonnen produziert (FAO, 1998). Bereits vor 4000 Jahren wurde Perlhirse in Afrika in den Gebieten der heutigen Sahara kultiviert und von dort aus über Ostafrika nach Asien verbreitet (*Board on Science and Technology for International Development, USA*, 1996). Heute stellt Perlhirse eine der wichtigsten Nahrungsquellen für ca. 500 Millionen Menschen dar, die hauptsächlich in den niederschlagsarmen Regionen Indiens und Afrikas leben (Allouis *et al.*, 2001).

Perlhirse ist ein Sommergetreide, das in Höhenlagen zwischen 800 und 1800 m und in Gebieten mit einer durchschnittlichen Niederschlagsmenge von 125-900 mm/Jahr wächst. Unter allen kultivierten Getreidearten ist Perlhirse am besten an Hitze und Trockenheit adaptiert und besitzt eine hohe Toleranz gegenüber nährstoffarmen, sandigen und durch niedrige pH-Werte und hohe Salzkonzentrationen belastete Böden (FAO, 2000).

*Pennisetum glaucum*, auch *Pennisetum americanum* genannt, ist ein monokotyles, diploides C4-Gras mit 7 Chromosomen (2n = 14) und einer Genomgröße von $3{,}8 \times 10^8$ bp, welches zur Familie der Süßgräser (*Gramineae*) gehört. Eng verwand mit der Perlhirse sind die Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*) und Mais (*Zea mays*) (FAO, 2000).

Das Perlhirsekorn, dessen Nährwert im Vergleich zu anderen Getreidearten auffallend hoch ist, wird in verschiedenen Formen verwendet. Es wird geröstet, gekocht oder zu Grieß und Mehl verarbeitet. Aus einigen Sorten wird auch Bier gebraut. 70% des Korntrockengewichtes bestehen aus Stärke, 16% aus Proteinen, wobei der Anteil essentieller Aminosäuren besonders hoch ist. Das Protein Gluten ist in Perlhirse nicht vorhanden. Gluten trägt zwar zur Verbesserung von Backeigenschaften bei, löst aber bei entsprechend veranlagten Menschen die Autoimmunkrankheit Zöliakie aus. Der Fettgehalt im Korn beträgt 5-7% und ist höher als bei den meisten anderen Getreidearten, so dass der Energiewert des Korns insgesamt sehr gut ist. Bei einer sonst durchschnittlichen Vitamin- und Mineralstoffzusammensetzung zeichnet sich Perlhirse durch besonders hohe Vitamin A, Kalzium- und Eisenwerte aus. Außerdem stellt Perlhirsestroh einen wichtigen Bau- und Brennstoff dar (*Board on Science and Technology for International Development, USA*, 1996).

Die Linderung von Hungersnöten stellt in den kommenden Jahrzehnten eine Herausforderung für die Weltpolitik und die internationale Landwirtschaft dar. Die Verwirklichung des Ziels,

allen Menschen Nahrungsmittel in ausreichender Menge zu bieten, wird trotz moderner wirtschaftlicher und wissenschaftlicher Verfahren immer schwieriger. Die Weltbevölkerung wird in den nächsten Jahrzehnten jährlich um 70-80 Millionen wachsen. Dies wird die aktuelle Zahl der Erdeinwohner bis zum Jahre 2020 um ein Drittel erhöhen (Nösberger *et al*., 2001). Dabei findet 97% dieses Wachstums in den Entwicklungsländern, die hauptsächlich in den trockenen Regionen der Erde liegen, statt. Heute leiden bereits 800 Millionen Menschen unter Hungersnöten, 2 Milliarden Menschen sind unter- und mangelernährt. Die Bevölkerungsexplosion in diesen Regionen führt dazu, dass immer mehr für die Landwirtschaft taugliche Gebiete von den Menschen bewohnt werden und somit nicht mehr für den Anbau genutzt werden können. Hinzu kommen die Auswirkungen der globalen Klimaveränderungen, die unter anderem die Ausbreitung der Wüstengebiete unterstützten. Deswegen ist eine Steigerung der Nahrungsproduktion, besonders in den betroffenen Gebieten, notwendig. Diese Tatsache hebt die Bedeutung von Perlhirse auf Grund ihrer Toleranz gegenüber Hitze und Trockenheit an (*Board on Science and Technology for International Development, USA*, 1996).

### 1.1.1. Pathogene der Perlhirse

Unter den phytopathologischen Mikroorganismen stellen Pilze eine der wichtigsten Gruppen von Krankheitserregern im Pflanzenreich dar (Knogge, 1996). Im Jahr 1846 löste z. B. die Kartoffelfäule in Irland eine Hungerkatastrophe aus, der mehr als eine Million Iren zum Opfer fielen. Der Erreger, *Phytophthora infestans*, verursacht auch heute immer wieder Epidemien in verschiedenen Ländern der Welt (Hammond-Kosack und Jones, 2000).

Heute sind ungefähr 150000 Pilzarten bekannt, von denen weniger als 10% in der Lage sind, Pflanzen erfolgreich zu infizieren. Ein Großteil der höheren Pflanzen ist gegen die meisten potentiellen Pathogene resistent. Demnach ist ein Befall mit anschließender Erkrankung eher die Ausnahme und nicht die Regel (Elstner *et al*., 1996; Knogge, 1996).

Obwohl sich Perlhirse durch viele natürliche Resistenzen auszeichnet, ist sie anfällig für verschiedene Krankheiten, die durch Infektion mit Pilzen entstehen. Produktionseinbußen weckten das Interesse an der Erforschung von Krankheiten bei Perlhirse (Wilson, 2000).

*Sclerospora graminicola* gehört zu den wichtigsten pathogenen Pilzen von Perlhirse (Shetty *et al*., 2001; Kumar *et al*., 1993; Umesha *et al*., 2000). Dieses Oomyzet, wie auch *P. infestans*, ist der am meisten verbreitete Pilz, der Perlhirse in Afrika und Asien befällt. Die Erkrankung von Perlhirse am falschen Mehltau wurde erstmals 1907 in Indien berichtet. Heute ist der

Erreger in mindestens 20 Ländern verbreitet und verursacht jährlich Ertragsverluste von 10-60% (Singh *et al*., 1993).
Außer dem oben beschriebenen falschen Mehltau wird Perlhirse von diversen anderen Pilzen befallen. *Puccinia substriata*, der Verursacher von Rost sowie *Pyricularia grisea,* auch als *Magnaporthe grisea* bekannt, Auslöser der Blattfleckenkrankheit (*Pyricularia leaf spot*) sind Beispiele potentieller Krankheitserreger, deren Bekämpfung einen wichtigen Platz in den Perlhirseanbaugebieten einnimmt (Wilson, 2000).

### 1.2. Grundlagen der Pathogen-Wirt Interaktion

Pflanzen müssen sich andauernd gegen Befall durch Mikroorganismen, Insekten und sogar andere Pflanzen schützen. Phytopathogene Organismen besitzen häufig raffinierte Mechanismen ihre Wirtspflanze zu besiedeln. Als Reaktion darauf entwickelten Pflanzen im Laufe ihrer Evolution komplexe Abwehrmechanismen.
Die Immunität der Pflanze kann im einzelnen verschiedene Ursachen haben. Der Erreger muss bestimmte Barrieren überwinden, um eine Pflanze erfolgreich zu infizieren. Diese unterschiedlichen Barrieren bzw. Mechanismen fasst man unter dem Begriff Basisinkompatibilität oder Basisresistenz zusammen. Kommt es zum Befall einer Pflanze, so kann der Erreger unter Einsatz mehrerer Pathogenitätsfaktoren die Basisresistenz überwinden und Krankheitssymptome bei der Pflanze erzeugen. Dieses Verhältnis zwischen dem Pathogen und der Wirtspflanze wird wiederum als die Basiskompatibilität bezeichnet. Zwischen diesen beiden Extremfällen der Basiskompatibilität und Basisinkompatibilität gibt es alle möglichen Abstufungen der Immunität. Der Unterschied zwischen einer resistenten und einer anfälligen Rasse besteht häufig nur in der Geschwindigkeit der Abwehrreaktionen. Bei den gegen ganz bestimmte Pathogene gerichteten Abwehrvorgängen kann man erneut zwischen zwei Formen unterscheiden: Der nicht-rassenspezifischen bzw. horizontalen Resistenz und der rassenspezifischen bzw. vertikalen Resistenz. Die horizontale Resistenz richtet sich gegen sämtliche Mutanten oder Rassen einer Pathogenspezies, während durch die vertikale Resistenz einzelne, ganz bestimmte Rassen abgewehrt werden (Prell, 1996).

Die rassenspezifische Resistenz gilt als die am besten verstandene Pathogen-Wirt Interaktion. Deren genetische Grundlagen wurden bereits in den 40er Jahren von Flor untersucht und in der Gen-für-Gen Hypothese postuliert. Die Gen-für-Gen Hypothese wurde am Flachs/Flachsrost-Pathosystem etabliert. Genetische Untersuchungen der Vererbung der Rostresistenz bei Flachs ergaben, dass der Ausgang einer Pathogen-Wirt Interaktion durch ein

Paar komplementärer Gene, das Resistenzgen (*R*-Gen) des Wirts und das Avirulenzgen (*Avr*-Gen) des Erregers, bestimmt wird (Flor, 1947; 1971). Sind beide Gene bei Wirt und Erreger vorhanden, kommt es zu einer inkompatiblen Interaktion und das Pathogen wird in seinem Wachstum begrenzt. Durch Fehlen oder Veränderung eines oder beider Gene können die *Avr*-Genprodukte vom Wirt nicht mehr erkannt werden, es kommt zur Infektion (Ellis *et al.*, 2000a).

Die *R*-Gene befähigen die Pflanze, die Avirulenzfaktoren des Erregers spezifisch zu erkennen und die Immunantwort in Gang zu setzen (Toyoda *et al*., 2002). Heute sind bereits *R*-Gene aus verschiedenen mono- und dikotylen Pflanzen charakterisiert. Tomatenpflanzen, die die *R*-Gene *Cf4* bzw. *Cf9* exprimieren, entwickeln eine starke Abwehrreaktion nach Infektion mit Rassen des Erregers *Cladosporium fulvum*, die die korrespondierenden *Avr*-Gene *AVR4* und *AVR9* besitzen (Hennin *et al.*, 2001; De Wit, 1997). Ebenfalls wird die Resistenz von Gerste gegen den Rostpilz *Puccinia graminis tritici* durch das Vorhandensein des *R*-Gens *Rpg1* vermittelt (Horvath *et al.,* 2003).

Die Produkte von *R*-Genen sind divers, zeigen aber trotz der unterschiedlichen Sequenzen einheitliche Strukturen. Die meisten kodierten Proteine weisen eine nukleotidbindende Domäne (*NBS, nucleotide binding site*) und eine leucinreiche Region (*LRR, leucine rich repeat*) auf (Young, 2000; Ellis *et al*., 2000b). Die bisher charakterisierten *R*-Gene werden in fünf Klassen zusammengefasst: Intrazelluläre Proteinkinasen, Proteinkinasen mit einer extrazellulären *LRR*-Domäne, intrazelluläre *LRR*-Proteine mit einer *NBS*-Domäne oder einem *leucin zipper* Motiv, intrazelluläre *LRR-NBS*-Proteine mit Ähnlichkeit zum Toll/Interleukin1-Rezeptor und membrangebundene *LRR*-Proteine (De Wit, 1997; Michelmore, 2000). Der genaue Mechanismus der Erkennung der *Avr*-Genprodukte und der anschließenden Aktivierung der Immunantwort ist noch nicht aufgeklärt. Die extrazellulären *LRR* Sequenzen spielen jedoch eine Rolle bei der Protein-Protein Interaktion und könnten für die Erkennung von *Avr*-Proteinen verantwortlich sein. Die intrazellulären *R*-Proteine weisen weder Signalpeptide noch Transmembrandomänen auf. Vermutlich werden sie durch Interaktion mit anderen Proteinen zur Membran gebracht, wo dann die Erkennung des Pathogens erfolgt. Zusätzlich deuten die Ähnlichkeit einiger *R*-Proteine zu den Toll/Interleukin1-Rezeptoren von Insekten und Säugetieren und die Proteinkinasedomänen auf eine Rolle bei der Signaltransduktion zur Aktivierung der Immunantwort hin (Martin, 1999).

Im Vergleich zu den *R*-Genen ist über die genaue Funktion der *Avr*-Faktoren wenig bekannt. Inzwischen sind einige *Avr*-Gene kloniert und analysiert. Jedoch lassen sich aus den erhaltenen Sequenzen keine Merkmale ableiten, die auf eine ähnliche Funktionsweise

hindeuten (Ellis *et al.*, 2000a). Einige *Avr*-Gene aus phytopathogenen Pilzen wurden charakterisiert. Die *Avr*-Gene *AVR4* und *AVR9* aus dem Tomatenpathogen *C. fulvum* und das *NIP1* Gen des Gerstenpathogens *Rhyncosporium secalis* kodieren cysteinreiche Proteine, die später prozessiert werden. Die aktiven Proteine lösen vermutlich selbst bei Pflanzen die Abwehrmechanismen aus (Knogge, 1996). Das *AVR-YAMO* Gen aus *Magnaporthe grisea* zeigt Homologien zu Zink-Proteasen. Diese Protease könnte aus pilzlichen oder pflanzlichen Vorläufermolekülen Bestandteile freisetzen, die dann die Abwehrreaktion stimulieren (De Wit, 1997).

Heute gehen Wissenschaftler davon aus, dass ein strenges Gen-für-Gen Modell der Interaktion nur eine vereinfachte Darstellung ist, und dass mehrere Gene an der Erkennung und Verteidigung beteiligt sein können (Mitchell-Olds und Bergelson, 2000).

Mit gentechnischen Ansätzen können durch Übertragung von *R*-Genen anfällige in resistente Pflanzen umgewandelt werden, welches von großer Bedeutung für die landwirtschaftliche Züchtung ist. So konnte z. B. bei einer gegen Rost suszeptiblen Gerstensorte nach Transformation des *R*-Gens *Rpg1* aus resistenten Sorten eine erhöhte Resistenz nachgewiesen werden (Horvath *et al.*, 2003).

Die *R-/Avr*-Gen Interaktion könnte zur Verbesserung der Pilzresistenz von Pflanzen ebenfalls zu Nutze gemacht werden. Die Injektion des *AVR9* Genprodukts in Tomaten bzw. Rapspflanzen, die das *R*-Gen *Cf9* exprimieren, führte zur Entwicklung einer Abwehr nach Pilzbefall (Hennin *et al.*, 2001). In dem von De Wit vorgeschlagenen Zwei-Komponenten Sensorsystem werden *Avr*-Gene in Pflanzen transformiert, die die entsprechenden *R*-Gene besitzen. Die pathogeninduzierte Expression kann zur Aktivierung von Verteidigungsmechanismen der Pflanze und somit zu einer gesteigerten Resistenz führen (De Wit, 1992).

### 1.2.1. Abwehrmechanismen der Pflanze

Pflanzen verfügen über eine Reihe vorgebildeter und induzierbarer Abwehrmechanismen, mit deren Hilfe sie das Eindringen bzw. das Wachstum des Pathogens verhindern oder verlangsamen können. Diese Mechanismen laufen versetzt in mehreren Stufen ab und können auf diese Weise eine wirksame Schutzkette gegenüber den meisten Pathogenen bilden.

#### 1.2.1.1. Die vorgebildeten Abwehrmechanismen

Alle Oberflächenbeschaffenheiten einer Pflanze, die den Erreger am Eindringen hindern können, werden mit dem Begriff strukturelle Resistenz zusammengefasst. Die Epidermis stellt

die erste mechanische Barriere dar, die der Erreger durchdringen muss (Prell, 1996). So bewirken lipophile Oberflächen, wie z. B. Wachse, das Abrollen von Wassertropfen, die möglicherweise Sporen des Erregers enthalten. Die Anzahl der Stomata spielt bei der präformierten Resistenz ebenfalls eine Rolle, da einige Krankheitserreger durch diese Öffnungen in die Wirtspflanze gelangen. Zusätzlich sind bei einigen Pflanzenrassen fungitoxische Substanzen in der Kutikula eingelagert, die für die Pathogenabwehr wichtig sind (Elstner *et al.*, 1996).

Neben der strukturellen Resistenz verfügt die Pflanze über vorgebildete Inhaltsstoffe, die beim Abwehr von Erregern mitwirken.

Die Vakuole der Pflanzenzellen kann fungitoxische Substanzen beinhalten, die in gebundener Form als Glykoside vorliegen. Erst nach Angriff eines Erregers werden sie in das Zytoplasma entlassen und mittels β-Glykosidasen in die aktive Form umgewandelt. Zu diesen Stoffen gehören die Laktone und Hydroxykarbonsäuren, Phenole und ihre Derivate, Saponine, cyanogene Glykoside, Schwefelverbindungen, Acetophenone und die Stilbene (Hammond-Kosack und Jones, 2000).

#### 1.2.1.2. Die induzierbaren Abwehrmechanismen

Für eine erfolgreiche Resistenz müssen die Pflanzen zunächst das angreifende Pathogen wahrnehmen. Dies geschieht durch so genannte Elicitoren. Die Erkennung der Elicitoren durch spezifische Proteine der Pflanzen löst die verschiedenen Abwehrmechanismen aus, die durch endogene Signale reguliert werden und anschließend zur Etablierung einer systemischen Resistenz führen können.

**Erkennung des Pathogens**

Die Aktivierung von Abwehrmechanismen in der Pflanzen beginnt mit der Erkennung des Pathogens durch Substanzen, die als exogene Elicitoren bezeichnet werden. Zu diesen Elicitoren gehören unter anderem Komponenten der Pathogenzellwand, wie beispielsweise Oligosaccharide, Glykoproteine und Peptide, die während der Infektion freigesetzt werden, mit pflanzlichen Rezeptoren interagieren und so die Aktivierung von Abwehrmechanismen bei der Pflanze bewirken (Elstner *et al.*, 1996; Hahn, 1996). Zusätzlich werden die Abwehrmechanismen durch endogene Elicitoren, welche Bestandteile der pflanzlichen Zellwand sind, aktiviert (Agrios, 1994).

**Frühe und lokale Reaktionen auf eine Infektion**

Die Erkennung des eindringenden Erregers verursacht unmittelbare Veränderungen im Stoffwechsel der Pflanze. Zu den ersten Reaktionen auf Elicitoren zählen Veränderungen in den Ionenflüssen von infizierten Zellen. In Suspensionskulturen von Petersilie beobachtet man beispielsweise an der Plasmamembran bereits 2 Minuten nach Behandlung mit Elicitoren einen Einstrom von $Ca^{2+}$ und $H^+$ und einen Ausstrom von $K^+$ und $Cl^-$ Ionen. Mutanten, deren $Ca^{2+}$ Kanäle blockiert sind zeigen eine höhere Anfälligkeit für Pathogenbefall, was auf eine Rolle von $Ca^{2+}$ Ionen in der Signalübertragung zur Aktivierung der Abwehrmechanismen hindeutet (Yang *et al*., 1997).

Mit der Veränderung der Ionenflüsse geht die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*ROS*, *reactive oxygen species*) einher. Diese Reaktion wird als *oxidative burst* bezeichnet. Zu den typischen *ROS* Molekülen gehören das Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$, aus dem spontan oder katalysiert durch das Enzym Superoxiddismutase Wassertoffperoxid $H_2O_2$ entsteht. $H_2O_2$ bildet in Anwesenheit von Eisen das stark reaktive Hydroxylradikal $OH^{\cdot}$, welches auf das Pathogen direkt toxisch wirken kann (Hammond-Kosack und Jones, 2000; Mellersh *et al*., 2002).

Auf die Penetration von Pilzen reagiert die Pflanze oft mit einer induzierten Zellwandverdickung um die Eintrittsstelle herum, der sogenannten Papillenbildung. Papillen bestehen hauptsächlich aus Kallose, einem β-1,3-Glukan, welches zwischen Zellwand und Plasmamembran unterhalb des Appressoriums eingelagert wird (Hammond-Kosack and Jones, 1996).

Als Schutzmechanismus nach einer Infektion werden die Zellwände von Pflanzenzellen zusätzlich durch Einlagerung von Lignin verstärkt (Baucher *et al.*, 1998). Lignin wird in der Pflanze nach Verwundung und auch in Folge einer Infektion gebildet und kann durch die meisten Mikroorganismen nicht abgebaut werden (Kirk, 1971). Durch die Lignifizierung kann die Pflanzenzelle dem mechanischen Druck und der enzymatischen Degradation durch das Pathogen standhalten. Außerdem können durch die zusätzliche Barriere Toxine des Erregers nicht in die Pflanze eindringen und die Nahrungsaufnahme des Pathogens von der Pflanze wird erschwert (Vance *et al*., 1980).

Die Löslichkeit der Zellwand wird zusätzlich durch Vernetzung von Strukturproteinen herabgesetzt, und somit widerstandsfähiger gegen zellwanddegradierende Enzyme des Erregers gemacht. Die hydroxyprolinreichen Glykoproteine (HPRG), die prolinreichen Proteine (PRP) und die glycinreichen Proteine (GRP) sind Bestandteile der pflanzlichen Zellwand. Ausgelöst durch Elicitoren und $H_2O_2$ werden diese Proteine enzymatisch durch

Peroxidasen miteinander vernetzt, ein als $H_2O_2$-vermittelte oxidative Vernetzung bezeichneter Vorgang (Bradley *et al*., 1992; Brisson *et al*., 1994).

Die Induktion des *oxidative burst* stellt eine der Möglichkeiten dar, die Resistenz einer Pflanze gezielt zu steigern. Dieses ist von besonderer Bedeutung, da hier der Erreger im Anfangsstadium der Infektion an seiner Verbreitung gehindert wird. Durch genetische Manipulation kann die Expression von Oxidasen in suszeptiblen Pflanzen zu einer Verstärkung der Zellwände führen. So konnte z. B. die Expression der Oxalat-Oxidase aus Weizen in der Sojabohne eine gesteigerte $H_2O_2$ Produktion und folglich eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Pilz *Sclerotina sclerotiorum* bewirken (Donaldson *et al.*, 2001).

**Signalübertragung und Etablierung der systemischen Resistenz**

Die Infektion von Pflanzen durch Mikroorganismen löst eine Abwehrreaktion aus, deren Tragweite von sehr mild bis zu sehr stark reicht. Die hypersensitive Reaktion (*HR, hypersensitive response)* ist jedoch der stärkste Resistenzmechanismus, den eine Pflanze in inkompatiblen Interaktionen zeigt (Linthorst, 1991; Heath, 1997b). Sie äußert sich in einer schnellen Abtötung der vom Pathogen befallenen Pflanzenzellen. Als Folge dieses programmierten Zelltodes verliert das Pathogen die Nahrungsquelle und wird von einer zusätzlichen Barriere abgestorbener Pflanzenzellen eingeschränkt (Heath, 1997a). Nach Erkennung von *Avr*-Faktoren des Pathogens durch die Produkte von *R*-Genen werden die Signaltransduktionswege angeschaltet, die zu diesem programmierten Zelltod führen (Silva *et al.*, 2002; Kamoun *et al.*, 1999; Shirasu und Schulze-Lefert, 2000). Die *HR* wird in Folge einer Infektion nach Akkumulation von *ROS* Molekülen, wie z. B. $H_2O_2$, induziert (Tiwari *et al.*, 2002; Heath, 1997a).

Durch die *HR* wird die Expression diverser Gene und die Synthese von antimikrobiellen Substanzen induziert. Die Regulierung und Koordination dieser Expression wird durch bestimmte Signalmoleküle gewährleistet (Wong *et al*., 2002; Davis *et al*., 2002). Zu diesen Signalüberträgern gehören Salizylsäure (*SA, salicylic acid*), Jasmonsäure (*JA, jasmonic acid*) und Ethylen (Ton *et al*., 2002).

Zu den Eigenschaften einer *HR* gehört die Induktion einer systemischen Resistenz in Pflanzengeweben, welche keinen direkten Kontakt zum Pathogen hatten. Pflanzen, die durch eine Infektion hypersensitiv reagierten, weisen ebenfalls zu späteren Zeitpunkten und gegen andere Erreger eine Resistenz auf (Heath, 1997a; Hammond-Kosack und Jones, 2000). Dieser Vorgang wird als systemisch erworbene Resistenz (*SAR, systemic aquiered resistance*) bezeichnet (Ryals *et al.,* 1994). *SA* ist an der Induktion der *SAR* beteiligt und spielt eine Rolle

bei der Übertragung der Signale in die Umgebung der Infektionsstelle und in entferntes Gewebe. Die exogene Anwendung von *SA* führt auch zur Aktivierung der *SAR* und zur Bildung von so genannten *PR*-Proteinen (*pathogenesis related proteins*) (Lawton *et al*., 1996; Davis *et al*., 2002).
Die induzierte systemische Resistenz (*ISR, induced systemic resistance*) wird im Gegensatz zur *SAR* nicht nach Pathogenbefall etabliert. Die *ISR* verleiht den Pflanzen Resistenz gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen und wird durch bestimmte Stämme von Rhizobakterien induziert. Die *ISR* wird durch *JA* und Ethylen reguliert und aktiviert, im Unterschied zur *SAR*, nicht die Expression von *PR*-Proteinen (Ton *et al*., 2002; Conrath *et al*., 2002).

Zu den antimikrobiell wirkenden Substanzen, die nach der Infektion gebildet werden, gehören die Phytoalexine, die einen wichtigen Bestandteil der pflanzlichen Abwehrmechanismen darstellen. Phytoalexine sind niedermolekulare Verbindungen, die über Wege des Sekundärstoffwechsels entstehen. Nach einer Infektion werden Phytoalexine lokal gebildet, wo sie dann ihre antimikrobielle Wirkung entfalten (Dixon, 2001). Inzwischen sind Phytoalexine bei vielen Pflanzenfamilien charakterisiert. Flavonoide und Isoflavonoide sind eine Gruppe von Phytoalexinen, die sich vom Phenylpropanoid-Stoffwechselweg ableiten. Beispielsweise sind Pterocarpans, Maackiain und Pisatin Isoflavonoide, die der Erbse eine antifungale Wirkung gegen den Pilz *Nectria haematococca* verleihen (Dixon und Steele, 1999). Resistente Sorten der Sojabohne antworten auf die Infektion mit *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* mit der Akkumulation des Phytoalexins Glyceollin (Graham und Graham, 1996).
Phytoalexine können in gentechnischen Ansätzen zur Verbesserung der Resistenz eingesetzt werden. Die Expression des aus der Weinrebe isolierten Phytoalexins vom Stilbentyp Resveratrol in Tabakpflanzen erzeugte eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen mit *Botrytis cinera* (Hain *et al*., 1993). Ebenfalls führt die Expression von Pinosylvin, einem Phytoalexin aus der Waldkiefer, in Weizen zu einer signifikanten Verbesserung der Pilzresistenz (Serazetdinova, 2001).

Die Expression von *PR*-Proteinen (*PR, pathogenesis related proteins*) ist ein essentieller Bestandteil der Abwehrmechanismen in Pflanzen (Linthorst, 1991; Bol *et al*., 1990). Diese stabilen Proteine besitzen antimikrobielle Eigenschaften und sind in nichtinfizierten, ungestressten Pflanzen nicht nachzuweisen. Sie können durch *SA* als Antwort auf eine

Infektion lokal und auch systemisch induziert werden, wobei sie zur Etablierung der *SAR* beitragen (Van Loon und Van Strien, 1999). *PR*-Proteine werden ihrer Aminosäurensequenz und ihren biochemischen Eigenschaften nach in verschiedene Familien zusammengefasst (Van Loon *et al*., 1994). Inzwischen sind 14 Familien von *PR*-Proteinen klassifiziert (Van Loon und Van Strien, 1999).

Einige *PR*-Proteine besitzen enzymatische Aktivitäten, wie z. B. die β-1,3-Glukanasen, Chitinasen, Endoproteinasen und die Peroxidasen. Die antifungale Wirkungsweise vieler anderer *PR*-Proteine ist bisher ungeklärt. Unter den *PR*-Proteinen sind Chitinasen und Glukanasen gut charakterisiert. Chitinasen hydrolisieren die β-1,4-Bindungen von Chitin, einem Polymer aus N-Acetylgl-D-Glukosamin, welches ein Hauptbestandteil der Zellwand vieler Pilze ist und in der Pflanze nicht vorkommt. Ein weiterer Bestandteil der pilzlichen Zellwand ist β-1,3-Glukan. Die Anwendung von aufgereinigten Chitinasen und Glukanasen hemmte *in vitro* das Wachstum vieler phytopathogener Pilze (Bol *et al*., 1990).

Die Expression von Glukanasen und Chitinasen in anfälligen Pflanzen erwies sich in der Verbesserung der Pilzresistenz ebenfalls als erfolgreich. Beispielsweise weisen mit Chitinase und Glukanase transformierte Tabakpflanzen eine erhöhte Resistenz gegen Pilzbefall auf (Zhu *et al*., 1994). Gurkenpflanzen, die eine Chitinase aus Reis exprimieren, zeigen ebenfalls eine verbesserte Resistenz gegen Befall mit dem Pilz *Botrytis cinerea* (Kishimoto *et al*., 2002).

Pflanzen können nach einer Infektion eine Reihe kleiner, cysteinreicher Proteine synthetisieren, die einen weiteren wichtigen Bestandteil der Pathogenabwehr darstellen (Broekaert *et al*., 1997). Die *PR*-Familien 12 und 13 (Defensine und Thionine) repräsentieren die oben genannten cysteinreichen Proteine. Sie zeigen untereinander hohe Sequenz- und Strukturhomologien, die teilweise sogar bei deren Homologen aus dem Tierreich konserviert sind (Zasloff, 2002). Auf Grund ihrer geringen Größe können diese Proteine im Fall einer Infektion schnell und ohne hohen Energieaufwand gebildet werden.

Thionine sind eine Gruppe kleiner (45-47 Aminosäuren), basischer und cysteinreicher Proteine. Ihre dreidimensionale Struktur weist einen amphiphatischen Charakter auf, welcher für die toxische Wirkungsweise verantwortlich ist. Durch Wechselwirkung mit der Plasmamembran von Pathogenen kommt es zur Beschädigung und Permeabilisierung der Membran und folglich zur Zerstörung der Zelle (Garcia-Olmedo *et al*., 1998; Bohlmann, 1994; Broekaert *et al*., 1997). Thionine wurden bereits aus verschiedenen mono- und dikotylen Pflanzenarten isoliert, z. B. Viscotoxin aus *Viscum album* und α- und β-Hordothionin aus Gerste (Garcia-Olmedo *et al*., 1998).

Defensine stellen eine Gruppe kleiner (45-54 Aminosäuren), positiv geladener und cysteinreicher Proteine, die konservierte Aminosäuren aufweisen, dar. Sie sind in der Lage, das Wachstum verschiedener Mikroorganismen zu inhibieren. Die ersten Defensine wurden bei Weizen entdeckt und als γ-Purothionine bezeichnet. Strukturell sind sie aber den Defensinen zuzuordnen (Collila *et al*., 1990). Heute sind Defensine aus diversen Pflanzenspezies bekannt und charakterisiert, wie z. B. die Rs-AFP1 und Rs-AFP2 Defensine aus Rettich (Terras *et al*., 1995) und das alfAFP aus *Medicago sativa* (Gao *et al.*, 2000).

Ribosomen inaktivierende Proteine (*RIP*, *ribosome inactivating proteins*) stellen eine weitere Gruppe von Proteinen dar, die nach Infektion die Abwehrmechanismen der Pflanze unterstützen. *RIP*s sind weitverbreitete Proteine im Pflanzenreich und besitzen die Fähigkeit, die Proteinbiosynthese zu inhibieren. Ihre Toxizität beruht auf ihrer hoch spezifischen RNA N-Glykosidase Aktivität. Durch Spalten eines Adeninrests in der großen Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen wird die Bindestelle des Elongationsfaktors EF2 blockiert und die Proteinsynthese gehemmt (Stripe und Barbieri, 1986; Stripe *et al*., 1992). Unter den *RIP*s beobachtet man eine Spezifität für Ribosomen bestimmter Spezies. Es ist nur wenig über die biologische Rolle der *RIP*s bekannt. Auf Grund ihrer enzymatischen Aktivität wird den *RIP*s eine potentielle Rolle bei der Immunabwehr der Pflanze zugesprochen. *RIP*s könnten die Ribosomen des Erregers direkt inhibieren oder seine Verbreitung durch die Inaktivierung der eigenen Ribosomen verhindern. Kürzlich wurde die spezifische Inhibierung von pilzlichen Ribosomen durch *RIP*s verschiedener Pflanzen gezeigt (Park *et al*., 2002).
Des weiteren wurde gezeigt, dass die Expression des I*RIP* aus *Iris hollandica* in Tabak eine Steigerung der Resistenz gegen Infektion mit dem Tabak-Mosaik Virus bewirkte (Desmyter *et al*., 2003).

### 1.3. Genetische Transformation

Die Methoden der klassischen Züchtung sind für die Kombination und Verbesserung der gewünschten Eigenschaften seit Jahrhunderten etabliert und unentbehrlich. Dabei ist es aber nicht immer möglich, die natürlichen Merkmale, wie z. B. die Resistenzen der Wildformen, in den neuen Linien zu erhalten.
Die genetische Transformation stellt ein Instrument zur Übertragung von Nutzgenen dar. Es können Merkmale in Pflanzen eingebracht werden, die durch klassische Züchtung nur mühsam zu erreichen sind. Außerdem können durch die Insertion neuer Gene die

reproduktiven Barrieren zwischen verschiedenen Spezies überwunden werden (Campbell *et al*., 2002).

Die Grundlage für eine erfolgreiche genetische Transformation ist das Vorhandensein eines effizienten *in vitro* Regenerationssystems.

Für nahezu alle wichtigen Getreidearten existieren heute erfolgreiche *in vitro* Regenerationssysteme. Dabei können verschiedene Explantate für die Kallusinduktion und folgende Regeneration von Pflanzen eingesetzt werden. Von den vielzelligen Primärexplantaten eignen sich besonders unreife zygotische Embryonen, aber auch junge Infloreszenzen, Antheren, Blattbasen sowie Sprossmeristeme und Wurzelspitzen (Lörz *et al*., 1988).

Die Effizienz eines Regenerationssystems wird durch verschiedene Parameter beeinflusst. Der Zusatz von Phytohormonen und die Auswahl ihrer richtigen Konzentration für die Embryogenese bzw. Regeneration spielt dabei eine entscheidende Rolle. Für die pflanzliche Zell- und Kalluskultur werden hauptsächlich Auxine und Cytokine eingesetzt (Heß, 1992). Des weiteren hängt die Kompetenz zur Pflanzenregeneration vom verwendeten Genotyp, vom Ausgangsmaterial und dem allgemeinen Zustand der Spenderpflanze ab (Lörz *et al*., 1988).

Neben den Regenerationstechniken aus Primärexplantaten werden *in vitro* Kulturen basierend auf Suspensionen, Einzelzellkulturen aus Protoplasten oder Mikrosporen und Kalluserhaltungskulturen für die Regeneration von Pflanzen etabliert. Die Regeneration von Weizen- (Mejza *et al*., 1993) und Gerstepflanzen (Li und Devaux, 2003) aus Mikrosporenkulturen wurde bereits gezeigt. Ebenso konnten Pflanzen erfolgreich aus einer *in vitro* Protoplastenkultur von *Sorghum bicolor* (Sairam *et al*., 1999) sowie aus einer Mais Kalluslinie (Carvalho *et al*., 1997) regeneriert werden.

Generell stellen die Regenerate aus *in vitro* Kulturen Klone der Ausgangszellen dar, die somit erbgleich sind. Abweichungen vom Kloncharakter können allerdings in Kallus- und Suspensionserhaltungskulturen Veränderung im Geno- bzw. Phänotyp, sogenannte somaklonale Variationen, auftreten (Larkin und Scowcroft, 1981; Müller *et al*., 1990).

Diese Veränderungen werden durch die Bedingungen der *in vitro* Kultur hervorgerufen und können sich auf unterschiedliche Weise manifestieren. Somaklonale Variationen können in der Neuzüchtung genutzt werden, da sie zur Variabilität des Genpools beitragen und somit eine Quelle für die Selektion neuer Eigenschaften anbieten (Heß, 1992). Einen Nachteil stellen jedoch die neben den positiv bewerteten Mutationen häufig auftretenden unerwünschten Eigenschaften dar. Sterilität, Entstehung von Albinos und

Wachstumsanomalien sind weit verbreitete Phänomene, die generell bei *in vitro* Kulturen und besonders in Langzeiterhaltungskulturen auftreten (Larkin und Scowcroft, 1981; Heß, 1992).
Im Bezug auf Perlhirse wurde bereits 1981 von Vasil und Vasil ein Regenerationssystem aus Suspensionskulturen etabliert (Vasil und Vasil, 1981a). Über die Regeneration von Perlhirse aus jungen Blütenständen (Swedlund und Vasil, 1985), Sprossmeristem (Devi *et al*., 2000) und unreifen zygotischen Embryonen (Oldach *et al*., 2001a) wurde ebenfalls berichtet.

Die Entwicklung von Gentransfermethoden bei höheren Pflanzen begann bereits Mitte des letzten Jahrhunderts. Der Durchbruch gelang aber erst 1985 als von Horsch und Mitarbeitern eine einfache und effiziente Transformationsmethode etabliert wurde. Der durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Gentransfer macht den natürlichen Weg der Übertragung ihrer T-DNA für gentechnische Zwecke zu Nutze. Mit Hilfe der Blattscheiben-Technik wurden stabil transformierte und fertile Tabak-, Petunien- und Tomatenpflanzen erzeugt. Bei dieser Technik wird regenerationsfähiges Blattgewebe mit Agrobakterien infiziert, wobei die Gene von Interesse anstelle der T-DNA übertragen werden (Horsch *et al*., 1985). Da aber das natürliche Wirtsspektrum von *Agrobacterium tumefaciens* auf dikotyle Pflanzen beschränkt ist, konnte diese Transformationsmethode erst im Laufe der letzten Jahre mit mäßigem Erfolg auf monokotyle Pflanzen angepasst werden (Cheng *et al*., 1997; Wu *et al*., 1998).
Die stabile Integration von Fremd-DNA in das Genom von Getreide gelang erstmalig durch Protoplastentransformation. Die Regeneration transgener Pflanzen aus Protoplasten erwies sich jedoch als problematisch (Lörz *et al*., 1985). Daher mussten andere Transformationstechniken zur Übertragung von DNA etabliert werden.
Eine alternative Methode stellt die biolistische Transformation dar, bei der Gold- oder Wolframpartikel mit der zu transformierenden DNA beschichtet und durch Gasdruck beschleunigt direkt in einzelne Zellen geschossen werden. Die DNA gelangt in den Zellkern und wird dort in die genomische DNA der Pflanzen integriert (Sanford *et al*., 1987; Klein *et al*., 1987). Diese Methode des direkten Gentransfers ist vorteilhaft, da die Pflanzen nicht einem spezifischen Wirtsspektrum zugehören müssen, wie es bei der durch Agrobakterien vermittelten Transformation der Fall ist. Außerdem können die Zellen, ohne vorher die Zellwand, wie bei der Protoplastentechnik, zu entfernen direkt transformiert werden.
In anfänglichen Transformationsexperimenten wurden meistens noch Zellen von Suspensionskulturen und Langzeitkalluskulturen für die Transformation verwendet (Vasil *et al.*, 1992; Toriyama *et al*., 1988). Die Problematik bestand darin, im Allgemeinen aus diesen

Kulturen transgene Pflanzen zu regenerieren und im Besonderen die Regeneration phänotypisch und genotypisch normaler Pflanzen zu gewährleisten (Taylor und Fauquet, 2002). Diese Beobachtung führte zur Überlegung, primäre Explantate für die Transformation zu benutzen. Als mögliche primäre Explantate eignen sich Skutelli unreifer zygotischer Embryonen, da sie in größeren Mengen gewonnen werden können und eine schnelle und effiziente Regeneration von Pflanzen ermöglichen.

Im Laufe der letzten Jahre wurden mit dieser Technik verschiedene Pflanzen, darunter auch Getreidearten wie z. B. Mais (Gordon-Kamm *et al*., 1990; Brettschneider *et al*., 1997), Weizen (Becker *et al*., 1994), Reis (Chen *et al*., 1998) und Gerste (Wan und Lemaux, 1994) erfolgreich transformiert.

Die Transformationseffizienz wird durch verschiedene physikalische Parameter wie die Geschwindigkeit, Größe und Anzahl der Projektile und die DNA-Konzentration beeinflusst (Sanford *et al*., 1987). Ausschlaggebende biologische Parameter sind die Pflanzenart, das Ausgangsexplantat und seine Fähigkeit zur Regeneration, Dauer der Kultur und die verschiedenen Vorbehandlungen vor der Transformation (Klein und Jones, 1999). Die verschiedenen Parameter müssen deswegen dem jeweiligen Transformationssystem angepasst werden.

Auf dem Gebiet der genetischen Transformation besteht für Perlhirse, im Vergleich zu anderen wichtigen Getreidearten, großer Nachholbedarf. Taylor und Vasil berichteten 1991 über transiente Expression des Reportergens *uid*A in unreifen Embryonen (Taylor und Vasil, 1991). Stabile Expression von Markergenen in Kalluskulturen, die jedoch nicht regeneriert werden konnten, wurde ebenfalls publiziert (Lambé *et al*., 1995). Im Jahr 2000 wurde der erste Bericht über stabil transformierte, Hygromyzin resistente Perlhirsepflanzen veröffentlicht (Lambé *et al*., 2000).

### 1.4. Gentechnische Ansätze zur Verbesserung der Pilzresistenz

Das Eindämmen der durch Pathogenbefall verursachten Ertragsverluste ist eines der wichtigsten Ziele der Landwirtschaft. Deswegen ist die Kultivierung neuer Sorten, die neben den kommerziell wichtigen Eigenschaften wie z. B. hohem Ertrag und reichhaltigem Nährwert auch über Resistenzen gegen Mikroorganismen verfügen, von großer Bedeutung. Durch die erhöhte Widerstandsfähigkeit der Pflanzen wird der Einsatz von chemischen Pestiziden verringert, welches sich positiv auf die Umwelt und das ökologische System auswirkt.

Die gentechnischen Verfahren zur Erhöhung der Resistenz von Pflanzen sind vielfältig. Wie bereits besprochen wurde, kann die Expression von *R*-Genen, *PR*-Proteinen und Phytoalexinen zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen Pathogenbefall führen (siehe 1.2.1.2.). Im Folgenden werden zwei weitere Ansätze vorgestellt, bei denen die horizontale Resistenz von Nutzpflanzen verbessert werden kann.

### 1.4.1. Antimikrobielle Proteine aus nicht pflanzlichen Organismen

Die Produktion antimikrobieller Proteine ist nicht nur auf das Pflanzenreich beschränkt. Die Resistenz von Pflanzen kann durch Transformation von Genen nicht-pflanzlichen Ursprungs ebenfalls verbessert werden. Einige Proteine, die aus mykoparasitischen Pilzen stammen, weisen eine antifungale Wirkung auf. Pilze der Spezies *Trichoderma* und *Gliocladium* kommen in vielen Böden vor und produzieren lytische Enzyme, wie Glukanasen und Chitinasen, die antagonistisch auf andere Pilze wirken (Lorito *et al.*, 1998). Diese Mykoparasiten werden alternativ zu Pestiziden als Pflanzenschutz-Maßnahmen verwendet (Haran *et al*., 1996). Glukanasen und Chitinasen verschiedener Klassen aus *Trichoderma harzianum* und *Gliocladium virens* inhibieren *in vitro* das Wachstum des phytopathogenen Pilzes *Botrytis cinerea* (Lorito *et al*., 1994). Die Wirksamkeit dieser pilzlichen Enzyme wurde auch *in vivo* gezeigt. Transgene Apfelpflanzen, die eine Exo- und Endochitinase aus *T. harzianum* exprimieren, weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Pathogen *Venturia inaequalis* auf (Bolar *et al.*, 2001).

Bereits 1990 wurde das sekretorische Protein *Ag*-AFP in großen Mengen aus Kulturen des Schimmelpilzes *Aspergillus giganteus* isoliert. Dieses kleine basische und cysteinreiche Protein weist eine antifungale Wirkung gegen viele filamentöse Pilze auf (Nakaya *et al*., 1990; Wendt *et al*., 1994; Lacadena *et al*., 1995) und wurde deswegen für die Verbesserung der Pilzresistenz bei Pflanzen eingesetzt. Das *Ag*-AFP inhibiert *in vitro* das Wachstum vieler phytopathogener Pilze, wie z. B. *Magnaporthe grisea, Fusarium moniliforme* und *Phytophthora infestans* (Vila *et al*., 2001). Die Expression des *Ag*-AFP in transgenen Weizenpflanzen führte zu einer Verbesserung der Resistenz gegen *Erysiphe graminis* und *Puccinia recondita* (Oldach *et al.,* 2001b). Der genaue inhibitorische Mechanismus des *Ag*-AFP ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Aktuellen Untersuchungen konnten aber zeigen, dass das *Ag*-AFP mit der Plasmamembran von Pilzen interagiert und deren Permeabilisierung bewirkt (Theis *et al.*, 2003).

Weitere antifungale Peptide mit Sequenzhomologien zum *Ag*-AFP wurden aus anderen Pilzen isoliert. Das cysteinreiche, 58 Aminosäuren große Peptid *An*-AFP, welches das Wachstum

diverser Hefen und andere Pilze inhibiert, wurde beispielsweise aus *Aspergillus niger* isoliert (Gun Lee *et al*., 1999).

### 1.4.2. Synthetische Peptide mit antimikrobieller Wirkung

In den letzten Jahren wurde die antimikrobielle Wirkung von Derivaten natürlicher antimikrobieller Peptide verstärkt erforscht. Modifizierte Varianten dieser Peptide zeigen ebenfalls eine antifungale bzw. antibakterielle Wirkung, die in einigen Fällen sogar stärker war als die des ursprünglichen Proteins. Außerdem zeigen Pflanzen- und Humanzellen eine Resistenz gegen den Effekt dieser Peptide, welches ihre Bedeutung zur Bekämpfung von Mikroorganismen steigert (Matsuzaki, 1998; Dykes *et al*., 1998).

Myp30, ein synthetisches Analogon von Magainin, einem Peptid aus der Haut von Amphibien, welches eine Rolle bei ihrer Immunität spielt, hemmt *in vitro* das Wachstum verschiedener Pilze und Bakterien. Die Expression von Myp30 in Tabakpflanzen verstärkte ihre Resistenz gegen Befall durch den Oomyzeten *Peronospora tabacina* und durch das bakterielle Pathogen *Erwinia carotovora* (Li *et al*., 2001). Die Transformation von MSI-99, einem weiteren Magainin-Analogon, erhöht in Tabak die Resistenz gegen diverse pilzliche Pathogene wie *Aspergillus flavus* und *Fusarium moniliforme* (De Gray *et al*., 2001).

Wie im Fall der Magainin-Analoga weisen synthetische Derivate des Cecropins eine hohe antimikrobielle Wirkung auf. Cecropine stellen einen wesentlichen Bestandteil des Immunsystems von Insekten dar. Die meisten Cecropin-Analoga besitzen eine wachstumshemmende Wirkung auf Pilze und Bakterien *in vitro* (Cavallarin *et al*., 1998). Transgene Kartoffelpflanzen, die ein Cecropinderivat exprimieren, zeigten eine starke Resistenz gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen, darunter die phytopathogenen Pilze *Fusarium solani* und *Phytophthora cactorum* (Osusky *et al*., 2000).

Die Modifikation des synthetischen antimikrobiellen Magainin-Analogons ESF1 durch den Austausch einer einzigen Aminosäure führte zu einer deutlichen Steigerung dessen antimikrobiellen Charakters. Die Substitution von Glycin durch Arginin erhöhte den amphiphatischen Charakter des Peptids und somit seine Fähigkeit mit der Plasmamembran von Pathogenen zu interagieren (Dykes *et al*., 1998). Dieses modifizierte Peptid GR7 zeigte eine inhibierende Wirkung gegen den Pilz *Fusarium oxysporum* (Dykes *et al*., 1998). Ferner wies das auch als Pep20 bezeichnete Peptid eine *in vitro* antifungale Wirkung gegen *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani* auf (Ali und Reddy, 2000).

Die Wirkungsweise dieser Peptide ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch können diese positiv geladenen Peptide, ähnlich wie bei den Thioninen und Defensinen,

elektrostatisch mit negativ geladenen Resten in der Membran des Pathogens interagieren. Vermutlich führt dies zur Bildung von Poren und anschließend zum Austritt von Zytoplasma (Bechinger, 1999; Matsuzaki, 1998, Takei *et al*., 1999).

Alle Erkenntnisse über die Funktionsweise von antimikrobiellen Peptiden weisen darauf hin, dass sie die Permeabilisierung von Plasmamembranen bewirken (Epand *et al*., 2003; Rajasekaran *et al*., 2001; Chakrabarti *et al*., 2003). Untersuchungen der Interaktion antimikrobieller Peptide mit rekonstituierten Vesikeln zeigten, dass die Bindung an die Membran und die Formation von Poren vom Peptid/Lipid Verhältnis der Membran abhängt. Dieses Model erklärt die spezifische Wirkung einiger antimikrobieller Peptide auf bestimmte Mikroorganismen (Huang, 2000).

Basierend auf den allgemein auftretenden Sequenzen und Strukturmotiven natürlich vorkommender antimikrobieller Peptide wurden verschiedene Banken synthetischer Peptide zusammengestellt, aus denen potentielle Kandidaten ausgewählt wurden. Man beobachtet bei den verschiedenen Peptiden eine gewisse Spezifität in Bezug auf das Spektrum der Mikroorganismen. Es zeigt sich auch in der Aminosäuresequenz und der Struktur ein Grad an Konservierung, der mit der antimikrobiellen Wirkung in Zusammenhang steht.

Die Verbesserung der Resistenz von Perlhirse gegen ihr wichtigstes Pathogen *Sclerospora graminicola* stellt eines der Hauptziele bei der Entwicklung von Perlhirsesorten dar.

Inzwischen wurden Perlhirsesorten selektiert, die eine natürliche Resistenz gegen den oomyzeten Erreger des falschen Mehltaus besitzen. Diese Resistenz scheint aber nicht auf einem einzigen dominanten Gen zu beruhen (Nagarathna *et al*., 1993). Daher stellt beispielsweise die Expression des *Ag*-AFPs oder der synthetischen antimikrobiellen Peptiden in suszeptiblen Pflanzen einen alternativen Ansatz beim Pflanzenschutz dar. Ihre antifungale Wirkung, unter anderem gegen Oomyzeten wie *Phytophthora* und *Peronospora* Arten, stellt eine erfolgsversprechende Möglichkeit für ihre Bekämpfung dar, da hier die Anwendung von *PR*-Proteinen wie beispielsweise Chitinasen auf Grund des Fehlens der Zielkomponenten in ihrer Zellwand unwirksam wäre.

Außerdem könnte ihre Wirkung gegen mehrere Pathogene gerichtet sein, da sie gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen wirken können und dadurch die horizontale Resistenz verbessern.

### 1.5. Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Verbesserung der Pilzresistenz von Perlhirse durch genetische Transformation.

1. Die Etablierung eines neuen Transformationssystems für *Pennisetum glaucum* wird hier beschrieben, bei dem die biolistische Transformation als Methode zur Genübertragung angewandt wird.

2. Für die Verbesserung der Pilzresistenz werden 2 antifungale bzw. antimikrobielle Gene in Perlhirse biolistisch transformiert:

-das vom *afp*-Gen kodierte antifungale Protein *Ag*-AFP aus dem Schimmelpilz *Aspergillus giganteus* besteht aus 51 Aminosäuren, ist stark basisch und seine antifungale Wirkung gegen verschiedene filamentöse Pilze wurde bereits *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Vila *et al*., 2001; Lacadena *et al*., 1995; Oldach *et al*., 2001b).

-das vom *leapep20*-Gen kodierte synthetische Peptid Pep20 ist ein Magainin-Analogon, besteht aus 20 Aminosäuren und wurde von Ali und Reddy (2000) aus einer Peptidbank auf Grund seiner *in vitro* antimikrobiellen Wirkung ausgewählt.

Molekulare Analysen der transgenen Pflanzen auf stabile Integration des Transgens, seine Vererbung und dessen Transkription werden durchgeführt.

3. Die transgenen Pflanzen sollten auf die Verbesserung der Pilzresistenz bei *in vitro* Infektionstests untersucht werden.

4. Um die Leistungsfähigkeit der Transformation zu verbessern, wird ein neues *in vitro* Regenerationssystem für Perlhirse aus Suspensionskulturen entwickelt, welches schnell und effizient das Material für die Transformation zur Verfügung stellten kann.

# 2. Material und Methoden

## 2.1. Pflanzengenotypen und Anzuchtbedingungen

Das Saatgut von *Pennisetum glaucum* wurde von den Forschungsinstituten *SARI* (*Savannah African Research Institute*) in Ghana und *ICRISAT* (*International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics*) in Indien zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden vier Genotypen für die Etablierung des Transformationssystems eingesetzt:
Bongo Nara, Manga Nara (*SARI*), 7042 und 841B (*ICRISAT*).
Die Anzucht des Pflanzenmaterials erfolgte im Gewächshaus unter Standardbedingungen mit 16/8 h Tag-/Nachtrhythmus bei 26/20°C.

## 2.2. Pflanzenmedien

Die für die Gewebekultur von Perlhirse verwendeten Medien basierten auf L3-Medium (Jähne *et al*., 1991) bzw. MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962).

### 2.2.1. Medien für die Gewebekultur von Perlhirse

Für die Gewebekultur von Perlhirse wurde das unmodifizierte L3-Medium auf Saccharose-Basis eingesetzt (Jähne *et al*., 1991). Das von Morgenstern (2000) etablierte Regenerationssystem sieht eine Kallusinduktion mit dem Medium L3D2,5B0,1, welches 2,5 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D) und 0,1 mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP) und 5 mg/l Silbernitrat enthält, vor. Die Regenration erfolgt auf dem Medium L3B1 mit 1 mg/l BAP, die Bewurzelung regenerierter Sprosse auf dem halbkonzentrierten 0,5L3-Medium ohne Hormonzusätze.

### 2.2.2. Medien für die Transformation

Die osmotische Vorbehandlung wurde auf modifiziertem MS-Osm Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit einer hohen Osmolarität von 1,1 Os (240 g/l Saccharose entspricht 0,7 M) durchgeführt.
Die Selektion von transgenem Gewebe erfolgte auf dem Regenerationsmedium L3B1 mit einem Zusatz von 2 mg/l des Herbizids BASTA.

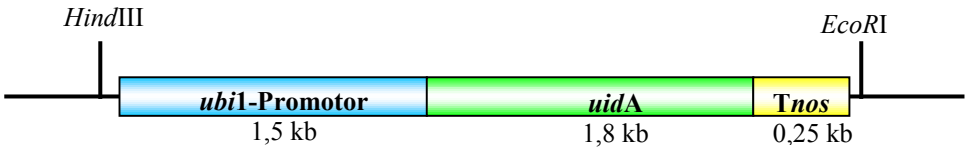
## 2.3. Plasmide

Das Rückgrat der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide stammt aus pUC19 (Vieira und Messing, 1982) und enthält das *amp*$^r$-Gen, das eine Ampizillinresistenz vermittelt, sowie den bakteriellen Replikationsursprung.

Die Transformation zur Amplifikation der folgenden Plasmide erfolgte in dem *E. coli* Stamm DH5α entsprechend Standardprotokollen (Sambrook *et al.,* 1989). Die Bakterien wurden auf LB-Medium kultiviert. Die Selektion transformierter Stämme erfolgte mit 100 µg/ml Ampizillin.

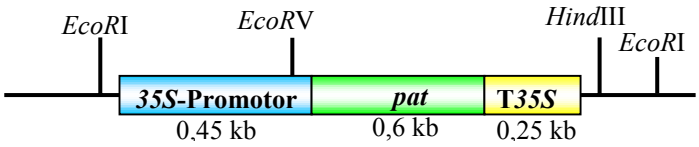
**pubi.gus** (R. Brettschneider, Universität Hamburg, unveröffentlicht):

dieser Vektor (6,3 kb) enthält den konstitutiven Ubiquitin1-Promotor (*ubi*1-Promotor) aus *Zea mays* (Christensen *et al*., 1992), das β-Glukuronidasegen *uid*A (Jefferson, 1987), und den Terminator des Nopalinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens* (T*nos*).



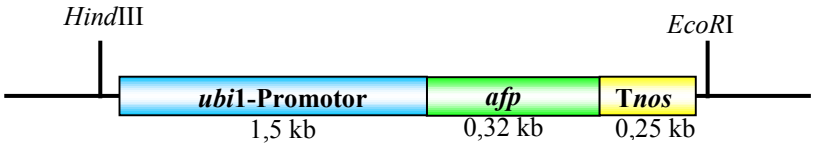

**p35SAcS** (AgrEvo, Frankfurt):

dieser Vektor (4,03 kb) enthält den *35S*-Promotor des *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*), das *pat*-Gen, welches für die Phosphinotrizin-Acetyltransferase aus *Steptomyces viridochromogenes* kodiert (Strauch *et al*., 1988) und den *CaMV 35S*-Terminator (T*35S*).

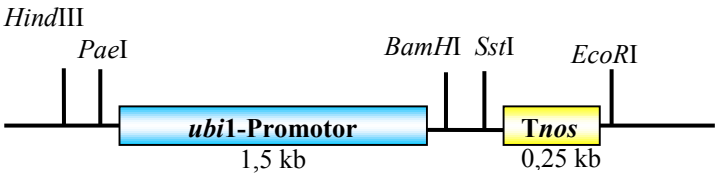



**pubi2.afp** (AgrEvo, Frankfurt):

dieser Vektor (4,7 kb) enthält die *afp*-*c*DNA (*antifungal protein*) aus *Aspergillus giganteus* (Nakaya *et al*., 1990) unter Kontrolle des *ubi*1-Promotors und des Terminators T*nos*.



**pubi.cas** (Becker, Universität Hamburg, unveröffentlicht):
dieser Vektor (4,5 kb) enthält eine Klonierungskassette bestehend aus dem *ubi*1-Promotor und dem Terminator T*nos*. Zwischen Promotor und Terminator befindet sich ein Teil der multiplen Klonierungsstelle aus pUC19.




### 2.4. Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden für Klonierungsarbeiten, PCR bzw. RT-PCR Analysen sowie zur Markierung von DNA-Sonden für Hybridisierungen eingesetzt.

***ubi*1-Promotor Primer:**

Ubi1 (5‘-Primer): 5‘ GTAGATAATGCCAGCCTGTTA 3‘
Ubix (5‘-Primer): 5‘ GCATATGCAGCATCTATTCATATGC 3‘

**T*nos*-Primer:**

Nos-T3‘ (3‘-Primer): 5‘ CCCATCTCATAAATAACGTC 3‘

***pat*-Primer:**

SH3 (5‘-Primer): 5‘ GCTACAGCAGCTGATATGGC 3‘
SH4 (3‘-Primer): 5‘ GGAGGAGCTGGCAACTCAAAA 3‘
Größe des amplifizierten Fragments aus dem Vektor p35SAcS: 470 bp.

***afp*-Primer:**

AFP1(5‘-Primer): 5‘ CGTTTCTCTCGCTTCTTTGGG 3‘
AFP2 (3‘-Primer): 5‘ CTAGCAGTAGCACTTCCCCTT 3‘
Größe des amplifizierten Fragments aus dem Vektor pubi2.afp: 277 bp.

**Oligonukleotide zur Konstruktion des Vektors pubi.leapep20:**

Leapep1 (5‘-Oligo):

5‘ CGCGGATCCATGAGATCGCTCGCGGTGGTGGTGGCCGTGGTAGCCA
CGGTGGCCATGGCCATCGGCACGGCGCGCGGCATGGCTAGCAGG 3‘

Leapep2 (3‘-Oligo):

5‘ GCGGAGCTCTCAAAGCGCGCGAAGCGCCAGGCGTGCCAGCCTAGC
GGCAAGGCGAGCGGCCCTGCTAGCCATGCCGCGCGCCGTGCCGATG 3‘

***leapep20*-Primer**

L1 (5‘-Primer): 5‘ CGCGGATCCATGAGATCG 3‘

L2 (3‘-Primer): 5‘ GCGGAGCTCTCAAAGCGC 3‘

Größe des amplifizierten Fragments aus dem Vektor pubi.leapep20: 150 bp.

### 2.5. Etablierung eines Transformationssystems für Perlhirse

Als Grundlage für die Entwicklung des Transformationssystems für Perlhirse wurde das von Becker und Mitarbeitern (1994) für die Transformation von Weizenembryonen etablierte Protokoll verwendet. Dabei wurde die Partikelkanone PDS 1000/He der Firma Biorad (München, Deutschland) benutzt.

#### 2.5.1. Parameter für den Partikelbeschuss von Perlhirse

Unreife zygotische Embryonen wurden als Explantate für die Transformation eingesetzt. Die Isolierung der Embryonen aus unreifen Körnern erfolgte 10-14 Tage nach Bestäubung.

Die Embryonen wurden nach einer Vorkultur von 1-5 Tagen auf L3D2,5B0,1-Medium transformiert. Eine osmotische Vorbehandlung auf modifiziertem MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit einer hohen Osmolarität (1,1 Os) wurde für 4 h vor und 19 h nach Transformation vorgenommen. Als Träger der zu transformierenden DNA dienten Goldpartikel eines Durchmessers von 0,4-0,8 μm. Der DNA-Fällungsansatz wurde wie bei Becker *et al*. (1994) beschrieben durchgeführt.

Insgesamt wurden 3 verschiedene Drücke getestet: 1100 psi, 1350 psi und 1550 psi.

Als Selektionsmarker wurde in allen Transformationsexperimenten das *pat*-Gen übertragen, welches eine Toleranz gegen den im Herbizid BASTA enthaltenen Wirkstoff Phosphinotrizin vermittelt. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte durch Zusatz von 2 mg/l BASTA zum Regenerationsmedium und einen anschließenden Sprühtest regenerierter Pflanzen mit einer 200 mg/ml BASTA-Lösung (Strauch *et al*., 1988).

### 2.6. Etablierung einer *in vitro* Suspensionskultur für Perlhirse

Als Ausgangsmaterial für die Suspensionskultur diente embryogener Kallus, der aus unreifen zygotischen Embryonen gewonnen wurde. Die Isolierung der Embryonen und die Kallusinduktion erfolgte, wie bei Morgenstern (2000) beschrieben, auf festem Kallusinduktionsmedium L3D2,5B0,1.

Für die Etablierung der Suspensionskultur wurde flüssiges L3D2,5B0,1 Medium nach Zusatz von 5 mg/l Silbernitrat eingesetzt. Die Kallusinduktion erfolgte auf festem L3D3B0,1-Medium, das abweichend vom Standard L3D2,5B0,1-Medium 3 mg/l 2,4-D enthält. Die Regeneration von Pflanzen erfolgte auf festem L3B1 Medium.

### 2.7. Histochemischer GUS-Assay

Die durch das *uid*A-Reportergen vermittelte β-Glukuronidase Aktivität wurde mittels eines histochemischen GUS-Tests nachgewiesen (Jefferson *et al*., 1987). Die transformierten Explantate wurden in einem Färbepuffer, welcher das Substrat X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glukuronsäure) enthält, für 16-20 h bei 37°C inkubiert. Die blau gefärbten Signale wurden mit Hilfe eines Binokulars ausgewertet.

### 2.8. Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten, wie Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien, Klonierungen, Transformation, Aufreinigung, Fällung und Quantifizierung von Nukleinsäuren wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al*., 1989) durchgeführt.

Restriktionsanalysen von Plasmiden bzw. genomischer DNA von Perlhirse sowie PCR Analysen wurden nach den Herstellerangaben durchgeführt (InVitrogen Life Technologies: Karlsruhe, Deutschland; MBI-Fermentas: St. Leon-Roth, Deutschland; Roche Diagnostics: Mannheim, Deutschland; Amersham Pharmacia Biotech: Freiburg, Deutschland; Seqlab: Göttingen, Deutschland).

#### 2.8.1. Extraktion genomischer DNA aus Perlhirse

Für die Extraktion genomischer DNA aus Blättern von Perlhirse wurde das Protokoll von Delaporta *et al*. (1983) zur Extraktion pflanzlicher DNA verwendet. Die Eliminierung der RNA erfolgte durch Behandlung der isolierten DNA mit 40 µg/ml des Enzyms Ribonuklease A der Firma InVitrogen Life Technologies.

### 2.8.2. Digoxigenin-Markierung der DNA-Sonden

Für die molekulare Analyse der transformierten Pflanzen wurden Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) der Firma Roche Diagnostics zur Markierung von DNA-Sonden mittels PCR verwendet.

Alle DIG-Markierungen wurden, wie folgend für einen 50 µl PCR-Ansatz beschrieben, durchgeführt: Primer: je 0,3 µM; dATP, dGTP, dCTP: je 0,3 mM; dTTP: 0,2 mM; DIG-dUTP: 35 µM; $MgCl_2$: 2 mM; PCR-Puffer: 1x; Taq-Polymerase: 1 u; Template DNA: 50 ng.

Bei der Auswahl der *Annealing*-Temperaturen bzw. der Polymerisationszeiten wurde die Schmelztemperatur der jeweiligen Primerpaare bzw. die Längen der amplifizierten Fragmente berücksichtigt (Baldino *et al*., 1989).

### 2.8.3. Southern-Blot Analyse

Der Nachweis transgener Perlhirsepflanzen erfolgte durch Southern-Blot Analysen genomischer DNA. Restringierte genomische DNA wurde standardmäßig in 0,8% Agarose elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran (Hybond NX) der Firma Amersham Pharmacia Biotech mittels Kapillartransfer übertragen (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden erfolgte mit dem DIG-Easy-Hyb System, die nachfolgende chemilumineszente Detektion entsprechend den Herstellerangaben der Firma Roche Diagnostics (*DIG Application Manual for Filter Hybridisation, Roche diagnostics, 2000*). Die Expositionszeiten variierten je nach Sensitivität der Sonden und Stärke der Signale zwischen 1-6 h.

### 2.8.4. RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt RNA aus Blättern von Perlhirse erfolgte mit Hilfe des TRIzol-Reagent der Firma InVitrogen Life Technologies entsprechend den Herstellerangaben. Die erhaltene RNA wurde für die reverse Transkription und anschließender PCR Analyse verwendet.

### 2.8.5. RT-PCR Analyse

Die RT-PCR Analyse erfolgte mit Enzymen der Firma MBI-Fermentas den Herstellerangaben entsprechend. Die Eliminierung genomischer DNA aus isolierter Gesamt-RNA erfolgte durch Behandlung mit dem Enzym Desoxyribonuklease I. Die Synthese der *c*DNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase durchgeführt.

Die Spezifität der Produkte der RT-PCR Analyse wurde nach Transfer auf eine Nylon-Membran und anschließender Hybridisierung mittels einer spezifischen, DIG-markierten DNA-Sonde überprüft.

### 2.9. Phytopathologische Analysen

Für die phytopathologischen Untersuchungen wurden zwei pathogene Pilze von Perlhirse, *Pyricularia grisea* und *Puccinia substriata,* eingesetzt, die von Dr. J. Wilson (USA) bereitgestellt wurden.

#### 2.9.1. Anzuchtbedingungen von *Pyricularia grisea*

Die Myzelbildung des Pilzes *Pyricularia grisea* erfolgte durch Kultivierung auf YEG-Agar bei 26°C und einem 16/8 h Tag-/Nachtrhythmus (Valent *et al*., 1991).

#### 2.9.2. Wachstumsinhibition von *Pyricularia grisea*

Das Wachstum von *P. grisea* wurde in Anwesenheit des antifungalen Peptids *Ag*-AFP bzw. des antimikrobiellen Peptids Pep20 untersucht.

Das sezernierte antifungale Protein *Ag*-AFP aus *Aspergillus giganteus* (bereitgestellt von Dr. V. Meyer, TU-Berlin) bzw. das mittels Festphasensynthese hergestellte antimikrobielle Peptid Pep20 (Firma Seqlab) wurden in Konzentrationen von 5-10 µM für *Ag*-AFP und 50-400 µM für Pep20 dem YEG-Agar zugesetzt. Aus einer mit *P. grisea* gleichmäßig bewachsenen YEG-Agarplatte wurde mit Hilfe eines Korkbohrers ein Agarblock ausgestanzt und in die Mitte der mit den Peptiden versetzten Agarplatten plaziert. Das Myzelwachstum wurde unter Standardbedingungen, im Vergleich zur Kontrolle, beobachtet.

#### 2.9.3. Anzuchtbedingungen von *Puccinia substriata*

Der biotrophe Pilz *P. substriata* kann im Gegensatz zu *P. griseae* nur auf der lebenden Wirtspflanze angezogen werden. Hierfür wurden 2-3 Wochen alte Wildtyp Perlhirsepflanzen mit einer Sporenlösung, die zwecks Blattbenetzung 0,01% Tween20 enthält, gesprüht. Die inokulierten Pflanzen wurden zunächst 24 Stunden im Dunkeln und bei hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach folgte die Kultivierung unter Standardbedingungn. 2-3 Wochen nach Inokulation wurden neue Pilzsporen aus den entstandenen Läsionen mit Hilfe eines Pinsels gesammelt (persönliche Mitteilung, Dr. J. Wilson, USA).

### 2.9.4. *In vitro* Infektion von Blattsegmenten mit *Puccinia substriata*

$T_1$- und $T_2$-Nachkommen der transgenen Perlhirselinien wurden für den Blattinfektionstest ausgesät. Von den 2-3 Wochen alten Nachkommen wurden 2,5 cm lange Blattsegmente aus dem mittleren Teil des Tertiärblatts geschnitten und auf Wasseragar, welches 40 mg/l des Seneszenzinhibitors Benzimidazol enthält, aufgelegt. Pro Testpflanze wurden 3 Segmente für die Ermittlung eines Mittelwertes vorbereitet. Als Kontrolle dienten Wildtyp Pflanzen, die gleichermaßen behandelt wurden. Nach Benetzen der Blattoberfläche mit einer 0,01%igen Tween20-Lösung wurden die Blattsegmente in einem Inokulationsturm gleichmäßig infiziert. Die inokulierten Blattsegmente wurden zunächst für 24 h unter Lichtausschluss und 100%iger relativer Luftfeuchtigkeit bei 26°C inkubiert. Anschließend wurden sie unter Standardbedingungen bis zur Bonitur für 7-10 Tage kultiviert. Als Nullkontrolle dienten zusätzlich Blattsegmente, die ohne Inokulation parallel unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurden.

Der transgene Status von individuellen Pflanzen spaltender Linien wurde mittels eines BASTA-Sprühtests bestätigt.

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der gebildeten Pusteln, Sporennester, die sich auf anfälligen Blättern durch Vermehrung des Pilzes bilden, und anschließendem Vergleich mit den Kontrollen. Für jedes Experiment wurde der Mittelwert der Kontrollpflanzen mit 100%igem Befall gleichgesetzt.

# 3. Ergebnisse

Um die Resistenz von Perlhirsesorten gegen Pathogene zu verbessern werden in der klassischen Züchtung resistente Wildsorten in Hochleistungssorten eingekreuzt, wodurch Qualitätsmerkmale verloren gehen könnten. Durch die Etablierung von *in vitro* Kulturtechniken und Transformationssystemen ist die gezielte Übertragung einzelner Gene ohne Verlust anderer Qualitäten möglich.
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Systems für die biolistische Transformation von *Pennisetum glaucum*. Ferner wurden 2 gentechnische Ansätze zur Verbesserung der Pilzresistenz durchgeführt. Das antifungale Gen *afp* aus *Aspergillus giganteus* sowie das für das synthetische antimikrobielle Peptid kodierende Gen *leapep20* wurden mit Hilfe des hier etablierten Transformationssystems in Perlhirse transformiert. Die stabile Integration, Expression und Vererbung der Transgene wurde in den primären Transgenen und ihren Nachkommen analysiert. Durch phytopathologische Untersuchungen wurde die Auswirkung der übertragenen Gene auf das Resistenzverhalten der transgenen Pflanzen getestet. Abschließend wurde eine *in vitro* Suspensionskultur zur effizienten Regeneration von Perlhirsepflanzen etabliert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und Untersuchungen vorgestellt.

## 3.1. Klonierung des Vektors pubi.leapep20

Alle in dieser Arbeit verwendeten Transformationsvektoren standen mit Ausnahme des Vektors pubi.leapep20 Transformationsplasmide vor Beginn dieser Arbeit bereit (siehe 2.3.).
Zur Konstruktion des Vektors pubi.leapep20 wurde die Aminosäuresequenz des Peptids Pep20 (Met Ala Ser Arg Ala Ala Arg Leu Ala Ala Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Arg Ala Leu) in DNA übersetzt, dabei wurde die DNA-Sequenz an die *codon usage* für *Pennisetum glaucum* angepasst (Nakamura *et al*., 2000). Bei der Erstellung der Sequenz wurde ein Fusionsprotein aus dem Signalpeptid der Gerstenchitinase CHI 26 (Leah *et al*., 1991) und dem Pep20 gebildet. Für die Klonierung wurden am 5‘- bzw. 3‘-Ende der Sequenz Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *BamH*I und *Sst*I eingefügt.
Das Konstrukt *leapep20* wurde durch Hybridisierung der zwei Oligonukleotide Leapep1 (90 Basen) und Leapep2 (91 Basen), die einen überlappenden Bereich von 31 Basenpaaren

aufweisen und anschließendem Auffüllen mittels Pfu-Polymerase hergestellt. Abbildung 1 zeigt schematisch die Konstruktion von *leapep20*.

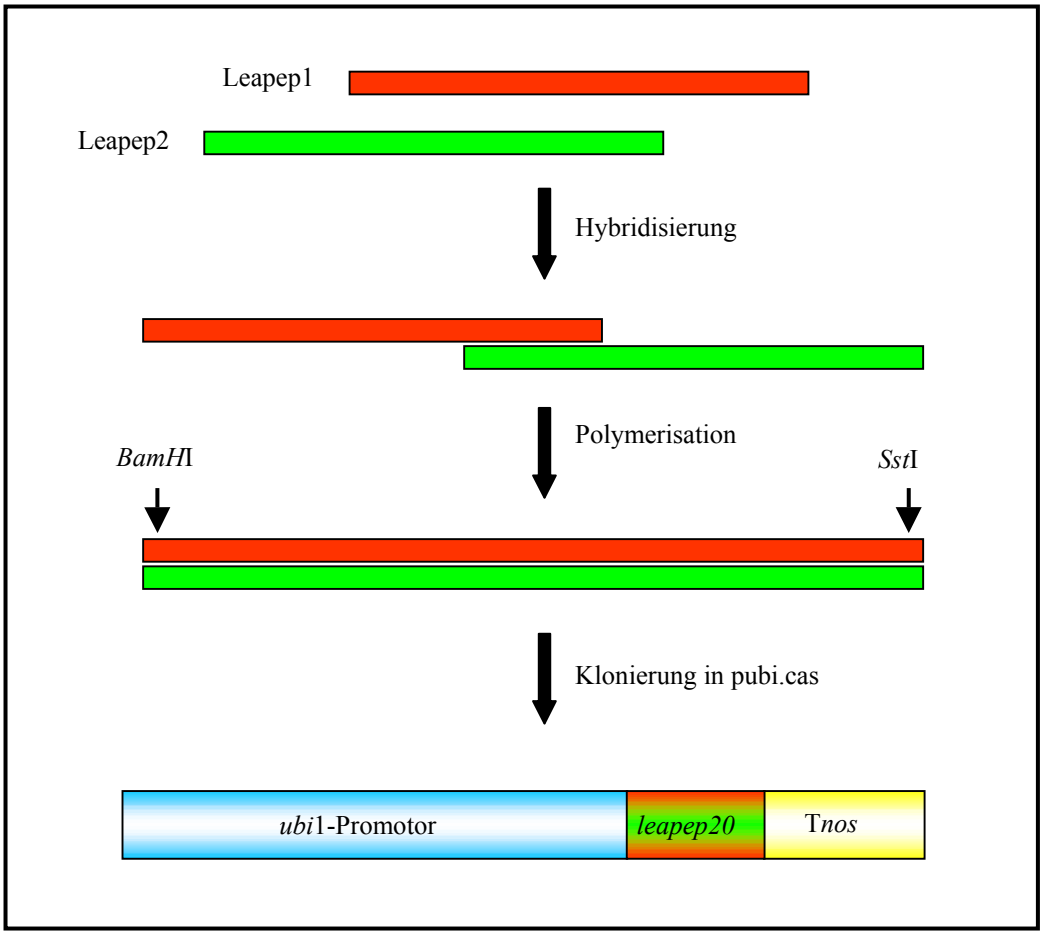



**Abbildung 1:** Konstruktion von pubi.leapep20.

Die Hybridisierung und Polymerisation erfolgten unter Einsatz äquimolarer Mengen der Oligonukleotide Leapep1 und Leapep2 in einem Standardreaktionsansatz für die Pfu-Polymerase.

Nach Denaturierung der Oligonukleotide bei 95°C wurde die Hybridisierung der komplementären Bereiche durch stufenweises Senken der Temperatur von 85°C bis zum Erreichen der *Annealing*-Temperatur von 60°C durchgeführt. Anschließend wurde die Polymerisation bei 75°C für 30 min durchgeführt.

Das entstandene Fragment (Abb. 2) wurde nach Verdau und Aufreinigung in den Expressionsvektor pubi.cas kloniert und in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Nach Amplifikation und Aufreinigung wurde der Vektor pubi.leapep20 für die Transformation von Perlhirse eingesetzt.

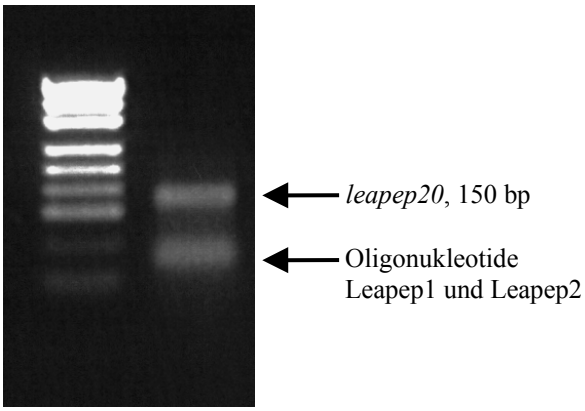



**Abbildung 2:** Konstruktion von *leapep20*. Die 150 bp große Bande zeigt die hybridisierten und amplifizierten Oligonukleotide. Die kleinere Bande von 90 bp zeigt die nicht hybridisierten Oligonukleotide Leapep1 und Leapep2.

### 3.2. Optimierung der Transformationsparameter

Für die Ermittlung der optimalen Transformationsbedingungen war es notwendig, die verschiedenen Parameter zu verbessern. Die Ergebnisse von transienten Transformationsexperimenten, Vorbehandlung und Ermittlung des geeigneten Selektionsdrucks werden im folgenden beschrieben.

#### 3.2.1. Transiente Transformation von Perlhirse

Zur Ermittlung des optimalen Drucks für die stabile Transformation wurden Perlhirseembryonen zunächst transient transformiert. Dabei wurden die unreifen Embryonen 1-2 Tage nach Isolierung mit dem Konstrukt pubi.gus beschossen. Die Drücke 1100, 1350 und 1550 psi wurden verwendet. Die histochemische Visualisierung der GUS-Signale und die anschließende Auswertung erfolgte 24-48 h nach Beschuss (siehe 2.7.). Die Anzahl der eingesetzten Embryonen betrug je 150 für die getesteten Drücke. Die Auswertung ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Der prozentuale Anteil an signalaufweisenden Embryonen, die durchschnittliche Anzahl der GUS-Signale pro Embryo und die maximale Signalanzahl, die bei einem Embryo ermittelt wurde, sind aufgeführt.

**Tabelle 1:** Transiente Transformation unreifer Embryonen mit dem Reportergen *gus*.

| **Druck** | **1100 psi** | **1350 psi** | **1550 psi** |
|---|---|---|---|
| **Signalaufweisende Embryonen** | 64,4% | 62,7% | 68,3% |
| **Signale/Embryo** | 5,5 | 2,3 | 4 |
| **Max. Signale pro Embryo** | 38 | 12 | 26 |

Die Experimente der transienten Transformation zeigten, dass bei der Anwendung des niedrigsten Drucks 1100 psi die höchste Anzahl an Signalen pro Embryo zwar erreicht war, der Prozentsatz an transformierten Embryonen aber bei der Anwendung des Drucks 1550 psi höher war.
Die Anzahl der Signale pro Embryo variierte stark innerhalb einer Gruppe mit dem gleichen Druck transformierter Embryonen. Beispielsweise konnten einzelne Embryonen mit bis zu 38 Signalen beobachtet werden, dagegen zeigten andere Embryonen aus dem gleichen Experiment nur ein oder wenige Signale (Abb. 3).

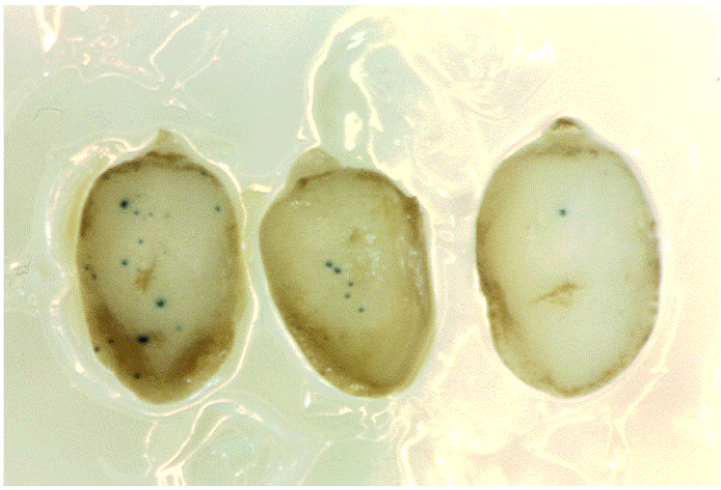


**Abbildung 3:** Transiente GUS-Expression in Embryonen nach Transformation mit dem Konstrukt pubi.gus. Embryonen, die im selben Experiment transformiert wurden, wiesen unterschiedlich viele blaue GUS-Signale auf.

Auf Grund der heterogenen Verteilung der Ergebnisse, die aus den transienten Experimenten resultierten, konnte kein optimaler Druck für die stabile Transformation von Perlhirse ermittelt werden. Die stabile Transformation wurde deswegen mit allen drei Drücken durchgeführt.

### 3.2.2. Einfluss der osmotischen Vorbehandlung auf die Kallusbildung

Während des Beschusses werden durch die Penetration der Goldpartikel Schäden am Pflanzengewebe verursacht. Eine osmotische Vorbehandlung könnte die verursachten Schäden kompensieren. Es wird diskutiert, dass dadurch der Turgordruck in den Pflanzenzellen reduziert wird und folglich die Schäden verringert werden (Vain *et al*., 1993).
Um den Einfluss einer osmotischen Vorbehandlung auf die Kallusbildung zu untersuchen wurden unreife zygotische Embryonen mit Goldpartikeln nach einer 4-stündigen osmotischen Vorbehandlung auf Medium MS-Osm, dessen Osmolarität 1,1 Os beträgt, beschossen (siehe

2.5.1.). Von jedem Genotyp wurden in 4 unabhängigen Experimenten insgesamt 120 Embryonen nach einer osmotischen Vorbehandlung mit einem Druck von 1350 psi transformiert. Als Kontrolle dienten osmotisch unbehandelte Embryonen, die gleichermaßen behandelt wurden.

Nach Ablauf von 20 Stunden nach Partikelbeschuss wurden die Embryonen auf Kallusinduktionsmedium L3D2,5B0,1 umgesetzt und für 4 Wochen bei 26°C und Dunkelheit inkubiert. Die osmotisch unbehandelten Embryonen wurden direkt auf L3D2,5B0,1-Medium kultiviert. Die Auswertung erfolgte im Anschluss auf die 4-wöchige Kallusinduktionsphase und ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Einfluss der osmotischen Vorbehandlung auf die Kallusentwicklung. Für jeden Versuch wurden jeweils 120 Embryonen eingesetzt.

| **Genotyp** | **Manga Nara** | | **Bongo Nara** | | **7042** | | **841B** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Osmotische Vorbehandlung** | + | - | + | - | + | - | + | - |
| **Kallus bildende Embryonen** | 99 | 34 | 86 | 28 | 105 | 13 | 87 | 41 |
| **Kallusbildung** | 83% | 28% | 72% | 23% | 88% | 11% | 73% | 34% |

Dieses Experimente zeigte einen signifikanten Unterschied in der Fähigkeit zur Bildung embryogener Kalli. 70-90% der Embryonen, die nach osmotischer Vorbehandlung beschossen wurden, zeigten normale Kallusbildung und entwickelten embryogene Strukturen. Dagegen waren nur 20-35% der osmotisch unbehandelten Embryonen in der Lage, Kalli zu entwickeln. Außerdem war bei den osmotisch unbehandelten Embryonen eine verstärkte Verbräunung des Gewebes und später des Kulturmediums zu beobachten.

### 3.2.3. Ermittlung des geeigneten Selektionsdrucks

Die Auswahl der Konzentration des Selektionsagens BASTA wurde für die verwendeten Wildtypen sowohl für die *in vitro* Kultur als auch für den Sprühtest regenerierter Pflanzen in einer BASTA-Konzentationsreihe bestimmt.

Für die *in vitro* Kultur wurde die Überlebens- und Regenerationsfähigkeit der Kalli nach Inkubation bei 5 verschiedenen Konzentrationen von BASTA (1, 2, 3, 4 und 5 mg/l) mit der Nullkontrolle verglichen. In zwei Ansätzen wurden 24 und 30 Kalli untersucht.

Kalli, die bei den BASTA-Konzentrationen 4 oder 5 mg/l inkubiert wurden, wurden nekrotisch und starben nach 2 Wochen ab (Abb. 4). Es konnte keine Regeneration beobachtet werden. Zusätzlich erfolgte eine Verbräunung des Kulturmediums, vermutlich durch das verstärkte Absondern phenolischer Substanzen aus toten Kalli, welche wiederum zu einer Beschleunigung des Absterbens benachbarter Kalli führte.

Bei der niedrigsten Konzentration von 1 mg/l BASTA waren im Vergleich zur Kontrolle 80% der Kalli in der Lage, Sprosse zu regenerieren.

Bei den Konzentrationen 2 und 3 mg/l konnten 60% der Kalli regeneriert werden, wobei der Regenerationsprozess im Vergleich zur Kontrolle deutlich verlangsamt war.

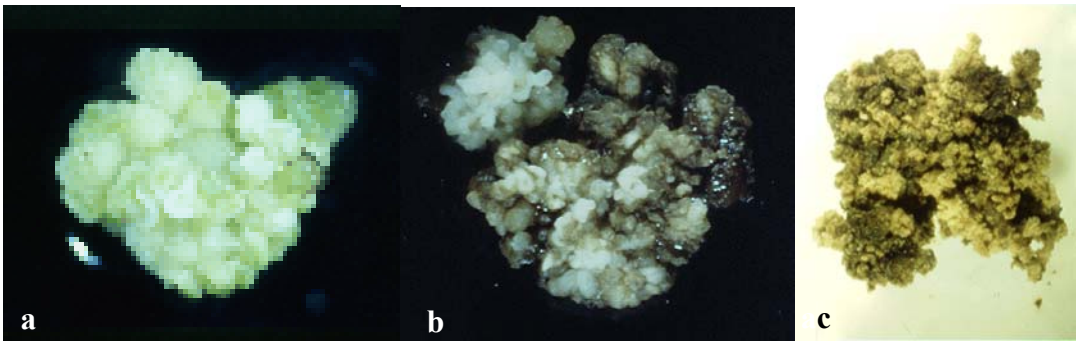



**Abbildung 4:** Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Selektionsagens BASTA auf die Kallusentwicklung. **a:** Der unbehandelter Kallus zeigt normale Entwicklung und Regeneration. **b:** Nach Inkubation auf 2 mg/l BASTA weist der Kallus abgestorbene Bereiche auf, ist aber trotzdem in der Lage, somatische Embryonen zu bilden. **c:** Abgestorbener Kallus nach Inkubation auf 5 mg/l BASTA.

Die *in vitro* Selektion erfolgte durch Zusatz von 2 mg/l BASTA zum Regenerationsmedium unter den gleichen Regenerationsbedingungen.

Die endgültige Selektion erfolgte durch einen BASTA-Sprühtest. Die zur Selektion erforderliche BASTA-Konzentration wurde durch Besprühen des Wildtyps ermittelt. Hierfür wurden jeweils 30 Pflanzen aller Genotypen mit den BASTA-Konzentrationen 100, 150 und 200 mg/l besprüht.

Nach Ablauf von 2 Wochen waren die mit 200 mg/l behandelten Pflanzen vollständig eingegangen. Die Pflanzen, die mit 150 mg/l BASTA behandelt wurden überlebten einige Tage länger und waren in weniger als 3 Wochen tot. Die Konzentration 100 mg/l erwies sich als ineffektiv, da die Pflanzen weniger geschädigt wurden und länger überlebten.

Für die Selektion transgener Pflanzen wurde daher eine 200 mg/l konzentrierte BASTA-Lösung verwendet.

In Abbildung 5 ist beispielhaft der Sprühtest für den Genotyp 7042 gezeigt.

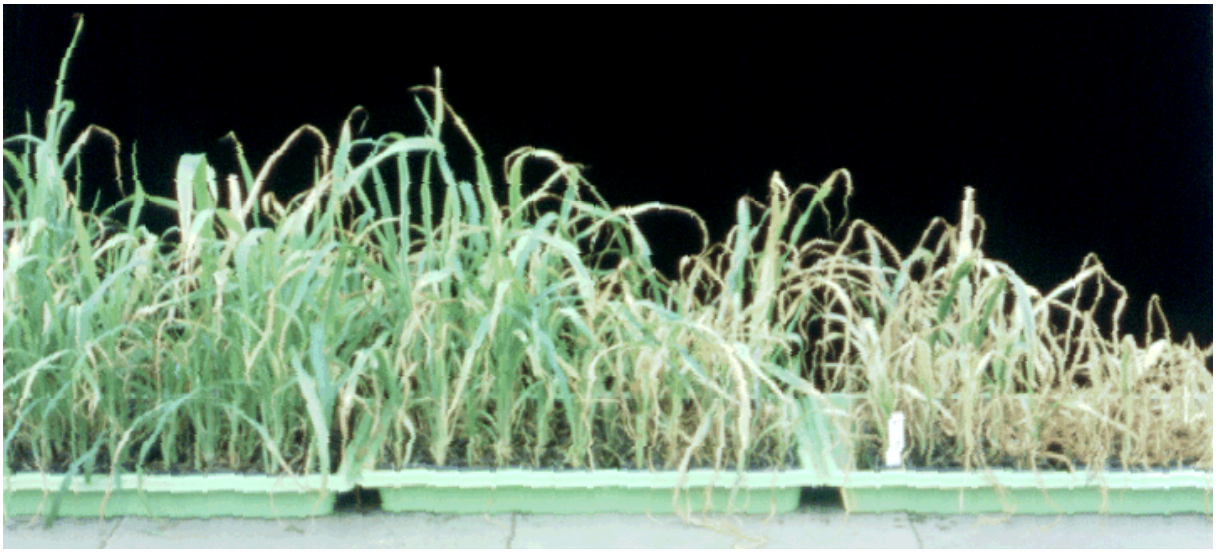


**Abbildung 5:** BASTA-Sprühtest vom Wildtyp 7042 mit 100, 150 und 200 mg/l. Die mit 200 mg/l BASTA behandelten Pflanzen waren nach 2 Wochen abgestorben (rechts), dagegen waren die mit 150 mg/l behandelten Pflanzen (mittig) weniger angegriffen. Die mit 100 mg/l BASTA gesprühten Pflanzen (links) waren nur mäßig beeinträchtigt.

### 3.3. Stabile Transformation von Perlhirse

Unreife zygotische Embryonen wurden basierend auf dem von Becker *et al*. (1994) etablierte Protokoll durch Partikelbeschuss transformiert. Die Embryonen wurden 10-14 Tage nach Bestäubung aus den unreifen Samen der Genotypen 7042, Manga Nara, Bongo Nara und 841B isoliert. Für die Transformation wurden die drei verschiedene Drücke 1100, 1350 und 1550 psi verwendet.

#### 3.3.1. Kulturbedingungen für die Transformation

Im Allgemeinen beruhte die Regeneration transformierten Gewebes auf dem von Morgenstern (2000) etablierten Regenerationssystem.

Die Embryonen wurden 4 Stunden vor und 20 Stunden nach dem Partikelbeschuss einer osmotischen Vorbehandlung auf MS-Osm Medium unterzogen. Danach wurden sie für 4 Wochen auf Kallusinduktionsmedium L3D2,5B0,1 bei 26°C im Dunkeln kultiviert. Die Regeneration erfolgte zunächst auf L3B1-Medium bei 26°C und 16/8 h Tag-/Nachtrhythmus (siehe 2.5.1.).

Im Anschluss an die Kallusinduktionsphase wurde mit der BASTA-Selektion begonnen, die durch Zusatz von 2 mg/l BASTA zum Regenerationsmedium erfolgte. Regeneriertes Gewebe wurde regelmäßig im Abstand von 2 Wochen auf frisches Selektionsmedium umgesetzt. Die Sprossentwicklung setzte 4 bis 12 Wochen nach Beginn der Selektion ein. Die Sprosse wurden dann zum Bewurzeln auf hormonfreies 0,5L3-Medium kultiviert.

Die regenerierten Pflanzen wurden in Erde eingepflanzt und für 2 Wochen kultiviert. Anschließend erfolgte die Selektion durch Sprühen mit einer 200 mg/l konzentrierten BASTA-Lösung.

Die BASTA-resistenten Pflanzen wurden für die weiteren Analysen im Gewächshaus unter Standardbedingungen kultiviert.

Die Regeneration transgener Pflanzen nach dem hier beschriebenen Protokoll beansprucht 6-7 Monate. Tabelle 3 fasst die einzelnen Stufen der Transformation und Regeneration transgener Pflanzen zusammen.

**Tabelle 3:** Regenerationsphasen transgener Pflanzen.

| **Phase** | **Kulturdauer** |
|---|---|
| Vorkultur | 1-5 Tage nach Isolierung |
| Osmotische Vorbehandlung | 4 h vor, 19 h nach Beschuss |
| Kallusinduktion | 4 Wochen |
| Regeneration | 4 Wochen |
| Selektion | 4-12 Wochen |
| Wurzelinduktion | 2-4 Wochen |
| Kultur in Erde | 2 Wochen |

Die verschiedenen Phasen der Regeneration transgener Pflanzen sind in Abbildung 6 dargestellt.

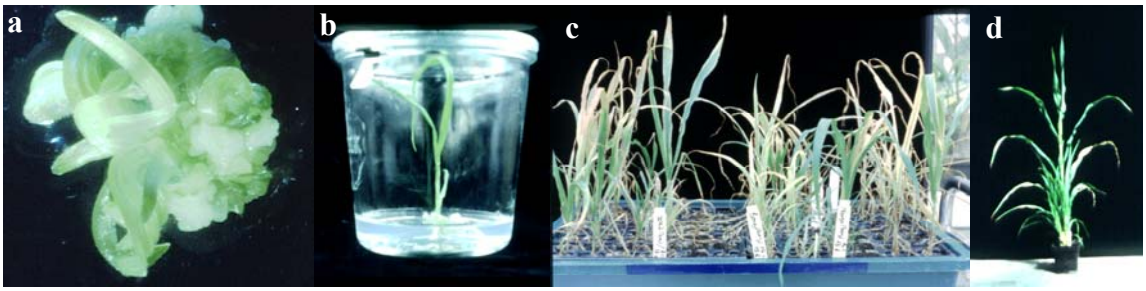



**Abbildung 6:** Regenerationsphasen transgener Pflanzen. **a:** Bildung von Sprossen an einem regenerierenden Kallus. **b:** Wurzelinduktion. **c:** BASTA-Sprühtest. **d:** Transgene Pflanze.

### 3.3.2. Verwendete Konstrukte und Transformationsraten

Skutelli von unreifen Embryonen wurden mit 2 bzw. 3 Konstrukten gleichzeitig co-transformiert. Die Transformation erfolgte 1 Tag bzw. 5 Tage nach einer Vorkultur auf Kallusinduktionsmedium L3D2,5L0,1 im Dunkeln bei 26°C (siehe 2.5.1.).

In den folgenden Tabellen sind die Anzahl transformierter Embryonen, der eingesetzte Heliumdruck, die unterschiedlichen Vorbehandlungen, die Anzahl der Regenerate und die Anzahl transgener Pflanzen aufgeführt.

**Tabelle 4:** Co-Transformation mit den Vektoren pubi.gus und p35SAcS.

| Genotyp | Skutelli | Vorkultur (Tage) | Druck (psi) | Regenerate | Transgene Pflanzen |
|---|---|---|---|---|---|
| **Bongo Nara** | 120 | 1 | 1550 | 60 | 1 |
| **Manga Nara** | 270 | 1 | 1550 | 56 | 0 |

**Tabelle 5:** Co-Transformation mit den Vektoren pubi.gus, p35SAcS und pubi2.afp.

| Genotyp | Skutelli | Vorkultur (Tage) | Druck (psi) | Regenerate | Transgene Pflanzen |
|---|---|---|---|---|---|
| **Bongo Nara** | 144 | 1 | 1550 | 35 | 1 |
| **Manga Nara** | 368 | 1 | 1550 | 72 | 1 |
| **7042** | 770 | 1 | 1550 | 36 | 1 |
| **841B** | 160 | 1 | 1550 | 3 | 0 |

**Tabelle 6:** Co-Transformation mit den Vektoren p35SAcS und pubi.leapep20.

| Genotyp | Skutelli | Vorkultur (Tage) | Druck (psi) | Regenerate | Transgene Pflanzen |
|---|---|---|---|---|---|
| **7042** | 740 | 1 | 1100 | 25 | 0 |
| **7042** | 1709 | 1 | 1350 | 68 | 0 |
| **7042** | 500 | 5 | 1350 | 23 | 0 |
| **7042** | 620 | 1 | 1550 | 30 | 0 |
| **7042** | 773 | 5 | 1550 | 36 | 2 |

Die Regenerationsrate liegt für die verschiedenen Genotypen bei durchschnittlich 5 Pflanzen/Embryo (Morgenstern, 2000). Die Anzahl der hier regenerierten potentiellen Transformanden war im Vergleich zur Regenerationsrate stark herabgesetzt. Durch die *in vitro* Selektion konnte im Mittel eine Regenerationsrate von weniger als 10% erhalten werden.

Bei den oben aufgeführten Experimenten konnten insgesamt 6 transgene Pflanzen regeneriert werden. Alle erhaltenen Pflanzen wurden durch Beschuss mit dem höchsten Druck 1550 psi

transformiert. Es konnten sowohl nach einer 1- als auch einer 5-tägigen Vorkultur transgene Pflanzen erhalten werden.
Die Transformationsraten der einzelnen Genotypen beim Verwenden des Drucks 1550 sind in Tabelle 7 aufgeführt. Insgesamt betrug die Transformationsrate für alle Genotypen 0,3%.

**Tabelle 7:** Erhaltene $T_0$-Pflanzen und Transformationsrate.

| **Wildtyp** | **$T_0$-Pflanzen** | **Transformationsrate** |
|---|---|---|
| Bongo Nara | B1, B2 | 0,7% |
| Manga Nara | M1 | 0,15% |
| 7042 | 701, 70L1, 70L2 | 0,13% |
| 841B | - | 0% |

### 3.3.3. Molekulare Analyse der transgenen Pflanzen

Die Integration der transformierten Gene ins Genom der erhaltenen transgenen Pflanzen wurde durch Southern-Blot Analyse nachgewiesen (siehe 2.8.3.). Für die Ermittlung der Anzahl integrierter Kopien des Transgens wurde die genomische DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut, welches in den entsprechenden transformierten Vektoren jeweils einen linearisierenden Schnitt erzeugt.
Durch Ausschneiden der Promotor-Gen-Terminator Kassette wurde die Vollständigkeit der Integrationen geprüft.
Als Positivkontrolle wurden die jeweiligen Vektoren mit den gleichen Enzymen restringiert. Verdaute genomische Wildtyp DNA diente als Negativkontrolle.
Nach Restriktion und standardmäßigen Auftrennung der DNA in einem 0,8%igem Agarosegel wurde sie auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit den entsprechenden transgenspezifischen, DIG-markierten DNA-Sonden.

#### 3.3.3.1. Nachweis des *pat*- bzw. *gus*-Gens in den Linien B1, B2, M1 und 701

Genomische DNA der transformierten $T_0$-Pflanzen B1, B2, M1 und 701 wurde nach Isolierung und Aufreinigung verschiedenen Restriktionsanalysen für die Bestimmung der Kopienanzahl und die Ermittlung der Vollständigkeit integrierter Transgene unterzogen.
Die Hybridisierung wurde mit der DIG-markierten *pat*-Sonde bzw. *gus*-Sonde durchgeführt.

Die Southern-Blot Analyse zeigte, dass das *pat*- und das *gus*-Gen jeweils in das Genom der $T_0$-Pflanzen B1, B2, M1und 701 stabil integriert wurde (Abb. 7).

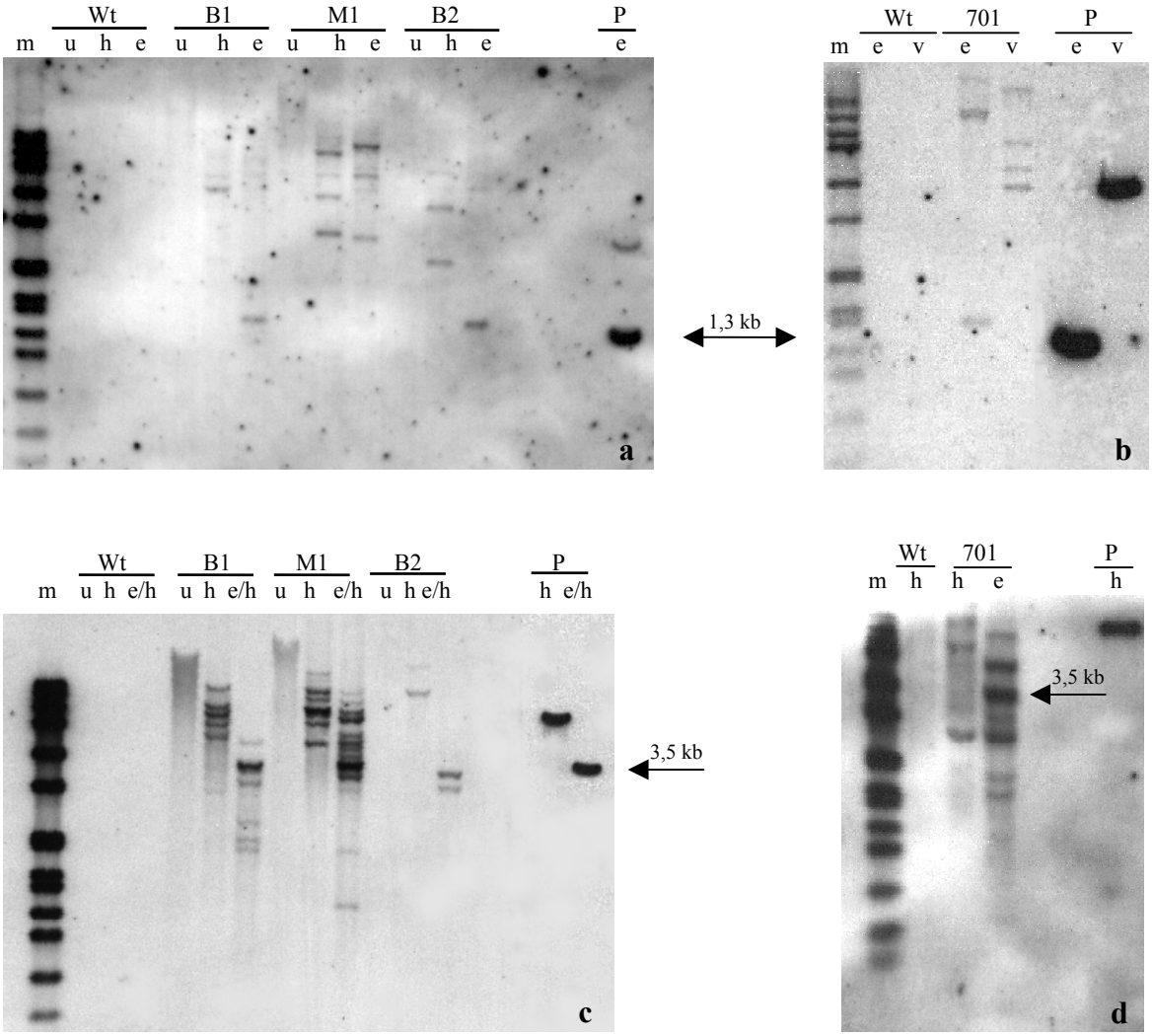



**Abbildung 7:** Nachweis des *pat*- bzw. des *gus*-Gens in der $T_0$ der Linien B1, B2, M1 und 70L1. Je 20 µg der genomischen DNA wurden aufgetragen.
**a, b:** Nachweis des *pat*-Gens. Für die Bestimmung der Kopienanzahl wurde die DNA mit den linearisierenden Enzymen *EcoR*V bzw. *Hind*III restringiert. Die Vollständigkeit der Promotor-Gen-Terminator Kassette (1,3 kb) wurde durch Verdau mit dem Enzym *EcoR*I überprüft.
**c, d:** Nachweis des *gus*-Gens. Für die Bestimmung der Kopienanzahl wurde die DNA mit den linearisierenden Enzymen *Hind*III restringiert. Die Vollständigkeit der Promotor-Gen-Terminator Kassette (3,5 kb) wurde durch Verdau mit den Enzymen *EcoR*I und *Hind*III überprüft.
m: Marker; Wt: Wildtyp DNA; u: unverdaut; h: mit *Hind*III verdaut; v: mit *EcoR*V, e: mit *EcoR*I verdaut; P: Positivkontrolle.

Die Anzahl der Integrationen des *pat*- bzw. *gus*-Gens lag für die verschiedenen Linien zwischen 2 und 7 Integrationen. Mit der hier durchgeführten Restriktionsanalyse konnte bei allen Linien sowohl für das *pat*- als auch für das *gus*-Gen eine vollständige Integration nachgewiesen werden.

In Tabelle 8 ist die Mindestanzahl der integrierten Kopien für die einzelnen Linien aufgeführt.

**Tabelle 8:** Mindestanzahl der Transgenintegrationen.

| Linie | *pat*-Gen | *gus*-Gen |
|---|---|---|
| **B1** | 4 | 6 |
| **B2** | 3 | 2 |
| **M1** | 6 | 7 |
| **701** | 4 | 4 |

Der Nachweis der Transgenintegrationen und ihrer Vererbung erfolgte ebenfalls für die $T_1$-Nachkommen. Bei den Linien B1, M1 und 701 zeigte die Southern-Blot Analyse, dass sowohl das *pat*-Gen als auch das *gus*-Gen in der $T_1$-Generation co-segregierte, da alle *pat*-positiven Nachkommen auch das *gus*-Gen trugen. Des weiteren wiesen die $T_1$-Pflanzen die gleiche Kopienanzahl und das gleiche Integrationsmuster der Elternpflanzen auf.
Bei der Linie B2 überlebten keine der ausgesäten $T_1$-Keimlinge den BASTA-Sprühtest. Southern-Blot Analyse einiger nicht selektierter $T_1$-Pflanzen zeigte, dass weder das Selektionsmarkergen *pat* noch das visuelle Markergen *gus* in den $T_1$-Nachkommen nachweisbar war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der Linie B2 die Transgene *pat* und *gus* nicht vererbt wurden.

Im Folgenden ist exemplarisch der Nachweis des *pat*- und *gus*-Gens in $T_1$-Nachkommen der Linie 701 gezeigt (Abb. 8).

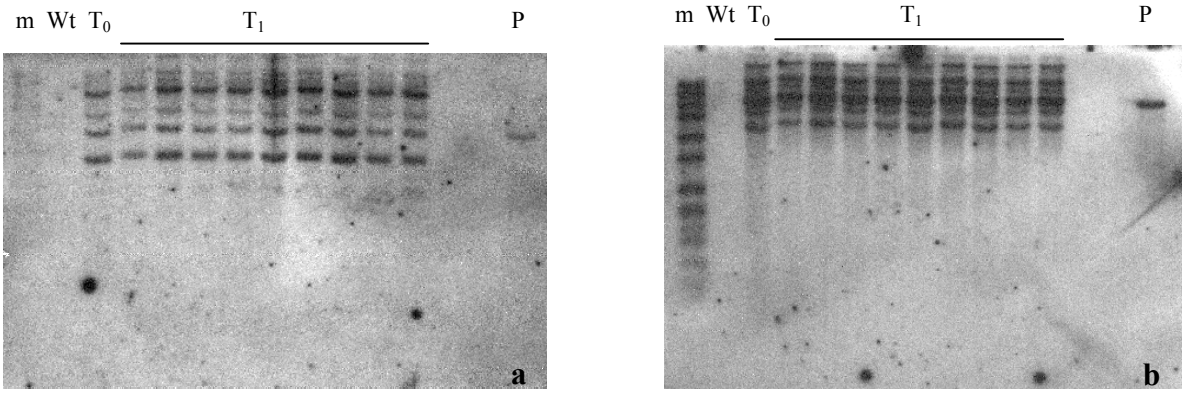



**Abbildung 8:** Nachweis des *pat*- **(a)** und des *gus*-Gens **(b)** in der $T_0$ und in $T_1$-Nachkommen der Linie 701. Je 20 µg DNA wurden mit *Hind*III verdaut. Alle $T_1$-Nachkommen wiesen das gleiche Integrationsmuster und die gleiche Kopienanzahl der Integrationen der Elternpflanzen auf.
m: Marker; Wt: Wildtyp; P: Positivkontrolle.

### 3.3.3.2. Untersuchung der GUS-Expression in den Linien B1, B2, M1 und 701

Die Aktivität des *gus*-Gens in den $T_0$-Pflanzen wurde im histochemischen GUS-Assay untersucht.

Hierfür wurden Blätter und Pollen der $T_0$-Pflanzen mit dem X-Gluc Puffer angefärbt (siehe 2.7.). Die Linien B1, B2 und M1 wiesen positive Signale bei Blättern und Pollen auf (Abb. 9). Im Gegensatz zeigten weder Blätter noch Pollen der Linie 701 positive GUS-Signale.

Die Pollenfärbung resultierte, wie für die Gametenbildung der hemizygoten $T_0$-Pflanzen zu erwarten, in einer 50%igen Rate positiver GUS-Signale.

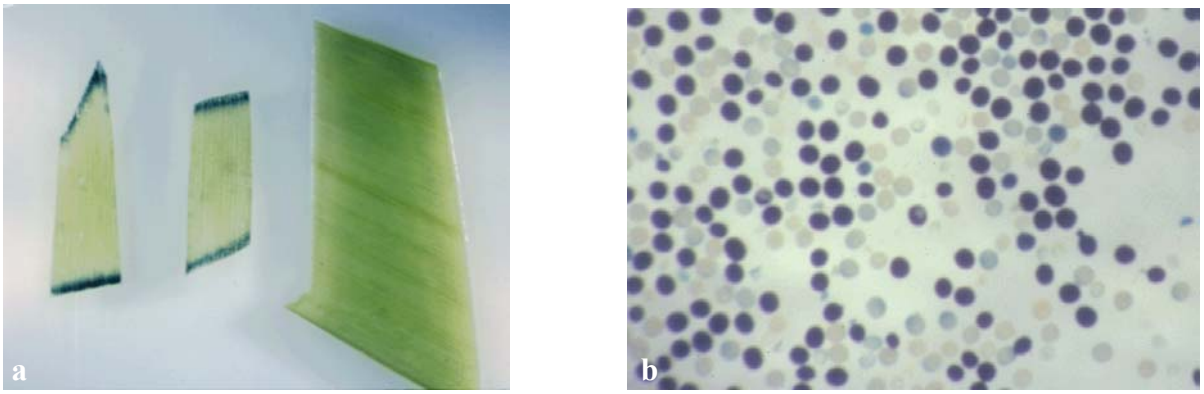



**Abbildung 9:** GUS-Nachweis in der $T_0$ der Linie B1.
**a:** Blattsegmente der $T_0$-Pflanze B1 zeigen nach dem GUS-Nachweis positive Signale an den Blattschnittkanten (links und mittig) im Vergleich zum Kontrollblatt des Wildtyps Bongo Nara (rechts).
**b:** Ca. 50% der angefärbten Pollenkörner weisen GUS-positive Signale auf.

Die GUS-Expression wurde ebenfalls in den Nachkommen der transgenen Linien untersucht. Hierfür wurden $T_1$-Blätter histochemisch in X-Gluc Puffer gefärbt. Die Linien B1 und M1 zeigten positive GUS-Signale. Die Linie 701 war dagegen, wie die Elternpflanze, negativ in Bezug auf die GUS-Expression.

Die Segregation der GUS-positiven $T_1$-Blätter wies, wie für die Vererbung eines dominanten Lokus erwartet, ein Verhältnis von 3:1 auf. Das Resultat korrelierte mit dem Ergebnis für die BASTA-Selektion, da die GUS-negativen $T_1$-Pflanzen den nachfolgenden BASTA-Sprühtest nicht überlebten.

In Abbildung 10 ist exemplarisch der GUS-Färbetest für 12 Nachkommen der Linie B1 gezeigt. Dabei waren von 12 Blattsegmenten 7 positiv und 5 negativ zu GUS.

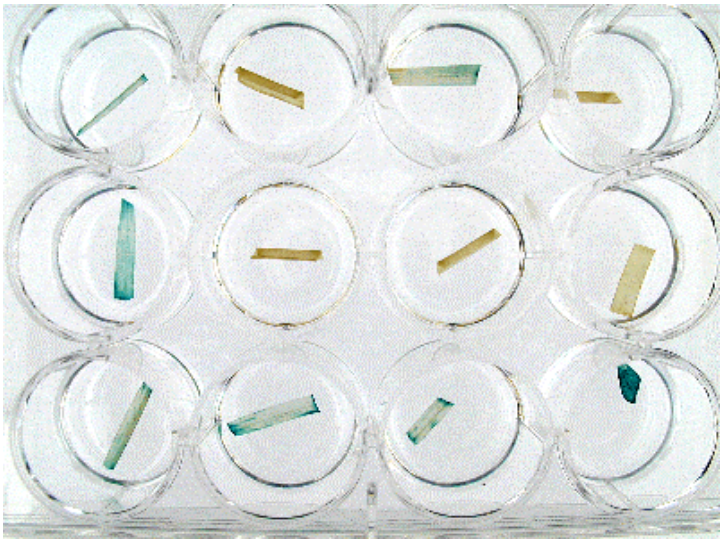


**Abbildung 10:** GUS-Expression in 12 $T_1$-Nachkommen der Linie B1. Unter den gefärbten Blattsegmenten wiesen 7 positive GUS-Signale auf, dagegen waren 5 negativ zu GUS.

Die Expression des *gus*-Gens wurde auch in $T_2$-Nachkommen der Linien B1, M1 und 701 untersucht. Dabei wurde bei keinen der Nachkommen positive GUS-Expression nachgewiesen.

Die Resultate zur Untersuchung der GUS-Expression über zwei Generationen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9**: GUS-Expression bei den transgenen Linien.
Positive GUS-Expression (+), keine GUS-Expression (-), Nachkommen nicht transgen (x).

| Linie / Generation | B1 | M1 | 701 | B2 |
|---|---|---|---|---|
| **$T_0$** | + | + | - | + |
| **$T_1$** | + | + | - | x |
| **$T_2$** | - | - | - | x |

### 3.3.3.3. Nachweis des *afp*-Gens in den Linien B1, M1 und 701

Das *afp*-Gen wurde mittels Southern-Blot Analyse in den $T_0$- und $T_1$-Generationen der Linien B1, M1 und 701 nachgewiesen. Hierfür wurde genomische DNA von $T_1$-Nachkommen verschiedenen Restriktionen unterzogen, um Anzahl der Kopien zu bestimmen und Vollständigkeit der Integrationen zu überprüfen.

Die Analyse zeigte, dass das *afp*-Gen in allen BASTA-resistenten $T_1$-Nachkommen der Linien B1, M1 und 701 vorhanden war. Die Anzahl der integrierten Kopien lag zwischen 4-7. Alle drei Linien besaßen eine vollständige Integration der Promotor-Gen-Terminator Kassette (Abb. 11).

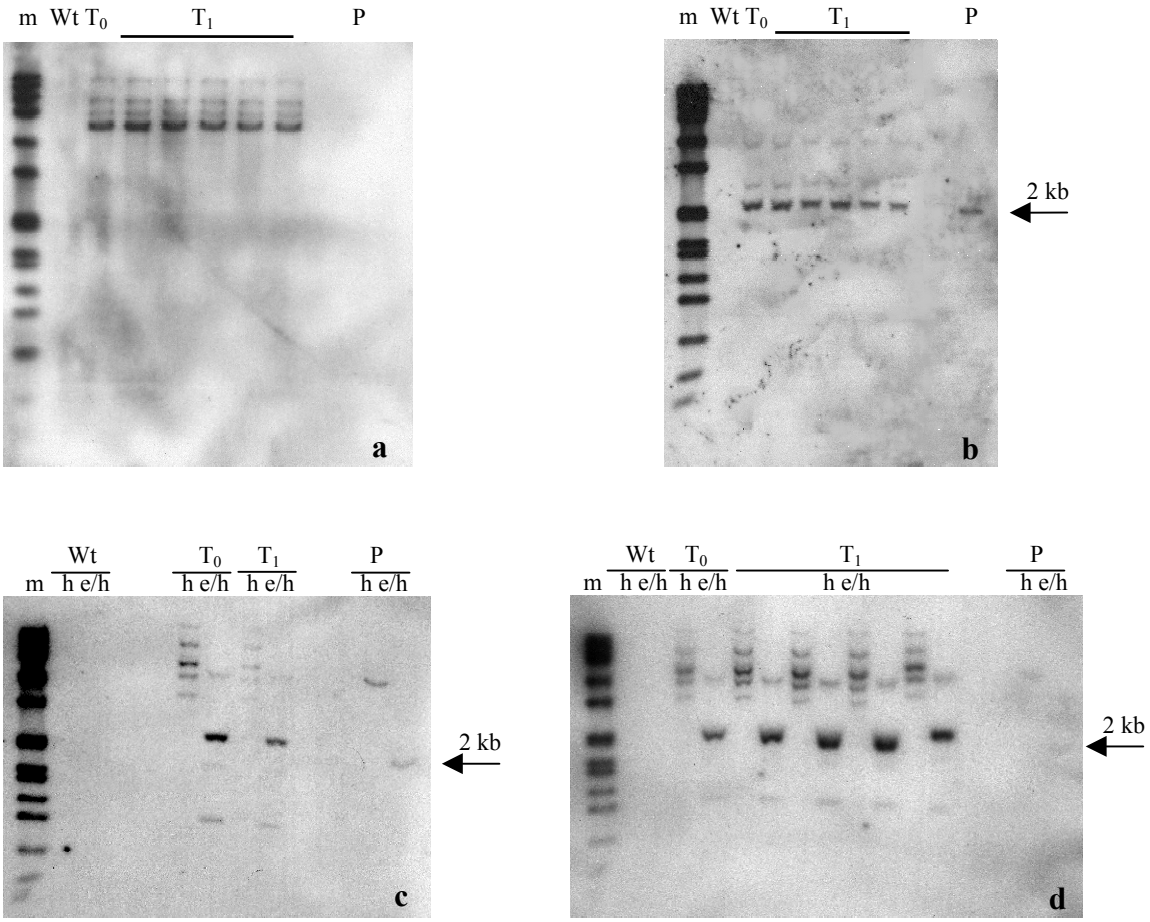



**Abbildung 11:** Nachweis des *afp*-Gens in der $T_0$ und in 5 $T_1$-Nachkommen der Linie B1, 701 und M1.
**a:** Für die Bestimmung der Anzahl integrierter Kopien bei der Linie B1 wurde die DNA mit dem linearisierenden Enzym *Hind*III geschnitten.
**b:** Die Vollständigkeit der Promotor-Gen-Terminator Kassette (2 kb) bei der Linie B1 wurde durch Restriktion mit den Enzymen *Hind*III und *EcoR*I überprüft.
**c:** Nachweis des *afp*-Gens in $T_1$-Nachkommen der Linie 701.
**d:** Nachweis des *afp*-Gens in $T_1$-Nachkommen der Linie M1.
Für die Bestimmung der Anzahl integrierter Kopien wurde die DNA mit dem linearisierenden Enzym *Hind*III geschnitten. Die Vollständigkeit der Promotor-Gen-Terminator Kassette (2 kb) wurde durch Restriktion mit den Enzymen *Hind*III und *EcoR*I überprüft.
m: Marker; Wt: Wildtyp; h: mit *Hind*III verdaut; e: mit *EcoR*I verdaut; P: Positivkontrolle.

### 3.3.3.4. Nachweis des *leapep20*-Gens in den Linien 70L1 und 70L2

Genomische DNA der $T_0$-Pflanzen 70L1 und 70L2 wurde nach Restriktion und Auftrennung durch Southern-Blot Analyse mit einer DIG-markierten *leapep20*-Sonde hybridisiert. Die molekulare Analyse zeigte, dass die Linie 70L1 eine einfache Integration des Transgens aufwies, während die Linie 70L2 bis zu 20 Integrationen hatte. Eine vollständige Integration des Transgens war durch Ausschneiden der Promotor-Gen-Terminator Kassette mit *Hind*III und *EcoR*I zunächst nur bei 70L2 zu beobachten.

Durch Restriktion der genomischen DNA von 70L1 mit dem Enzym *Pae*I, welches im 5'Bereich der Genkassette stromabwärts von der *Hind*III Schnittstelle schneidet, konnte gezeigt werden, dass hier ebenfalls eine vollständige Kopie der Promotor-Gen-Terminator Kassette integriert wurde(Abb. 12).

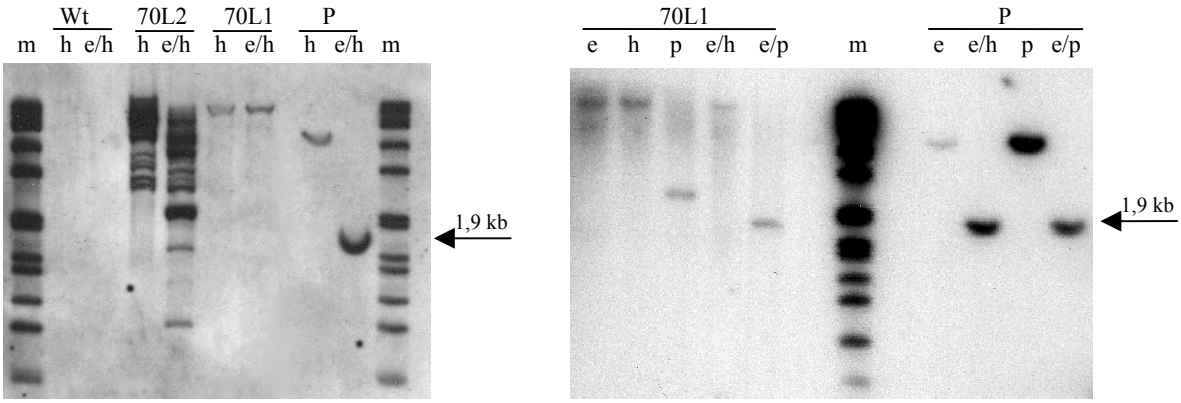



**Abbildung 12:** Nachweis des *leapep20*-Gens in den $T_0$-Pflanzen 70L1 und 70L2.
Die Anzahl der integrierten Kopien wurde durch Restriktion mit dem linearisierenden Enzym *Hind*III bestimmt. Die Vollständigkeit der Promotor-Gen-Terminator Kassette wurde durch Verdau mit den Enzymen *EcoR*I und *Hind*III bzw. mit *EcoR*I und *Pae*I überprüft. m: Marker; Wt: Wildtyp; h: mit *Hind*III verdaut; e: mit *EcoR*I verdaut; p: mit *Pae*I verdaut; P: Positivkontrolle.

Der Nachweis des *leapep20*-Gens erfolgte auch für die $T_1$-Nachkommen.

Die Pflanze 70L1 war steril. Die kultivierte $T_0$-Elternpflanze zeigte zwar normales Wachstum, an den Ähren wurden jedoch keine Körner gebildet.

$T_1$-Samen der fertilen Linie 70L2 wurden ausgesät und in einem BASTA-Sprühtest auf das Vorhandensein des *pat*-Gens untersucht. Von den BASTA-resistenten $T_1$-Pflanzen wurde in einer Southern-Blot Analyse das *leapep20*-Gen nachgewiesen (Abb. 13).

Die molekulare Analyse zeigte, dass alle untersuchten BASTA-resistenten $T_1$-Nachkommen das *leapep20*-Gen enthielten und dass sie das gleiche Integrationsmuster der Elternpflanze aufwiesen.

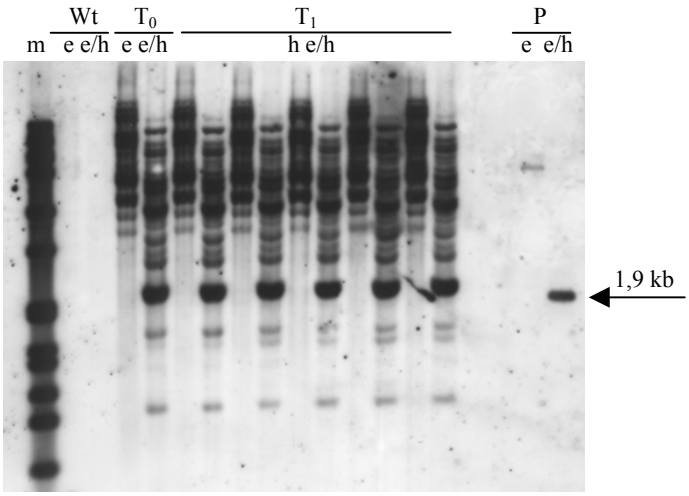



**Abbildung 13:** Nachweis des *leapep20*-Gens in $T_1$-Nachkommen der Linie 70L2. Für die Bestimmung der Anzahl integrierter Kopien wurde die DNA mit dem linearisierenden Enzym *EcoR*I geschnitten. Die Vollständigkeit der Promotor-Gen-Terminator Kassette (1,9 kb) wurde durch Restriktion mit den Enzymen *Hind*III und *EcoR*I überprüft.
Die Analyse zeigte, dass die $T_1$-Nachkommen das gleiche Integrationsmuster der $T_0$-Pflanze aufwiesen.
m: Marker; Wt: Wildtyp; h: mit *Hind*III verdaut; e: mit *EcoR*I verdaut; P: Positivkontrolle.

### 3.3.3.5. Segregation des *pat*-Selektionsmarkergens in der $T_1$-Generation

Um die Segregation des *pat*-Gens zu ermitteln, wurden $T_1$-Samen aller fertilen transgenen Linien ausgesät. Die Keimlinge wurden im Alter von 2 Wochen mit dem BASTA-Sprühtest auf Herbizidresistenz untersucht.

Bei den Linien B1, M1 701 und 70L2 konnte festgestellt werden, dass die Segregation von herbizidresistenten zu herbizidanfälligen $T_1$-Pflanzen ein Verhältnis von 3:1 aufwies, welches den erwarteten Wert für die Segregation eines dominanten Lokus darstellt.

Die Aufspaltung der Herbizidresistenz in der $T_1$-Generation, mit Ausnahme der sterilen Pflanze 70L1 und der Linie B2, deren Nachkommen nicht transgen sind, ist in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Segregation des Selektionsmarkergens *pat*.

| Linie | Ausgewertete $T_1$-Pflanzen | BASTA-resistente Pflanzen | Segregation |
|---|---|---|---|
| **B1** | 108 | 77 | 3:1 |
| **M1** | 96 | 73 | 3:1 |
| **701** | 102 | 72 | 3:1 |
| **70L2** | 77 | 59 | 3:1 |

### 3.3.3.6. Selektion homozygoter $T_2$-Linien

Zur Identifizierung homozygoter Linien unter den $T_1$-Nachkommen wurde die Segregation der transgenen Linien durch mehrfache Aussaat von je 25 Samen der $T_2$-Generation und Selektion mittels des BASTA-Sprühtests untersucht. Linien, bei denen die $T_2$-Nachkommen keine Aufspaltung bezüglich der Herbizidresistenz festgestellt wurde, galten in Bezug auf den Selektionsmarker *pat* als homozygot.

Auf diese Weise wurden $T_2$-Samen der *afp*-Linien B1, M1 und 701 getestet. Hierfür wurden $T_2$-Samen ausgesät und mit 200 mg/l BASTA selektiert.

Von der *afp*-Linie M1 konnte eine und von der *afp*-Linie 701 zwei homozygote Linien identifiziert werden. Von der *afp*-Linie B1 konnte bisher keine homozygote Linie isoliert werden.

Nachkommen der fertilen *leapep20*-Linie 70L2 befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse in der $T_1$-Generation, daher konnte keine Analyse der $T_2$-Generation erfolgen.

## 3.4. Transkriptionsanalysen der antifungalen Gene

Um die Transkription des integrierten antifungalen Gens *afp* und des antimikrobiellen Gens *leapep20* in den transgenen Linien zu untersuchen, wurde die reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) Analyse angewandt (siehe 2.8.5.). Nach Behandeln der Gesamt-RNA mit dem enzym DNase I wurde zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase unter Anwenden genspezifischer Primer aus Gesamt-RNA die entsprechende *c*DNA hergestellt. In einer anschließenden PCR wurden aus der *c*DNA mit Hilfe genspezifischer Primer die spezifischen Fragmente amplifiziert.

Um eine Kontamination der RNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen wurde parallel eine Kontroll-PCR direkt aus der isolierten RNA durchgeführt.

### 3.4.1. Transkriptionsanalyse des *afp*-Gens in den Linien B1, M1 und 701

Die Transkription des *afp*-Gens in $T_1$-Nachkommen der Linien B1, M1 und 701 wurde mittels RT-PCRAnalyse mit den genspezifischen Primern AFP1 und AFP2 untersucht (siehe 2.4.). Bei den Linien M1 und 701 wurde die Transkription in den selektierten homozygoten $T_2$-Linien untersucht. Die Transkription des *afp*-Gens in Linie B1 wurde in BASTA-resistenten $T_1$-Nachkommen nachgewiesen.

Die RT-PCR Analyse ist in Abbildung 14 zu sehen. Ein erwartetes Fragment der Größe 277 bp konnte bei den *afp*-Linien 701, B1 sowie bei der *afp*-Linie M1 nachgewiesen werden.

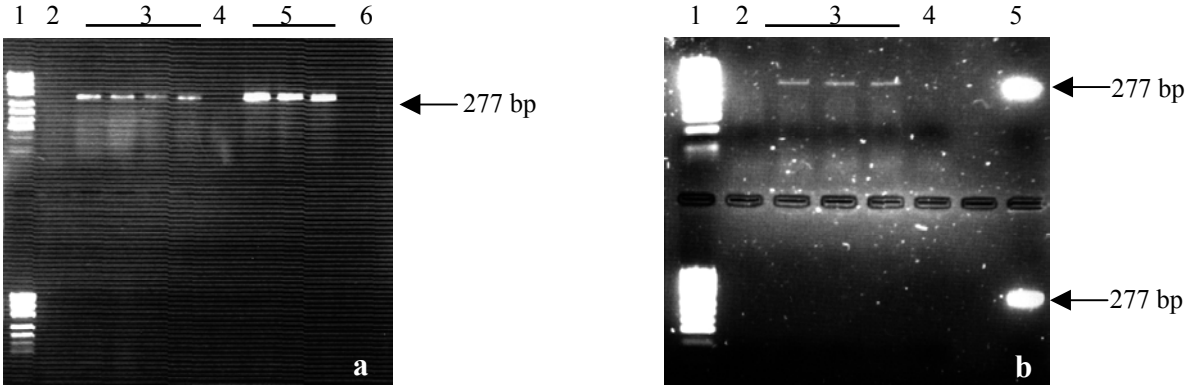



**Abbildung 14:** Nachweis der Transkription des *afp*-Gens in RT-PCR-Analyse der Linien 701, B1 und M1. In der oberen Gelhälfte ist die Amplifikation aus der *c*DNA zu sehen. Bei allen untersuchten Proben konnte das Fragment der erwarteten Größe (277bp) detektiert werden.
Die untere Gelhälfte zeigt die Kontroll-PCR aus Gesamt-RNA. Erwartungsgemäß wurden keine Fragmente amplifiziert, was eine Kontamination mit genomischer DNA ausschließt.
**a:** Transkriptionsnachweis des *afp*-Gens bei den Linien 701 und B1.
1: Marker; 2, 4: Wildtyp; 3: $T_2$-Nachkommen der Linie 701; 5: $T_1$-Nachkommen der Linie B1; 6: $H_2O$-Kontrolle.
**b:** Transkriptionsnachweis des *afp*-Gens bei der Linie M1.
1: Marker; 2: Wildtyp; 3: $T_2$-Nachkommen der Linie M1; 4: $H_2O$-Kontrolle; 5: Positivkontrolle.

### 3.4.2. Transkriptionsanalyse des *leapep20*-Gens in den Linien 70L1 und 70L2

Die RT-PCR Analyse der Elternpflanzen 70L1 und 70L2 ist in Abbildung 15a gezeigt. Bei der Pflanze 70L1 wurde mit den Primern L1 und L2 ein Fragment der erwarteten Größe von 150 bp amplifiziert (siehe 2.4.). Dagegen konnte beim Wildtyp bzw. der Pflanze 70L2 kein entsprechendes Fragment nachgewiesen werden.

Hybridisierung dieser Fragmente mit einer DIG-markierten *leapep20*-DNA-Sonde bewies, dass es sich dabei um ein spezifisches *c*DNA Fragment handelt (Abb. 15b).

Diese Analyse zeigte, dass die Linie 70L1, die eine einfache Integration des *leapep20*-Gens aufweist, eine vollständige *leapep20 m*RNA bildete. Dagegen erfolgte keine Transkription dieses Gens in der Pflanze 70L2.

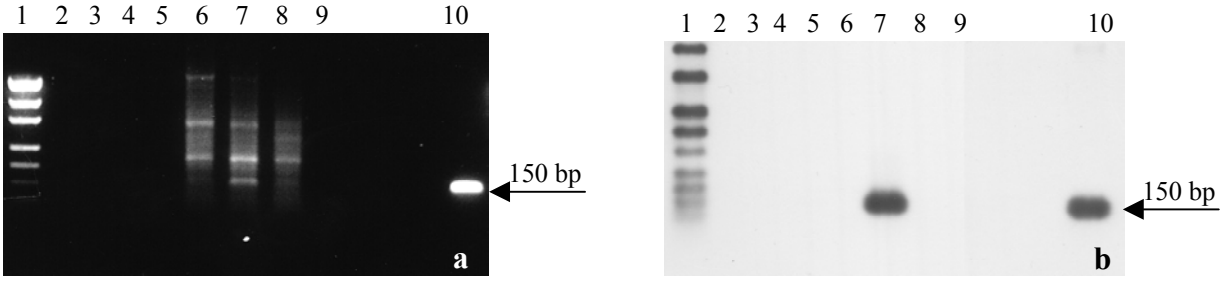



**Abbildung 15:** Nachweis des *leapep20* Transkripts bei den Pflanzen 70L1 und 70L2.
**a:** RT-PCR Analyse. Eine Bande der richtigen Größe war nur bei der Pflanze 70L1 nachzuweisen (Spur 7).
**b:** Hybridisierung der RT-PCR-Fragmente mit einer DIG-markierten *leapep20*-Sonde. Ein spezifisches Signal konnte erwartungsgemäß nur bei der Pflanze 70L1 (Spur 7) detektiert werden.
1: Marker; 2, 3, 4: PCR aus Gesamt-RNA von Wt, 70L1, 70L2 mit den Primern L1 und L2; 5: $H_2O$-Kontrolle; 6, 7, 8: Amplifikation aus *c*DNA von Wt, 70L1, 70L2; 9: $H_2O$-Kontrolle; 10: Positivkontrolle.

Die Transkription des *leapep20*-Gens in $T_1$-Nachkommen der fertilen Linie 70L2 wurde ebenfalls mittels RT-PCR untersucht. Die Analyse zeigte, dass bei einigen der $T_1$-Nachkommen, welche das *leapep20*-Gen trugen, eine Bande der erwarteten Größe von 150 bp detektiert werden konnte (Abb. 16a). Eine nachfolgende Hybridisierung mit einer DIG-markierten *leapep20*-Sonde zeigte, dass das Fragment nicht spezifisch war und dass in den $T_1$-Nachkommen, wie bereits für die Elternpflanze demonstriert, kein Transkript des *leapep20*-Gens nachgewiesen werden konnte (Abb. 16b).

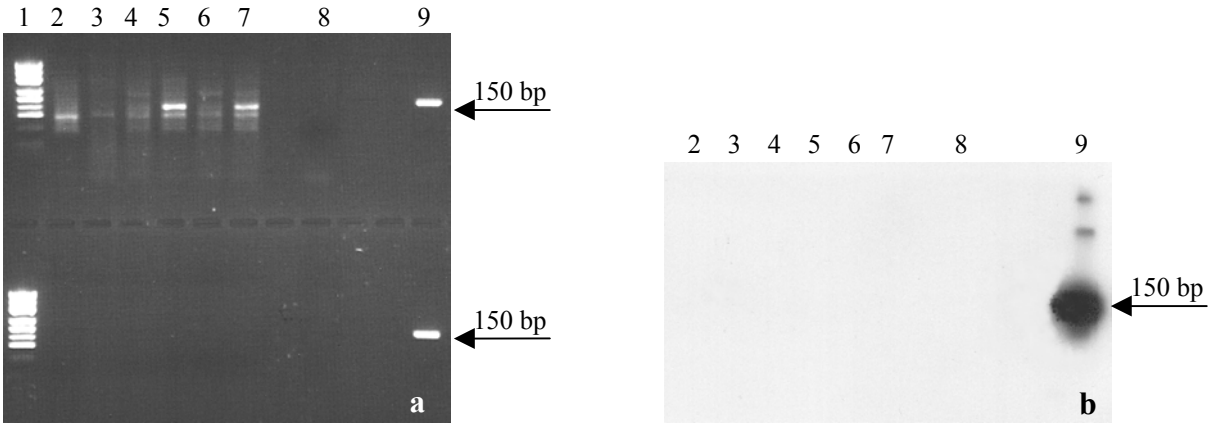



**Abbildung 16:** Nachweis des *leapep20*-Transkripts bei der Linie 70L2.
**a:** RT-PCR Analyse. In der oberen Gelhälfte wurde die RT-PCR von Wildtyp, $T_0$- und 4 $T_1$-Nachkommen der Linie 70L2 aufgetragen. In der unteren Gelhälfte ist die Kontroll-PCR aus Gesamt-RNA der gleichen Proben zu sehen. Bei zwei der Nachkommen war eine Bande der erwarteten Größe von 150 bp zu sehen.
**b**: Hybridisierung der RT-PCR Fragmente mit einer DIG-markierten *leapep20*-Sonde. Die in der RT-PCR detektierten Signale waren nicht spezifisch, da mit Ausnahme der Positivkontrolle weder bei der $T_0$-Pflanze noch bei den $T_1$-Nachkommen eine Hybridisierung erfolgte.
1: Marker; 2: Wt; 3: $T_0$-70L2; 4, 5, 6, 7: $T_1$-Nachkommen der Linie 70L2; 8: $H_2O$-Kontrolle; 9: Positivkontrolle.

Mit Hilfe des hier etablierten Transformationssystems konnte Perlhirse stabil transformiert werden. Die Integration, Vererbung und die Transkription der Transgene wurde bereits mittels molekularbiologischer Untersuchungen nachgewiesen.

### 3.5. Phytopathologische Untersuchungen

Um die transgenen Pflanzen mit Expression des *afp*-Gens auf ihr Resistenzverhalten zu untersuchen, wurden *in vitro* phytopathologische Tests mit den zwei potentiellen Krankheitserregern der Perlhirse, *Pyricularia grisea* und *Puccinia substriata,* durchgeführt.

### 3.5.1. Wachstumsinhibition von *Pyricularia grisea*

Der Einfluss des antifungalen Proteins *Ag*-AFP und des antimikrobiellen Peptids Pep20 auf das Myzelwachstum von *Pyricularia grisea* wurde in einem Wachstumsinhibitionstest *in vitro* untersucht (siehe 2.9.2.).

Hierfür wurde in 2 Wiederholungen dem Wachstumsmedium YEG verschiedene Konzentrationen von *Ag*-AFP bzw. Pep20 zugesetzt. Als Kontrolle wurde der Pilz auf YEG-Agar ohne Zusatz von Peptiden kultiviert. Das Wachstum des Pilzes wurde im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abb. 17).

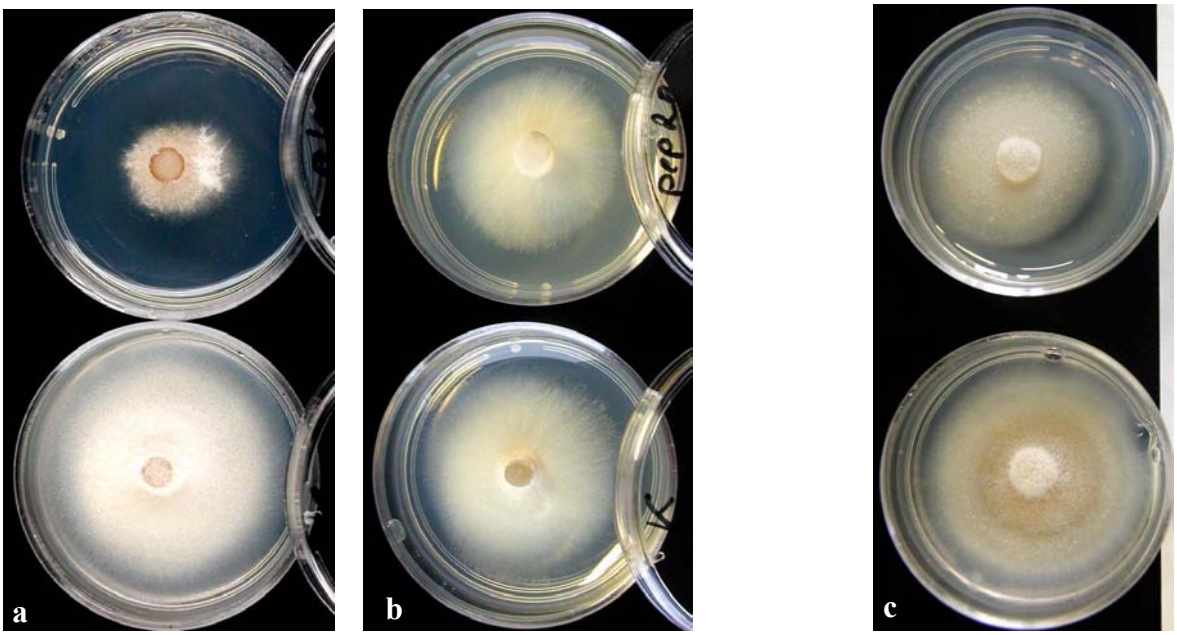



**Abbildung 17:** Wachstumsinhibition von *P. grisea* nach Inkubation mit dem antifungalen Protein *Ag*-AFP bzw. dem antimikrobiellen Peptid Pep20 (obere Platte) im Vergleich zum normalen Myzelwachstum von *P. grisea* auf YEG-Medium (untere Platte).
**a:** Gehemmtes Myzelwachstum bei einer *Ag*-AFP-Konzentration von 10 µM.
**b:** Leicht reduziertes Myzelwachstum bei einer Pep20-Konzentration von 50 µM.
**c:** Leicht reduziertes Myzelwachstum bei einer Pep20-Konzentration von 400 µM.

Bei einer *Ag*-AFP Konzentration von 5 µM konnte eine schwache Wachstumshemmung festgestellt werden. Eine *Ag*-AFP Konzentration von 10 µM bewirkte eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums (Abb. 17a).

Das Peptid Pep20 bewirkte ab einer Konzentration von 50 µM eine leichte Wachstumshemmung von *P. grisea* im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 17b). Eine Erhöhung der Pep20 Konzentration auf 400 µM hatte keine weitere signifikante Reduktion des Pilzwachstums zur Folge (Abb. 17c).

### 3.5.2. *In vitro* Infektion von Blattsegmenten mit *Puccinia substriata*

Um den Einfluss der Transgenexpression des *Ag*-AFPs auf die Pilzresistenz von Perlhirse zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Infektionstest mit dem Rosterreger *Puccinia substriata* durchgeführt (siehe 2.9.4.). Dabei wurden Blattsegmente der transgenen Nachkommen und der Wildtypen unter den gleichen Bedingungen mit Pilzsporen inokuliert. Von den *afp*-Linien 701 und M1 wurden jeweils die homozygoten $T_2$-Nachkommen getestet, während von der *afp*-Linie B1 die $T_1$-Nachkommen untersucht wurden.

Die Sporendichte wurde für die einzelnen Versuche bestimmt und variierte zwischen 2 und 20 Sporen/mm$^2$. Die gleichmäßige Verteilung der Sporen in dem Inokulationsturm wurde mittels Zählkammern überprüft.

Die Auswertung erfolgte 10 Tage nach Infektion durch Auszählung der gebildeten Pusteln. Um die Infektionstests zu kontrollieren, wurden als Referenz nicht infizierte Blattsegmente parallel inkubiert. Diese Nullkontrollen wiesen zum Zeitpunkt der Auswertung keine chlorotischen oder nekrotischen Symptome auf (Abb. 18).

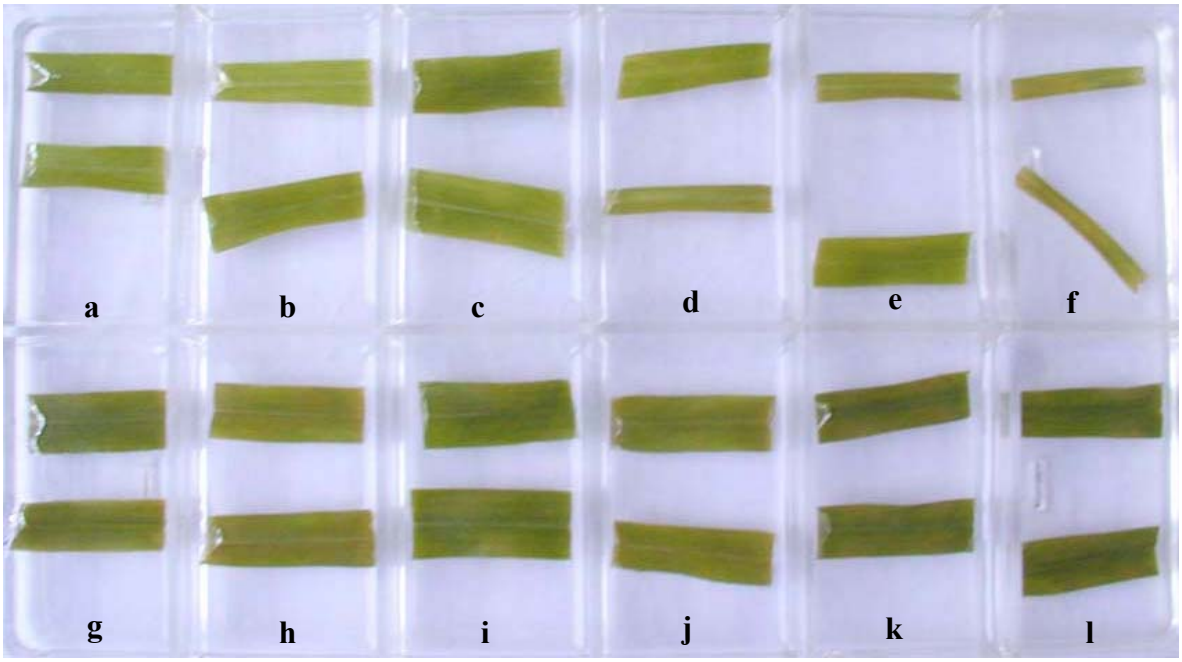



**Abbildung 18:** Nullkontrolle der Infektionstests. Nicht inokulierte Blattsegmente von Wildtypen und *afp*-Pflanzen 10 Tage nach Inkubation auf Wasseragar mit 40 mg/l Benzimidazol.
**a, b:** Wt 7042. **c, d:** Wt Manga Nara. **e, f:** Wt Bongo Nara.
**g, h:** $T_2$-Nachkommen der Linie 701. **i, j:** $T_2$-Nachkommen der Linie M1. **k, l:** $T_1$-Nachkommen der Linie B1.

Im Folgenden ist die Auswertung der Ergebnisse von jeweils 3 unabhängigen Infektionstests für die einzelnen Linien zusammengefasst. Die detaillierten Infektionsdaten sind den Tabellen 1-9 im Anhang zu entnehmen.
Für die Auswertung der Versuche wurden 10 Tage nach Infektion die gebildeten Pusteln auf den Blattsegmenten gezählt, wobei für jede untersuchte Pflanze der Mittelwert aus 3 Blattsegmenten gebildet wurde. Der Infektionsgrad des Wildtyps wurde in jedem unabhängigen Versuch einem 100%igen Befall gleichgesetzt (siehe 2.9.4.).

**Infektion der *afp*-Linien M1 und 701**

Die durchgeführten *in vitro* Infektionstests zeigten, dass bei den homozygoten $T_2$-Nachkommen der *afp*-Linien M1 und 701 eine deutliche Reduktion des Befalls im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen wurde. Den Tabellen 1-6 im Anhang ist zu entnehmen, dass in allen unabhängigen Infektionsversuchen bei der *afp*-Linie M1 durchschnittlich nur 11,2% Befall und bei der *afp*-Linie 701 nur 8,6% des Befalls im Vergleich zum Wildtyp erreicht wurden, was einer ca. 90%igen Befallsreduktion dieser Linien gegenüber dem Erreger *P. substriata* entsprach.
Der Befallsgrad der Blattsegmente war sehr variabel. Bei mehr als der Hälfte der untersuchten Pflanzen waren auf den infizierten Blattsegmenten keine Pusteln nachzuweisen (Abb. 22a und b). Während bei den restlichen Blattsegmenten ein geringer Befall von 0,4-15% zu beobachten war, zeigten einige Blattsegmente einen starken Befall von mehr als 80%.
Die Ergebnisse von 3 unabhängigen Infektionstests sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Befallsgrad bei den *afp*-Linien M1 und 701 in 3 unabhängigen Infektionstests.

| Linie | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Mittelwert des Befalls |
|---|---|---|---|---|
| **M1** | 10,6% | 8,5% | 14,5% | 11,2% |
| **701** | 14,3% | 6% | 5,5% | 8,6% |

Abbildungen 19 und 20 zeigen exemplarisch einen Infektionstest von Blattsegmenten der homozygoten $T_2$-Nachkommen der Linien M1 und 701.

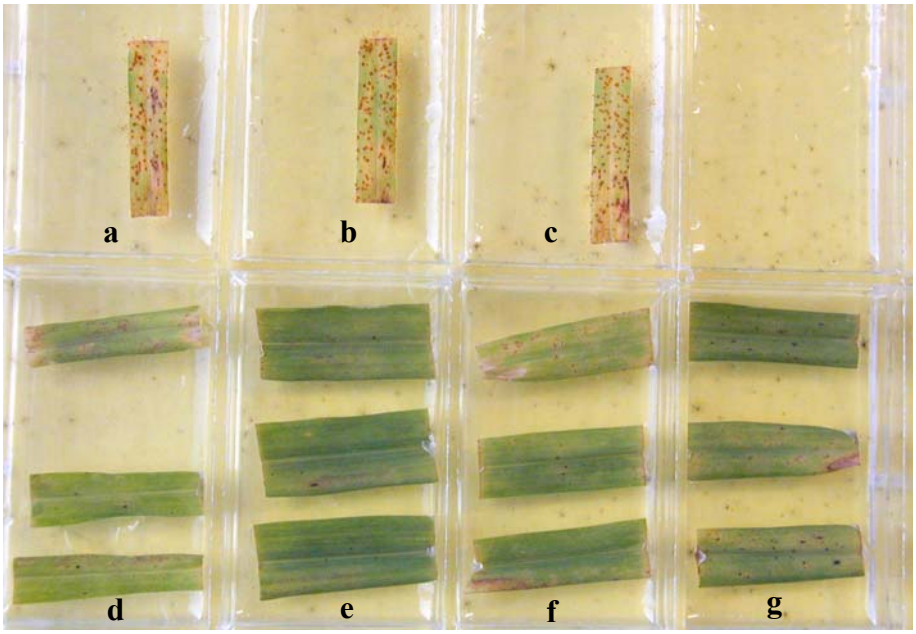



**Abbildung 19:** Blattinfektionstest von $T_2$-Nachkommen der Linie M1.
**a, b, c:** Blattsegmente des Wildtyps Manga Nara. **d, e, f, g:** jeweils 3 Blattsegmente von 4 homozygoten $T_2$-Nachkommen. Die Pustelbildung war deutlich auf den Wildtyp Blattsegmenten zu sehen, dagegen zeigten die transgenen Pflanzen eine leichte oder gar keine Infektionssymptome.

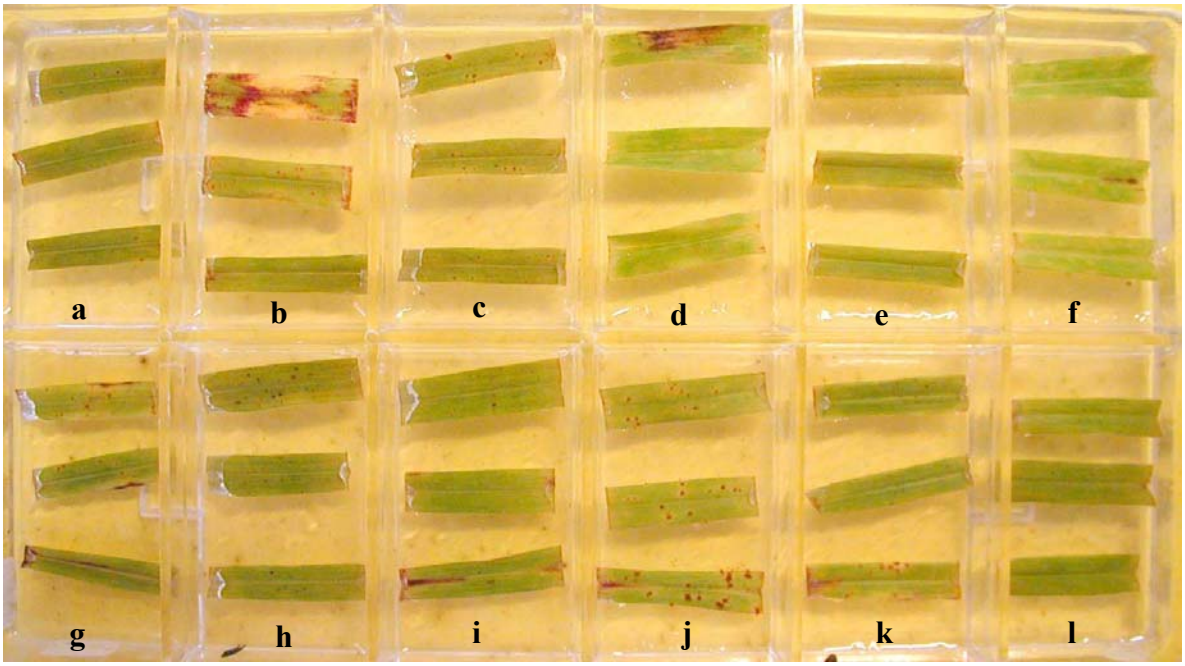



**Abbildung 20:** Blattinfektionstest von $T_2$-Nachkommen der Linie701.
**c**, **j:** Blattsegmente des Wildtyps 7042.
**a, b, d, e, f, g, h, i, k, l:** jeweils 3 Blattsegmente von 10 homozygoten $T_2$-Nachkommen.
Die Pustelbildung war deutlich auf den Wildtyp Blattsegmenten zu sehen, dagegen zeigten die transgenen Pflanzen eine leichte oder gar keine Infektionssymptome.

### Infektion von Blattsegmenten der *afp*-Linie B1

Den Tabellen 7-9 im Anhang ist zu entnehmen, dass sich die $T_1$-Nachkommen der *afp*-Linie B1 durch eine 76,4%ige Steigerung der Resistenz gegenüber dem Erreger *P. substriata* auszeichneten. Bei den transgenen Nachkommen wurde durch den Rosterreger im Durchschnitt nur 23,6% des Befalls im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Unter den $T_1$-Nachkommen, die sich in ihrem Zygotiestatus unterscheiden, konnte eine Spaltung bezüglich des Infektionsbilds beobachtet werden. Blattsegmente von $T_1$-Nachkommen, die die nachfolgende BASTA-Selektion nicht überstanden, waren nicht transgen und somit anfällig für den Pilz (Abb. 21k und l). Innerhalb der BASTA-resistenten $T_1$-Pflanzen befanden sich homo- und hemizygote Nachkommen, die sich in ihrer Resistenz unterschieden. Der Befallsgrad lag für diese Pflanzen zwischen 0-126% im Vergleich zum Wildtyp. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Infektionstests aufgeführt.

**Tabelle 12:** Befallsgrad bei der *afp*-Linien B1 in 3 unabhängigen Infektionstests.

| Linie | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Mittelwert des Befalls |
|---|---|---|---|---|
| **B1** | 14,3% | 22,6% | 34% | 23,6% |

Abbildung 21 zeigt exemplarisch einen Infektionstest von $T_1$-Nachkommen der Linie B1.

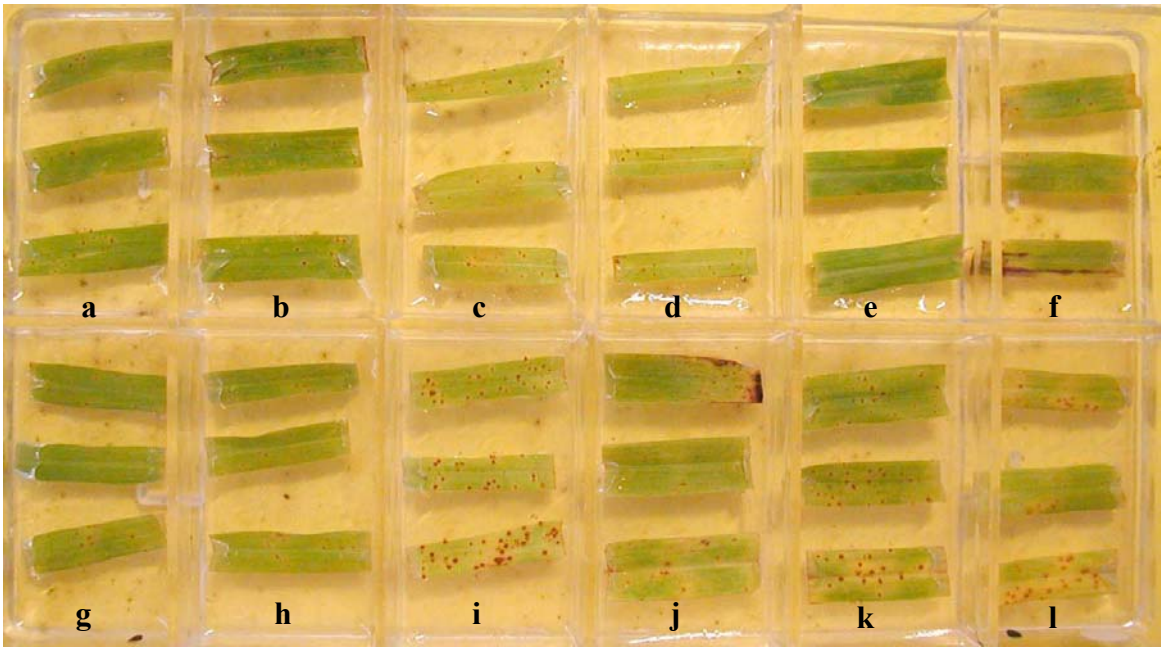



**Abbildung 21:** Blattinfektionstest von $T_1$-Nachkommen der Linie B1.
**c, d, i:** Blattsegmente des Wildtyps Bongo Nara.
**a, b, e, f, g, h, j, k, l:** jeweils 3 Blattsegmente von 9 $T_1$-Nachkommen.
Die Pustelbildung war deutlich auf den Wildtyp Segmenten zu sehen, dagegen zeigten die transgenen Pflanzen eine leichte oder gar keine Infektionssymptome.

Bei allen untersuchten Linien zeigten viele der Blattsegmente resistenter Pflanzen eine starke hypersensitive Reaktion (*HR*), die als unterschiedlich große, lokal begrenzte dunkle Läsionen erkennbar war (Abb. 22c und 22d).

Insgesamt konnte bei allen 3 transgenen *afp*-Linien M1, B1 und 701 eine verzögerte Pustelbildung festgestellt werden. Während schon nach 6 Tagen die Vermehrung der Pilzsporen bei den Wildtyppflanzen zu sehen war, wiesen die transgenen Blätter keine Infektionssymptome auf. Ferner waren die Pusteln 10 Tage nach Infektion auf den transgenen Blattsegmenten kleiner als bei den Kontrollen (Abb. 22e).

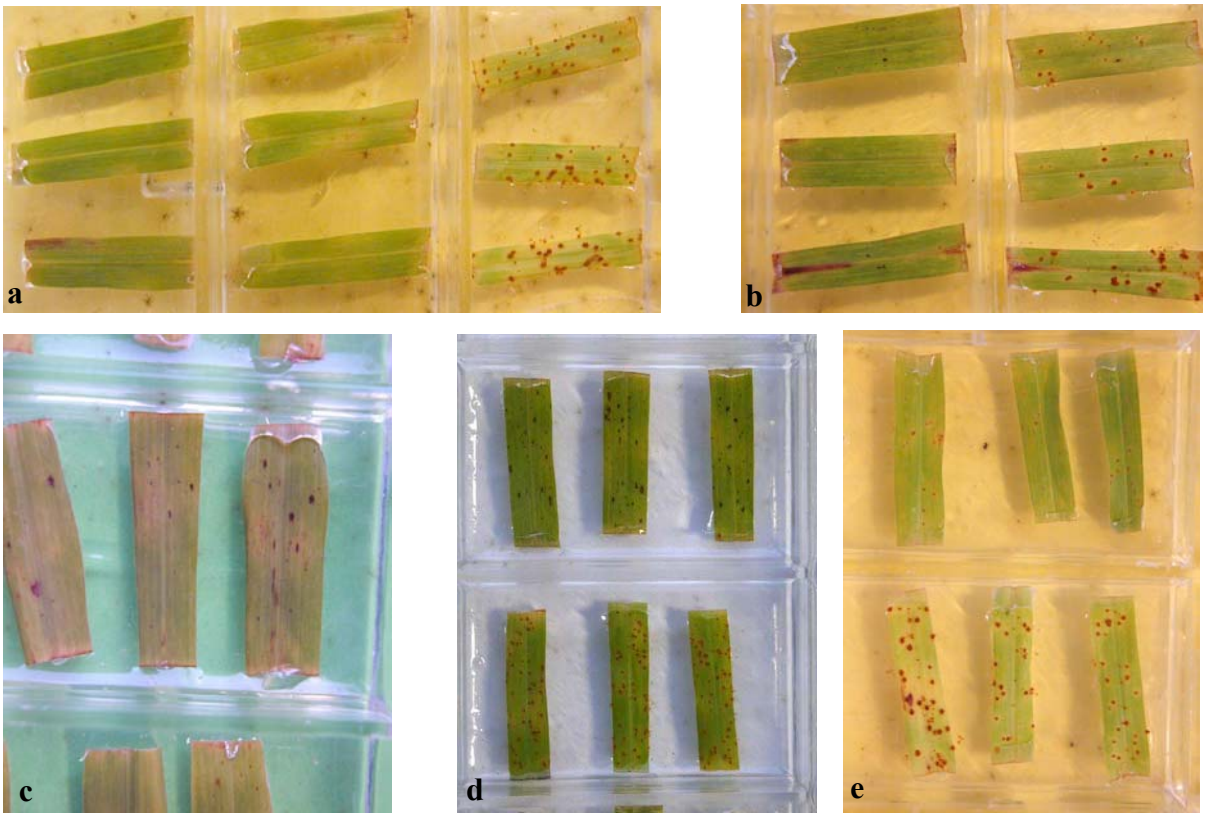



**Abbildung 22:** Verschiedene Aspekte der Infektion von Nachkommen der transgenen *afp*-Linien 10 Tage nach Infektion.
**a:** Infektionstest von 2 transgenen $T_2$-Nachkommen der *afp*-Linie M1 (links und Mitte) im Vergleich zur Wildtypkontrolle Manga Nara. Die Pustelbildung war auf den Wildtypblättern deutlich zu sehen, dagegen zeigten die transgenen Pflanzen keine Infektionssymptome.
**b:** Infektionstest von $T_2$-Nachkommen der *afp*-Linie 701 (links) im Vergleich zur Wildtypkontrolle 7042. Die Pustelbildung war auf den Wildtypblättern deutlich zu sehen, dagegen zeigten die transgenen Pflanzen keine Infektionssymptome.
**c:** Hypersensitive Reaktion (*HR*) gekennzeichnet durch die Bildung von begrenzten Läsionen auf Blattsegmenten einer homozygoten $T_2$-Pflanze der *afp*-Linie M1.
**d:** Starke *HR* bei $T_2$-Nachkommen der *afp*-Linie 701 (oben) im Vergleich zur anfälligen Wildtypkontrolle (unten).
**e:** Verzögerte Pustelbildung bei $T_1$-Nachkommen der Linie *afp*-B1 (oben) im Vergleich zur Wildtypkontrolle Bongo Nara (unten). Die Pusteln bei der Wildtypkontrolle waren deutlich größer als bei der transgenen Pflanze.

Insgesamt konnten, trotz der Anwendung verschiedener Sporenkonzentrationen für die Infektionen, keine Unterschiede in dem Verlauf der Infektion bzw. dem Ausmaß der Resistenz festgestellt werden.

Mit den hier durchgeführten *in vitro* Infektionstests wurde gezeigt, dass die Expression des *afp*-Gens in den transgenen Linien 701, M1 und B1 zu einer deutlichen Steigerung ihrer Resistenz gegenüber dem Rosterreger *Puccinia substriata* führte. Abbildung 23 fasst die Ergebnisse der durchgeführten phytopathologischen Untersuchungen zusammen.

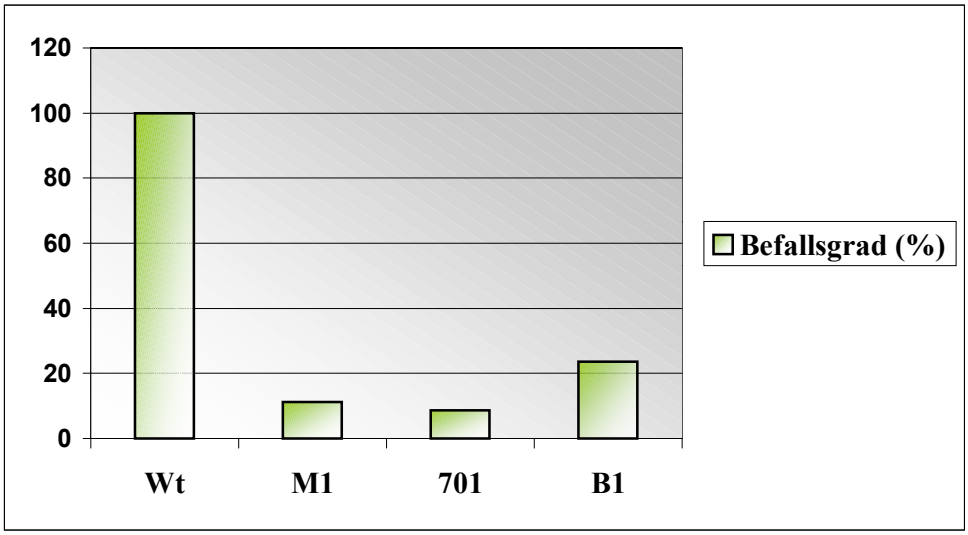



**Abbildung 23:** Verbesserte Pilzresistenz bei den *afp*-exprimierenden Linien.
Die *afp*-Linien zeigten einen deutlich reduzierten Befall von 11,2% für M1, 8,6% für 701 und 23,6% für B1 im Vergleich zum 100%igen Befall beim Wildtyp.

### 3.6. Etablierung einer regenerationsfähigen *in vitro* Suspensionskultur

Um eine zum Partikelbeschuss von Embryonen alternative Transformationsmethode von Perlhirse zu entwickeln, wurde ein neues effizientes Regenerationssystem aus einer Suspensionskultur etabliert (siehe 2.6.).

Für die Etablierung der Suspensionskultur wurden verschiedene Explantate als Ausgangsgewebe getestet. Sowohl frisch isolierte unreife zygotische Embryonen als auch embryogener Kallus des Perlhirse Genotyps 7042 wurden als Ausgangsmaterial für die Induktion der Kultur verwendet. Der embryogene Kallus wurde aus unreifen zygotischen Embryonen nach Kultivierung auf festem L3D2,5B0,1-Medium für 4 Wochen bei 26°C und Dunkelheit gewonnen (Morgenstern, 2000).

Zunächst wurden je 10 unreife Embryonen bzw. 10 Kalli eines Durchmessers von ca. 0,5 cm in einem Volumen von 5 ml flüssigem L3D2,5B0,1-Medium ohne bzw. unter Schütteln bei

60 rpm und 26°C im Dunkeln kultiviert. Dabei wurden die Explantate mit dem Medium vollständig überschichtet. Nach Ablauf von 7 Tagen konnte bei keinem der Ansätze eine Bildung neuer embryogener Strukturen beobachtet werden. Die Explantate verbräunten und starben ab.

Des weiteren wurden die Embryonen bzw. Kalli in einem kleineren Volumen des flüssigen L3D2,5B0,1-Mediums kultiviert. Hierfür wurden je 3-4 Explantate in 1 ml Medium ohne bzw. unter leichtem Schütteln bei 60 rpm inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Explantate nicht vollständig vom Medium bedeckt wurden. Dieses erwies sich für die Embryonen, auf Grund ihrer geringen Größe im Vergleich zu den Kalli, als schwer durchführbar. Nach Ablauf von 7 Tagen konnte die Bildung neuer embryogener Strukturen bei den unter Schütteln kultivierten Kalli beobachtet werden. Die ohne Schütteln kultivierten Kalli und die Embryonen verfärbten sich dagegen braun und starben ab.

Die Kallusvorkultur wurde für weitere 3-4 Wochen kultiviert. Dabei wurde wöchentlich die Hälfte des flüssigen Mediums ausgewechselt. Ansätze, bei denen das Medium vollständig erneuert wurde, zeigten eine stark verlangsamte bzw. keine Proliferation embryogener Strukturen.

Anschließend wurde die dichter gewachsene Vorkultur in ein größeres Volumen von 10 ml überführt und unter Schütteln bei 60 rpm und 26°C im Dunkeln erhalten. Das Medium wurde wöchentlich erneuert (Abb. 24).

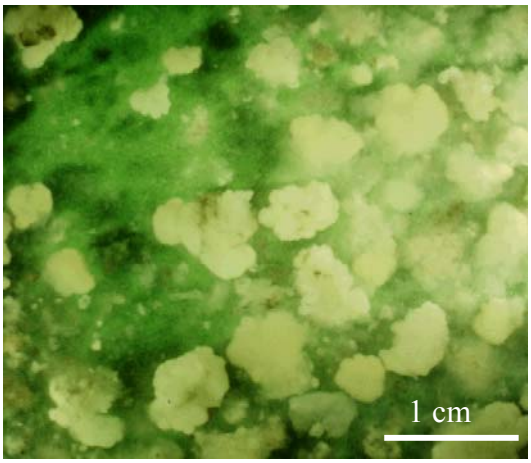



**Abbildung 24:** Perlhirse Suspensionskultur etabliert aus embryogenem Kallusgewebe. Der Ausschnitt zeigt Kalli der Suspension mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 0,5 cm.

Tabelle 13 fasst die getesteten Parameter für die Etablierung der Suspensionskultur zusammen.

**Tabelle 13:** Parameter für die Etablierung der Suspensionskultur. Das Zeichen (+) zeigt die Bedingungen an, bei denen eine erfolgreiche Proliferation embryogener Strukturen erreicht wurde.

| Explantate | Schütteln | | Volumen der Vorkultur | |
|---|---|---|---|---|
| | Ja | Nein | 5 ml | 1 ml |
| Unreife Embryonen | - | - | - | - |
| Kalli | + | - | - | + |

### 3.6.1. Pflanzenregeneration aus der Suspensionskultur

Für die Regeneration von Pflanzen aus der Suspensionskultur wurden mit einer Pinzette die embryogenen Kalli zunächst auf Festmedium übertragen. Hierbei wurden die Kalli unterschiedlichen Behandlungen unterzogen.

Kalli eines Durchmessers von ca. 0,5 cm (Abb. 24) wurden entweder direkt auf festes L3B1-Medium unter Regenerationsbedingungen oder auf festes L3D2,5B0,1-Medium für die weitere Kallusinduktion im Dunkeln überführt. Letztere wurden 2 Wochen später ebenfalls unter Regenerationsbedingungen weiter kultiviert.

Nach Ablauf von 1-2 Wochen war deutlich zu sehen, dass die Kalli, die direkt unter Regenerationsbedingungen inkubiert wurden, abstarben. Dagegen bildeten Kalli, die eine 14-tägige Kallusinduktionsphase auf festem L3D2,5B0,1-Medium durchliefen, wenige regenerierende Strukturen, die sich zu Sprossen weiterentwickelten.

Da die Regenerationsrate insgesamt gering war, wurde die Auxinkonzentration des L3D2,5B0,1-Mediums erhöht, um die Kallusinduktion vor der Regeneration stärker zu fördern. Eine 2-wöchige Kallusinduktionsphase der Kalli aus der Suspensionskultur auf festem L3D3B0,1-Medium, das abweichend vom Standard eine höhere 2,4-D Konzentration von 3 mg/l enthält, resultierte in einer deutlich höheren Regenerationsfähigkeit der Kalli.

Abbildung 25 zeigt den Einfluss der Kallusinduktionsphase auf festem L3D3B0,1-Medium auf die Kallusentwicklung.

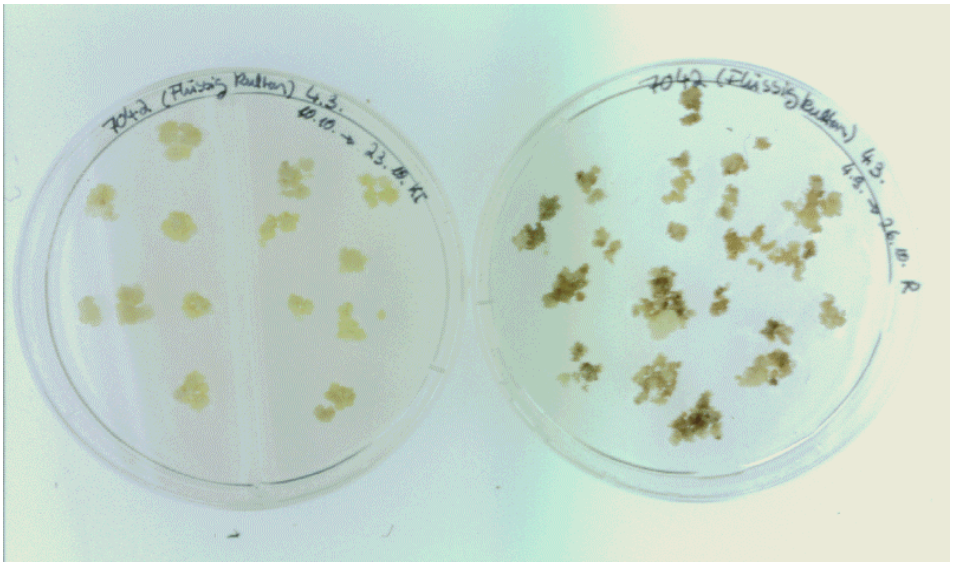


**Abbildung 25:** Einfluss der Kallusinduktionsphase auf L3D3B0,1-Medium auf die Regenerationsfähigkeit der Suspensionskultur.
Gezeigt sind regenerierende Kalli nach der 2-wöchigen Inkubation auf L3D3B0,1-Medium (links) im Vergleich zu Kalli, die ohne Durchlaufen der Kallusinduktionsphase unter Regenerationsbedingungen inkubiert wurden (rechts).

Nach der Bildung von Sprossen (Abb. 26a und b) wurden die Regenerate auf das Wurzelinduktionsmedium 0,5L3 umgesetzt. Das Einpflanzen in Erde erfolgte 8-10 Wochen später.

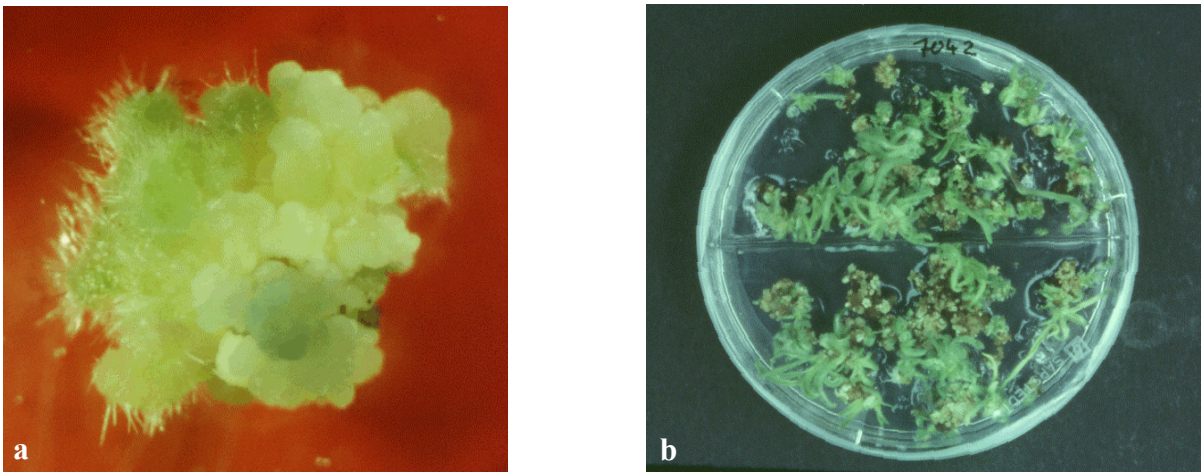



**Abbildung 26:** Frühe **(a)** Regenerationsphase und fortgeschrittene **(b)** Regeneration der Suspensionskultur.

Um die Regenerationsrate zu bestimmen, wurden in 10 Experimenten jeweils 12 Kalli regeneriert. Insgesamt wurden 3 Wiederholungen dieses Experiments durchgeführt. Die regenerierten Pflanzen wurden im Stadium der Wurzelinduktion gezählt.
Die Anzahl regenerierter Pflanzen jeden Experiments ist in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14**: Regenerationsrate bei Kalli der Suspensionskultur. Die Anzahl der Regenerate pro 12 Kalli in 3 Wiederholungen der 10 Experimente ist aufgeführt.

| Experiment | Wiederholung | | |
|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** |
| 1 | 489 | 530 | 801 |
| 2 | 790 | 675 | 469 |
| 3 | 855 | 810 | 436 |
| 4 | 718 | 750 | 788 |
| 5 | 684 | 563 | 723 |
| 6 | 730 | 720 | 498 |
| 7 | 788 | 810 | 845 |
| 8 | 650 | 805 | 532 |
| 9 | 536 | 740 | 820 |
| 10 | 608 | 835 | 802 |
| Mittelwert (Pflanzen/12 Kalli) | 684,8 | 723,8 | 671,4 |
| Standard Abweichung | 116,2 | 105,7 | 166,1 |
| Pflanzen/Kallus | 57,1 | 60,3 | 55,9 |
| **Mittelwert (Pflanzen/Kallus)** | **57,8** | | |

Eine Regenerationsrate von 57,8 Pflanzen/Kallus konnte mit diesem System erreicht werden. Aus den verschiedenen Regenerationsexperimenten wurden exemplarisch je 2-3 Pflanzen bis zur Reife der Ähren kultiviert. Anomalien, wie z. B. Wachstumsstörungen oder Albinos, wurden bei den regenerierten Pflanzen nicht beobachtet. Alle Regenerate waren fertil und zeigten einen normalen Phänotyp.

Die Suspensionskultur konnte bis zu einem Jahr erhalten werden, ohne dass dabei die Regenerationsfähigkeit beeinträchtigt wurde. 12 Monate nach Starten der Suspensionskultur wurden in 5 verschiedenen Experimenten je 10 Kalli zur Regeneration entnommen. Die Anzahl daraus regenerierter Pflanzen zeigte im Vergleich zu den früher durchgeführten Regenerationsexperimenten keine signifikanten Unterschiede. Die Regenerationsrate von ca. 60 Pflanzen pro Kallus korrelierte mit den oben aufgeführten Werten (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Regenerationsrate 12 Monate nach Etablierung der Suspensionskultur. Aufgeführt ist die Anzahl der Regenerate pro 10 Kalli in 5 Wiederholungen.

| **Wiederholung** | **Pflanzen/10 Kalli** |
|---|---|
| 1 | 533 |
| 2 | 623 |
| 3 | 579 |
| 4 | 495 |
| 5 | 608 |
| Mittelwert | 567,6 |
| Standard Abweichung | 53,1 |
| **Regenerationsrate** | **56,8 (Pflanzen/Kallus)** |

Die Flüssigkultur wurde für einen Zeitraum von insgesamt 2 Jahren weiterkultiviert, wobei sich im Laufe des zweiten Jahres ihr Zustand veränderte. Die relativ großen, embryogenen Kalli veränderten sich zunehmend in eine feine Zellsuspension, die nach Ablauf von 18-24 Monaten nicht mehr zu Pflanzen regeneriert werden konnte (Abb. 27).

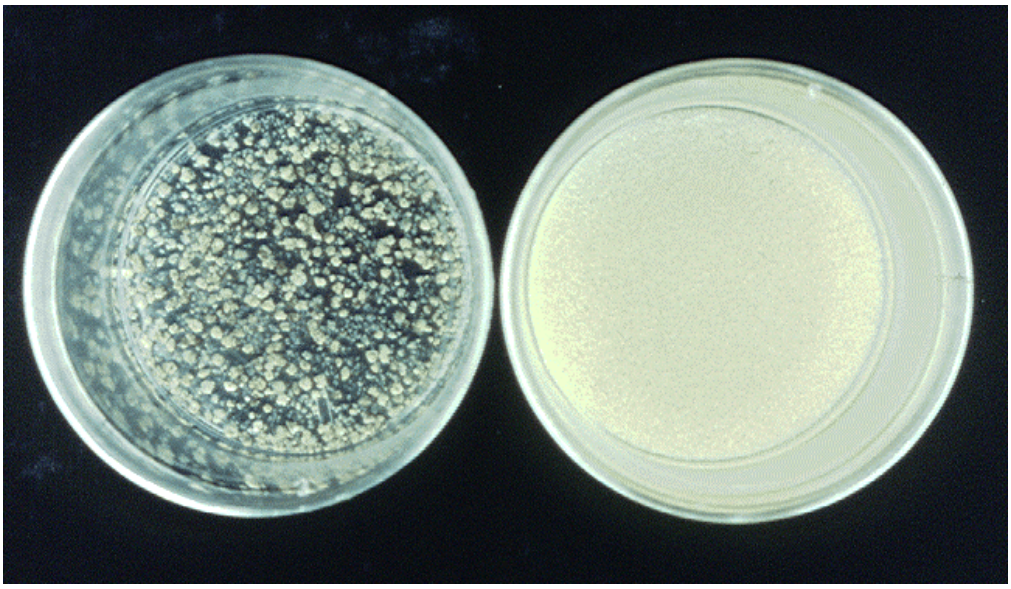


**Abbildung 27:** Vergleich von 2 Stadien der Suspensionskultur. Die 6 Monate alte Suspensionskultur (links) besteht aus relativ großen, embryogenen Kalli. Dagegen gleicht der Zustand der 20 Monate alten Kultur dem einer feinen, nicht regenerationsfähigen Zellsuspension (rechts).

In Tabelle 16 sind die Regenerationsphasen der Suspensionskultur zusammengefasst.

**Tabelle 16:** Regenerationsphasen der Suspensionskultur.

| Phase | Medium | Dauer |
|---|---|---|
| Kallusinduktion aus unreifen zygotischen Embryonen | L3D2,5B0,1-Festmedium | 4 Wochen |
| Etablierung der Flüssigkultur | L3D2,5B0,1-Flüssigmedium | 4 Wochen |
| Kallusinduktion | L3D3B0,1-Festmedium | 2 Wochen |
| Regeneration | L3B1-Festmedium | 10 Wochen |

### 3.6.2. Vergleich der Regenerationssysteme

Ein leistungsfähiges Transformationssystem benötigt als Basis ein effizientes Regenerationssystem, um eine angemessene Anzahl transgener Pflanzen zu erzeugen.

In dieser Arbeit wurde Perlhirse basierend auf dem von Morgenstern (2000) etablierte *in vitro* Regenerationssystem transformiert. Dabei handelte es sich um die Regeneration von Perlhirsepflanzen aus unreifen zygotischen Embryonen. Die Regenerationsrate, die mit diesem System erreicht wurde, bewegt sich zwischen 4-9 Pflanzen für die verschiedenen Genotypen. Die Regenerationsdauer aus unreifen Embryonen beträgt 5-6 Monate und schließt den Zeitraum von der Isolierung der Embryonen an bis zum Erhalt adulter Pflanzen ein (Oldach *et al*., 2001a).

Die Regenerationsrate, die mit der hier entwickelten *in vitro* Suspensionskultur erreicht wurde, beträgt mindestens das 6fache von der aus unreifen Embryonen und stellt mit ca. 60 Pflanzen/Kallus ein sehr viel effizienteres System für die Regeneration dar.

Die Regenerationsdauer der Suspensionskultur ist ebenfalls kürzer. Pflanzen können innerhalb von 3-4 Monaten regeneriert werden. Ist die Suspensionskultur einst etabliert, so kann man ein Jahr lang schneller an eine große Menge regenerierbares Gewebes kommen und mit der Regeneration beginnen. Die Zeit für die Isolierung der Embryonen und die Kallusinduktion wird durch dieses System gespart.

# 4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Transformationssystem für Perlhirse (*Pennisetum glaucum*) etabliert, bei dem der DNA-Transfer in unreife zygotische Embryonen mittels Partikelbeschuss erfolgte.
Ferner wurden zwei Ansätze zur Verbesserung der Pilzresistenz durchgeführt. Das *afp*-Gen, welches für ein antifungales Peptid aus *Aspergillus giganteus* kodiert und das *leapep20*-Gen, welches für ein synthetisches antimikrobielles Peptid kodiert, wurden jeweils in Perlhirse transformiert. Die stabile Integration, Vererbung und die Transkription der inserierten Gene wurden durch molekulare Untersuchungen bestätigt. Des weiteren zeigten die *afp*-exprimierenden Pflanzen bei *in vitro* und *in vivo* Infektionstests eine deutliche Steigerung der Resistenz gegenüber dem Rosterreger *Puccinia substriata*.

## 4.1. Genetische Transformation von *Pennisetum glaucum*

Der Gentransfer in Pflanzen stellt eine wichtige Methode für das Einbringen neuer Eigenschaften in Nutzpflanzen sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Züchtung dar.
Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Berichte über stabil transformierte Perlhirse vor.
Perlhirse gehört zu den bedeutendsten Getreidearten in Asien und Afrika und stellt eine der wichtigsten Nahrungsquellen für über 500 Millionen Menschen dar. Durch ihre Toleranz gegenüber Hitze und Trockenheit und durch ihre zahlreichen natürlichen Resistenzen ist das wirtschaftliche Interesse an Perlhirse in den letzten Jahren gestiegen. Die Entwicklung von effizienten Systemen zur genetischen Transformation ist ein entscheidender Fortschritt für die molekulare Perlhirsezüchtung, die eine Ergänzung zur klassischen Züchtung darstellt.
In dieser Arbeit wurde ein Transformationssystem für Perlhirse entwickelt. Als Methode der Transformation wurde der Partikelbeschuss von unreifen zygotischen Embryonen angewandt.

### 4.1.1. Optimierung der Transformationsparameter

Die Optimierung der Transformationsparameter steht bei der Etablierung neuer Transformationssysteme im Vordergrund. Die Fähigkeit des Gewebes zur Bildung regenerierbarer somatischer Embryonen ist die Voraussetzung für ein effizientes Transformationssystem. Für Perlhirse existierte bereits ein leistungsfähiges Regenerationssystem aus unreifen zygotischen Embryonen (Morgenstern, 2000) auf dessen Basis das Transformationssystem aufgebaut wurde.

Die Auswahl der Methode sowie des zu transformierenden Gewebes ist für die Effizienz der Transformation von großer Bedeutung. Die biolistische Transformation, die 1987 von Sanford und Mitarbeitern entwickelt wurde, stellt eine erfolgreiche und häufig genutzte Technik zur Transformation von Getreide dar. Beim Partikelbeschuss wird die Transformationseffizienz durch verschiedene physikalische und biologische Parameter beeinflusst. In der hier vorliegenden Arbeit wurden einige für die erfolgreiche Transformation wichtige Parameter, wie der ausgewählte Gasdruck, die osmotische Vorbehandlung und Konzentration des Selektionsagens BASTA optimiert.

Die Selektion transgener Zellen ist ein wichtiger Schritt, welcher die Effizienz der Transformation beeinflusst. Die Anwendung des *pat*-Gens für die Selektion von Perlhirse erwies sich als geeignet, da sie keine natürliche Resistenz gegen das Herbizid BASTA aufwies, wie der BASTA-Sprühtest gezeigt hat (siehe 3.2.3.). Bei der Selektion sollte die ausgewählte Konzentration des Selektionsagens effektiv sein, die Geweberegeneration darf aber dadurch nicht allzu sehr beeinträchtigt werden. In dieser Arbeit erfolgte die Selektion während der *in vitro* Kultur mit einer BASTA-Konzentration von 2 mg/l. Bei dieser Konzentration war die Regenerationsrate um 40% verringert und die Anzahl potentieller Transformanden war im Vergleich zu den Kontrollregeneraten stark herabgesetzt. Eine Reduktion des Selektionsdrucks könnte einerseits die Regeneration verbessern, andererseits würde die Anzahl von falsch positiven Regeneraten, die den Sprühtest nicht bestehen würden, steigen. Im Gegensatz dazu steigt möglicherweise durch Erhöhen des Selektionsdrucks die Wahrscheinlichkeit, dass die regenerierten Transformanden positiv sind. Transgene Zellen, die hingegen das Selektionsgen nur schwach exprimieren, könnten dem Selektionsdruck nicht standhalten und würden absterben. Die Transformationsrate würde somit geringer ausfallen.

Beim Partikelbeschuss von Skutelli unreifer Embryonen ist das Einbringen der Trägerpartikel in möglichst viele embryogene Zellen erforderlich, ohne dadurch das Gewebe zu stark zu beschädigen. Dies ist für den Erfolg der Transformation und die Effizienz des Systems wichtig.
Ein möglicher Ansatz zum Minimieren der Beschädigung besteht in einer osmotischen Vorbehandlung des zu transformierenden Gewebes. Die Penetration der Partikel könnte durch die Reduktion des Turgordrucks in den Zellen erleichtert werden, wodurch die Schäden reduziert werden. In verschiedenen Pflanzenkulturen wurde gezeigt, dass eine osmotische Vorbehandlung einen positiven Effekt auf die transiente Expression und die stabile

Transformation hat beispielsweise bei Maissuspensionen (Vain *et al*., 1993) und bei der Transformation von unreifen zygotischen Embryonen der Erdnuß (Deng *et al*., 2001). Bei Hefe wurden ebenfalls hohe Transformationsraten nach einer osmotischen Vorbehandlung erreicht (Armaleo *et al*., 1990). Es wäre aber auch denkbar, dass die hohe Osmolarität als Stressor fungiert, der die Reparaturmechanismen der Zellen aktiviert, wodurch getroffene Zellen besser überleben und regenerieren können.

Die in dieser Arbeit vorgenommene osmotische Vorbehandlung zu transformierender Embryonen auf Medium MS-Osm (1,1 Os) erwies sich als vorteilhaft. Bei unbehandelten Kontrollen war die Bildung somatischer Embryonen stark beeinträchtigt (siehe 3.2.2.). Bei Suspensionskulturen von Mais wurde gezeigt, dass durch eine osmotische Behandlung mit Mannitol bzw. Saccharose die Regenrationsfähigkeit gefördert wurde (Emons *et al*., 1993). Weiterhin konnten in Transformationsexperimenten an Mais keine Transformanden nach Partikelbeschuss von osmotisch unbehandelten Embryonen erhalten werden (Brettschneider *et al*., 1997).

Der Effekt der osmotischen Vorbehandlung wurde auch bei *Sorghum bicolor* untersucht (Rother, 1995). Dabei stellte sich heraus, dass die Anzahl transienter Transformationssignale mit steigender Osmolarität (160-960 mOs) zwar höher lag, die Embryonen aber eine starke Verbräunung als Reaktion auf die osmotische Belastung aufwiesen. Die *in vitro* Kultur von Perlhirse zeichnet sich, ähnlich wie bei *S. bicolor,* durch eine stressbedingte Verbräunung des Gewebes und folglich des Kulturmediums aus. Durch den Partikelbeschuss und die dadurch entstandenen Verletzungen des Gewebes wird die Verbräunung der Kultur zusätzlich verstärkt und infolgedessen die Regenerationsfähigkeit beeinträchtigt. Die hier für die Vorbehandlung angewandte Osmolarität von 1,1 Os war im Vergleich zu anderen Transformationssystemen, wie beispielsweise 500 mOs für Mais (Brettschneider *et al*., 1997) und 600 mOs für Hafer (Gless *et al*., 1998) relativ hoch. Trotz der in dieser Arbeit hohen verwendeten Osmolarität wurden keine verstärkten Stressreaktionen in der *in vitro* Kultur beobachtet.

Als Trägermaterial der DNA wurden Goldpartikel eines Durchmessers von 0,4-0,8 µm benutzt. Die Beschädigung der Zellen ist durch kleinere Trägerpartikel geringer als durch größere, dagegen muss auf Grund ihrer geringeren Masse ein höherer Druck eingesetzt werden, um die benötigte Beschleunigung zu erreichen.

Transiente Experimente bei der mit Perlhirse eng verwandten Mohrenhirse (*Sorghum bicolor)* zeigten, dass die höchste Anzahl an transienten Signalen bei der Anwendung von Drücken

von 1100 bis 1550 psi erzielt wurden (Rother, 1995). Aus den Ergebnissen der transienten Vorexperimente dieser Arbeit mit dem *gus*-Reportergen bei der Anwendung gleicher Drücke für Perlhirse konnten keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden, da keine klare Tendenz in Abhängigkeit des Drucks festgestellt werden konnte (siehe 3.2.1). Die Tatsache, dass alle in dieser Arbeit erhaltenen transgenen Pflanzen durch Transformation mit 1550 psi erhalten wurden deutet jedoch darauf hin, dass die DNA-Träger einen hohen Druck und folglich eine hohe Beschleunigung benötigen, um die richtige Gewebeschicht zu erreichen, aus der die Regeneration hervorgeht.
Die Abweichungen der Resultate innerhalb eines Experiments wiesen darauf hin, dass neben dem Druck der Zustand der Embryonen eine Rolle bei ihrer Regenerationsfähigkeit spielt. Embryonen, die aus demselben Kolben isoliert wurden, waren teilweise unterschiedlich in ihrer Entwicklung. Das Entwicklungsstadium des Embryos ist ein wichtiger Faktor bei der Bildung embryogener Strukturen. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Etablierung des Regenerationssystems für *P. glaucum* beobachtet, wobei abweichend vom Durchschnitt einzelne Embryonen in der Lage waren, bis zu 20 Pflanzen zu regenerieren (Oldach *et al*., 2001a).

Die Dauer der Vorkultur stellt einen wichtigen Parameter der Transformation dar. Untersuchungen mit anderen Getreidearten zeigten, dass die Transformationseffizienz durch das Alter isolierter Embryonen signifikant beeinflusst wurde. Bei Mais konnten z. B. die besten Transformationsergebnisse erzielt werden, wenn die Embryonen eine Vorkultur von 2-6 Tagen durchliefen. Der Verzicht auf die Vorkultur beeinträchtigte die Embryogenese dagegen stark (Brettschneider *et al*. 1997). Bei der Transformation von *Triticale*, einer Weizen-Roggen Kreuzung, war die Bildung embryogenen Kallus nach einer 2-tägigen im Vergleich zu einer 6-tägigen Vorkultur im weiteren Verlauf der Kultur stark vermindert (Zimny *et al*., 1995).
Der Vergleich der Dauer der hier eingesetzten Vorkultur von 1 und 5 Tagen zeigte keine Unterschiede für den weiteren Kulturverlauf. 2 der insgesamt 6 transgenen Pflanzen wurden nach einer 5-, die restlichen 4 Pflanzen nach einer 1-tägigen Vorkultur erhalten.
Es gibt Hinweise in der Literatur, dass der Ursprung von Embryoiden entweder einzelne Zellen oder proembryoidale multizelluläre Komplexe sein können (Vasil und Vasil, 1981a; 1981b). Die Induktion der Embryogenese vor der Transformation erhöht die Anzahl embryogener Empfängerzellen. Auf der anderen Seite steigt dagegen die Gefahr, einzelne

Zellen von weiterentwickelten somatischen Embryonen zu transformieren, was zur Entwicklung chimärer Pflanzen führen könnte.

Die Linie B2 war vermutlich eine chimäre Pflanze (siehe 3.3.3.1.). Obwohl die transformierten Gene *pat* und *gus* in aus Blattmaterial isolierter $T_0$-DNA nachgewiesen wurden, waren keine Transgene in den Nachkommen dieser Linie enthalten. Dieses könnte durch chimäre Pflanzen erklärt werden, in denen nur ein Teil des Gewebes transgen ist.

Das Auftreten von chimären Pflanzen ist ein häufig beobachtetes Phänomen, das bei der biolistischen Transformation auftreten kann. Bei *S. bicolor* trugen beispielsweise die Nachkommen einer möglicherweise chimären Transgenen Linie keine transformierten Gene (Rother, 1995). Die Regeneration chimärer Pflanzen nach Partikelbeschuss wurde unter anderem bei der Sojabohne (McCabe *et al*., 1988) und bei Mais (Tomes, 1990; Gordon-Kamm *et al*., 1990) beobachtet.

### 4.1.2. Aktivität und Vererbung der inserierten Gene

Die Integration aller übertragenen Gene konnte mittels molekularer Analysen nachgewiesen werden. Mit Hilfe der durchgeführten Southern-Blot Analysen konnte die Anzahl der integrierten Transgenkopien ermittelt werden. Ihre Vollständigkeit, welche für die korrekte Funktion des Gens unentbehrlich ist, wurde ebenfalls durch unterschiedliche Restriktionsanalysen überprüft. Die Integrationsmuster der Transgene wiesen in einigen Fällen sehr komplexe Muster auf und es war vorwiegend eine hohe Anzahl an Integrationen nachzuweisen.

Für die Linien B1 und M1 konnten beispielsweise für das *gus*-Gen bis zu 20 Integrationen ermittelt werden. Dagegen wies die Linie B2 nur 2-3 Integrationen auf (siehe 3.3.3.1.). Eine einfache Integration konnte nur in einem Fall bei der Pflanze 70L1 für das *leapep20*-Gen nachgewiesen werden.

Die Integration multipler Kopien des Transgens ist bei der Anwendung der Partikelkanone für die Transformation weitverbreitet (Svitashev *et al.*, 2002). Vor bzw. während der Integration der übertragenen DNA kann es zum Zusammenführen der transformierten DNA-Moleküle durch homologe Rekombination kommen. Dieses Ereignis wird durch rekombinationsbegünstigte Bereiche der Plasmid-DNA, wie z. B. die AT-reichen Vektorrückgratsequenzen oder der bakterielle Replikationsursprungs (*ori*) begünstigt. Werden die so gebildeten Konkatamere in einen Lokus der Pflanzen-DNA inseriert, führt das zur Integration mehrerer Kopien eines Gens (Fu *et al*., 2000; Breitler *et al*., 2002). Diese

Begebenheit könnte auch die komplexen Integrationsmuster und die Existenz unvollständiger Integrationen erklären.
Die hier durchgeführte molekulare Analyse zeigte, dass alle transgenen Pflanzen jeweils mindestens eine vollständige Integration der Promotor-Gen-Terminator Kassette der transformierten Gene aufwiesen.
Für die Pflanze 70L1 konnte zunächst mittels Restriktion mit den Enzymen *Hind*III und *EcoR*I keine vollständige Promotor-Gen-Terminator Kassette nachgewiesen werden. Wurde die DNA anstelle von *Hind*III mit *Pae*I, welches im 5‘-Bereich stromabwärts von der *Hind*III Schnittstelle schneidet, verdaut, so konnte gezeigt werden, dass die Kassette vollständig integriert wurde. Dieses könnte damit erklärt werden, dass flankierende Bereiche der Promotor-Gen-Terminator Kassette von Rekombinationsereignissen betroffen wurden. Ebenfalls könnten die flankierenden Bereiche der Kassette ein Angriffsziel von Nukleasen gewesen sein, da durch den Partikelbeschuss Reparaturmechanismen und Enzyme zum Abbau von Fremd-DNA in den Pflanzenzellen aktiviert werden (Hunold *et al*., 1994; Finnegan *et al.*, 1998).

Die Vererbung der Transgene erfolgte in allen fertilen $T_0$-Pflanzen nach klassischen Vererbungsregeln. Die Segregation der übertragenen Gene entsprach dem Verhältnis für die Vererbung eines dominanten Lokus von 3:1. Mit Ausnahme der sterilen Pflanze 70L1 und der chimären B2-Linie erbten alle hemi- und homozygoten $T_1$-Nachkommen das gleiche Integrationsmuster der Elternlinien. Die verschiedenen, co-transformierten Gene wurden gemeinsam auf die Nachkommen übertragen. Man kann deswegen davon ausgehen, dass die multiplen Kopien und die verschiedenen Transgene wahrscheinlich an einem Lokus integriert wurden. Der Mechanismus der DNA Integration nach Partikelbeschuss wird als ein Zweischritt-Prozess diskutiert. Im ersten Schritt entstehen durch homologe Rekombination und Ligation der exogenen DNA Moleküle größere Komplexe, die repetitive oder inverse Wiederholungen des gleichen Vektorbereiches darstellen. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Integration dieser Komplexe in einen Lokus der genomischen DNA (Taylor und Fauquet, 2002). Dies erklärt die gemeinsame Vererbung der verschiedenen Transgene an die Nachkommen.
Ähnliche Resultate wurden bei anderen Transformationssystemen durch Partikelbeschuss beobachtet. So zeigten Untersuchungen von Transgenen in Nachkommen transformierter Reispopulationen eine Co-Segregation aller integrierten Kopien (James *et al*., 2002). Die

Integration mehrerer Transgene in einen Lokus bei Hafer (Pawlowski und Somers, 1998) und Reis (Wakita *et al*., 1998 ; Kohli *et al*., 1998) wurde ebenfalls nachgewiesen.

Im letzten Jahrzehnt wurden große Fortschritte bei der Etablierung neuer Transformationssysteme und der Verbesserung der Transformationsraten verschiedener Getreidearten erzielt. Dennoch ist die Vorhersage über den Status der Expression der Transgene nicht möglich, da beträchtliche Unterschiede in der Stabilität und dem Niveau der Expression beobachtet werden (Vain *et al.*, 2002). Es ist jedoch von großer Bedeutung für Forschung und Landwirtschaft, dass Transgene über viele Generationen stabil exprimiert werden.

Erscheinungen der Transgeninaktivierung wurden bereits in vielen Arbeiten, inklusive der hier vorgestellten, beobachtet. Sie korrelieren nicht immer mit dem Verlust des Transgens, sondern hängen vielmehr mit dessen Inaktivierung zusammen. Dabei wirken diverse Mechanismen, für die man Parallelen in natürlich vorkommenden Ereignissen finden kann, wie beispielsweise die Inaktivierung viraler Fremd-DNA oder transponierbarer Elemente (Finnegan und McElroy, 1994). Die Inaktivierung der Transgene spielt sich auf transkriptioneller bzw. posttranskriptioneller Ebene ab. Faktoren wie die Kopienanzahl und der Integrationsort sind nicht beeinflussbar, da die Transformation mittels Partikelbeschuss in einer zufallsgemäßen Integration der Transgene ins Genom der Pflanze resultiert, was zum sogenannten Positionseffekt führt (Day *et al.*, 2000): Wird die Fremd-DNA in stark kondensierte oder methylierte Chromosomenbereiche inseriert, werden die Transgene nicht oder nur in geringem Maße exprimiert. Dagegen erfolgt die Expression der Transgene, wenn sie in transkriptionsaktive Bereiche des Genoms integriert werden (Van Leeuwen *et al*., 2001; Taylor und Fauquet, 2002).

Unabhängig vom Zustand des Integrationsorts kann die Transgeninaktivierung auf transkriptioneller Ebene (*TGS*, *transcriptional gene silencing*) durch repetitive Sequenzen induziert werden. Die multiplen Integrationen, die nach Partikelbeschuss auftreten, können untereinander durch ektopische Paarung (*ectopic pairing*) homologer DNA Bereiche rekombinieren. Die Funktion des Gens könnte dann durch Deletionen oder Umordnung beeinträchtigt werden, ein als *RIGS* (*repeat induced gene silencing*) beschriebener Effekt (Finnegan und McElroy, 1994; Day *et al*., 2000).

Außerdem kann Methylierung der DNA zur Inaktivierung der Transkription führen. Durch molekulare Analyse mit methylierungssensitiven Enzymen oder durch Behandlung der DNA mit Bisulfit, welches selektiv nicht-methyliertes Cytosin in Uracil umwandelt und dadurch zur Veränderung von Bindungsstellen für Oligonukleotide führt, kann das Methylierungsmuster der DNA untersucht werden (Sadri und Hornsby, 1996; Oakeley, 1999). Exogene DNA könnte als fremd erkannt werden und durch zelluläre Methyltransferasen am Cytosin in CpG oder CpNpG Basenabfolgen methyliert. Die durch *RIGS* erreichte Genomumordnung begünstigt die Erkennung und folglich die Methylierung von Fremd DNA (Wassenegger, 2000; Kumpatla *et al.*, 1998).
An Petunie konnte auf diese Weise direkt gezeigt werden, dass die Transgeninaktivierung auf Methylierung des inserierten Gens beruhte (Renckens *et al*., 1992). Untersuchungen über die Inaktivierung des *gus*-Reportergens in transgenen Kalluslinien von Perlhirse zeigten auch, dass ein hoher Methylierungsgrad des inserierten Gens nachzuweisen war (Lambé *et al*., 1995). Analoge Berichte über die Inaktivierung transformierter Gene bei *S. bicolor* durch Hypermethylierung existieren ebenfalls (Emani *et al*., 2002).
Die Interaktion zwischen RNA und DNA stellt ebenfalls ein Signal für die DNA Methylierung dar. *RdDM* (*RNA directed DNA methylation*) kann durch homologe RNA Sequenzen auf DNA Ebene induziert werden. *RdDM* bewirkt die Inaktivierung von viraler und Transposon-DNA als Schutz gegen Fremd-DNA, sowie von endogenen Genen, die eine Homologie zu Transgensequenzen aufweisen (Wassenegger, 2000). Transgene Pflanzen, die multiple Integrationen eines Transgens beinhalten, könnten ebenfalls diesem Mechanismus der Transkriptionsinaktivierung unterliegen (Tang *et al*., 2001; Wassenegger, 2000; Kumpatla *et al*., 1998).

Die Inaktivierung der Transkription kann auch auf RNA Ebene erfolgen. Die Mechanismen des *PTGS* (*post transcriptional gene silencing*) beruhen auf RNA-RNA Interaktionen, die auf die gezielte Degradierung von DNA Sequenzen zurückzuführen ist, die den RNA Hybriden homolog ist, ein als RNAi (*RNA interference*) beschriebener Prozess (Tang *et al*., 2001; Hannon, 2002). Dieser auch als Co-Supression bezeichnete Effekt könnte bei Überexpression eines Transgens auftreten und zur Inaktivierung des Transgens sowie von homologen endogenen Sequenzen führen (Finnegan und McElroy, 1994). Wie bei Experimenten zur Intensivierung der Blütenfarbe der Petunie gezeigt wurde, bewirkte die Insertion mehrerer Kopien eines Transgens entgegen den Erwartungen die Inaktivierung statt der Verstärkung der Expression (Bernstein *et al*., 2001).

Der Verlust der Expressionsaktivität des *gus*- bzw. *leapep20*-Gens bei den hier erhaltenen transgenen Perlhirselinien 701 und 70L2 könnte transkriptionell bzw. posttranskriptionell stattgefunden haben. Trotz der Existenz vollständiger Kopien des *gus*-Gens in der Linie 701 konnte keine GUS-Expression nachgewiesen werden (siehe 3.3.3.2.). Bei der Linie 70L2 konnte ebenfalls kein Transkript des Gens *leapep20* beobachtet werden. Ferner war in keinem der $T_2$-Nachkommen GUS-Aktivität nachzuweisen. Eine genauere Aufklärung der Ursache bedarf detaillierter Untersuchungen beispielsweise des Methylierungszustands der Transgene und der Sequenzanalyse des Integrationsorts.

### 4.1.3. Effizienz des Transformationssystems

In dieser Arbeit konnten insgesamt 6 transgene Pflanzen regeneriert werden. Die erreichte Transformationsrate betrug durchschnittlich 0,3%. Diese Rate ist im Vergleich zu den zwischen 1-5% liegenden Transformationsraten anderer Getreidearten sehr gering (Becker *et al*., 1994; Brettschneider *et al*., 1997; Christou *et al*., 1991; Nehra *et al*., 1994; Wan und Lemaux, 1994). Dies könnte unter anderem daran liegen, dass hier verschiedene Genotypen verwendet wurden, die sich in ihrer Regenerations- und Transformationseffizienz unterscheiden.

In einem kürzlich publizierten Bericht, in dem auch Teile dieser Arbeit enthalten sind, konnte in einer unserer Kooperationsgruppen ebenfalls transgene Perlhirse regeneriert werden. Obwohl teilweise andere Genotypen und ein unterschiedliches Kultursystem verwendet wurden, war die Transformationsrate ebenfalls gering und betrug 0,02% (Girgi *et al.*, 2002). Die Transformation erfolgte mit Hilfe der *PIG* (*Partikel Inflow Gun*) (Finer *et al*., 1992), die nach einem ähnlichen Prinzip wie die hier verwendete PDS 1000/He funktioniert.

Lambé und Mitarbeitern ist es gelungen, erstmals mittels Partikelbeschuss stabil transformierte Perlhirsepflanzen zu regenerieren. Das verwendete Protokoll unterschied sich jedoch von dem hier beschriebenen darin, dass an Stelle von unreifen zygotischen Embryonen Kalli und embryogene Einheiten, die 7-8 Wochen nach Isolierung aus Sprossmeristemen als Ausgangsexplantate, transformiert wurden. Von den regenerierten Pflanzen zeigten weniger als die Hälfte der $T_0$-Pflanzen normales Wachstum und Fertilität, die restlichen Pflanzen wiesen Anomalien auf (Lambé *et al*., 2000). Die beiden Systeme können zwar nicht direkt miteinander verglichen werden, da verschiedene Genotypen, Kulturbedingungen und ein anderes Transformationssystem verwendet wurden. Vergleichbar mit der hier vorgestellten Methode war dennoch die Tatsache, dass die meisten transformierten Perlhirsepflanzen multiple Integrationen enthielten, was generell eine unerwünschte Eigenschaft des

Partikelbeschusses ist, da es dabei, wie bereits beschrieben, zur Inaktivierung der Transgenexpression kommen kann (Kumpatla *et al.*, 1998).
Insgesamt wurde beobachtet, dass die Transformationsraten bei *Pennisetum glaucum* gering ist und dass Anomalien wie Sterilität und Transgeninaktivierung unter den transgenen Pflanzen relativ häufig vorkommen.
Die geringere wirtschaftliche Bedeutung von Perlhirse im Vergleich zu den führenden Getreidesorten, wie beispielsweise Weizen und Reis, spiegelt sich in den Forschungsinteressen wider. Bei Perlhirse, als sechst wichtigste Getreideart, wurde bislang wenig in die *in vitro* Techniken und Gentransfermethoden investiert, welches die geringen, bisher erzielten Erfolge bei ihrer Transformation erklären könnte (Lambé *et al*., 1995; Lambé *et al*., 2000; Girgi *et al*., 2002). Die Entwicklung von Transformationssystemen anderer Getreidesorten, wie z. B. Gerste, erfolgte anfangs ebenfalls zögernd und verbesserte sich im Laufe der Zeit durch Optimierung der investierten Techniken (Lazzeri *et al*., 1991; Lörz und Lazzeri, 1992; Ritala *et al*., 1993; Ritala *et al*., 1994; Wan und Lemaux, 1994).
Das ökonomische Interesse an der robusten und trockentoleranten Perlhirse steigt mit der wachsenden Problematik der globalen Klimaveränderung und Welternährung. Deswegen sollte die Verbesserung der bereits etablierten Transformationsmethoden und die Suche nach alternativen Techniken im Vordergrund stehen.

Auf dem Gebiet der Expressionsregulation von Transgenen werden immer mehr Fortschritte erzielt. Die Inaktivierung der Transgene durch Co-Suppression oder Umordnung bei komplexen Integrationsmustern könnten mit Hilfe bestimmter Verfahren reduziert werden. Im Folgenden werden einige Aspekte diskutiert, die zur Verbesserung der Transformationseffizienz bzw. der Transgenaktivität führen können.

Dabei spielt die Transformationsmethode selbst eine wichtige Rolle. Beispielsweise wird mit Hilfe des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers eine insgesamt niedrige Kopienanzahl und ein einfaches Integrationsmuster des Transgens in Pflanzen erreicht (Hansen und Wright, 1999). Obwohl Agrobakterien in der Regel dikotyle Pflanzen infizieren, konnten die Restriktionen des Wirtsspektrums jüngst überschritten werden. Monokotyle Pflanzen wie beispielsweise Weizen (Cheng *et al*., 1997), Gerste (Wu *et al*., 1998), Mais (Ishida *et al*., 1996) und Sorghum (Zhao *et al*., 2000) wurden bereits erfolgreich transformiert. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Transformation von Getreiden mittels Agrobakterien

prinzipiell möglich ist. Ein solches System sollte nach einer entsprechenden Adaptation der Transformationsbedingungen für Perlhirse ebenfalls möglich sein.

Ferner spielt die Auswahl des Selektionsmarkers bei der Effizienz der Transformation eine Rolle. Antibiotika und Herbizide zerstören Gewebe, die die entsprechenden Resistenzgene nicht exprimieren. Zellen, die das Selektionsgen nur mäßig exprimieren, können dem Selektionsdruck nicht standhalten und daher nicht erhalten werden. Zusätzlich beeinträchtigen aus totem Gewebe freigesetzte toxische Substanzen insgesamt das Wachstum und die Regeneration. Alternative Selektionssysteme, die neue Kohlenstoffquellen ausschließlich transgenem Gewebe zugänglich machen, könnten das Wachstum von schwach- und starkexprimierenden Zellen fördern. Erfolge bei der Anwendung solcher Selektionssysteme für die Transformation sind bereits für verschiedene Pflanzenarten in der Literatur belegt:
So wurde gezeigt, dass beim Einsatz des *pmi*-Gens als Selektionsmarker eine höhere Transformationsrate bei Weizen und Mais erzielt wurde. Das aus *E. coli* stammende *pmi*-Gen kodiert für das Enzym Phosphomannose-Isomerase, welches es den Pflanzen ermöglicht, Mannose als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Die Transformation von Mais mit dem *pmi*-Gen als Selektionsmarker resultierte in einer 30%igen Transformationsrate (Negrotto *et al*., 2000). Bei Reis konnte eine 41%ige Transformationsfrequenz ebenfalls durch Einsatz des *pmi*-Gens für die Selektion erreicht werden (Lucca *et al*., 2001).
Durch Anwendung ähnlicher Enzyme des Zuckerstoffwechsels als Selektionsmarker konnten weitere Erfolge erzielt werden, wie in den folgenden Beispielen gezeigt wird. So konnte durch die Isopentenyl-Transferase als Selektionsmarker in Tabak eine 2,7fache Erhöhung der Transformationseffizienz im Vergleich zur Selektion durch Kanamyzin erzielt werden (Endo *et al*., 2001). Ferner wurde bei der Kartoffel eine 10fache Steigerung der Transformationseffizienz durch Anwendung des Enzyms Xylose-Isomerase im Vergleich zur Selektion durch Kanamyzin beobachtet (Haldrup *et al*., 1998).
Die Verwendung solcher Selektionssysteme für die Transformation von Perlhirse wäre ein möglicher Ansatz für die Verbesserung der Transformationseffizienz.

Um die Beeinträchtigung der Transgenaktivität durch komplexe Integrationsmuster zu reduzieren, können verschiedene Techniken angewandt werden.

Vektorsequenzen können, über die bereits beschriebenen Rekombinationsmechanismen, einen negativen Effekt auf die Genexpression ausüben und die Entstehung komplexer

Integrationsmuster begünstigen (Fu *et al*., 2000). Das Einführen von linearen Gen-Kassetten anstelle von zirkulären Vektoren erwies sich als zweckmäßig, wie in Transformationsansätzen von Reis mittels Partikelbeschuss von Gen-Kassetten gezeigt wurde. Einfache Integrationsmuster, niedrige Kopienanzahl und folglich die Stabilität der Transgenexpression zeichneten diese Experimente aus (Fu *et al*., 2000; Breitler *et al*., 2002).

Zusätzlich kann mittels Rekombinationssystemen Fremd-DNA zielgerichtet in einen bestimmten Lokus integriert werden. Durch Kontrolle des Zielorts wird verhindert, dass die DNA zufällig in inaktive Bereiche des Chromatins integriert und dadurch die Genaktivität beeinträchtigt wird. Beispielsweise bedingt die Integration beim Cre/lox System aus dem Phagen P1 die Erkennung der spezifischen lox-Sequenzen durch die Rekombinase Cre, die den Rekombinationsvorgang flankierender DNA-Sequenzen vermittelt (Hoa *et al*., 2002; Choi *et al*., 2000). Die Anwendung dieses Systems bietet eine Praxis für die präzise Insertion, wie bereits bei Weizen (Srivastava *et al*., 1999) und Tabak (Albert *et al*., 1995) gezeigt wurde.

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung und Stabilisierung der Transgenexpression stellt der Einsatz von sogenannten *MAR*s (*matrix attachment regions*) dar. *MAR*s, auch *scaffold attachment regions* genannt, sind AT-reiche DNA Sequenzen, die eine Rolle bei der Organisation von Chromosomen, DNA Replikation, Rekombination und Kontrolle der Genexpression spielen. *MAR*s umgeben häufig transkriptionsaktive Chromatinschleifen und verbinden sie mit der Kernmatrix. Transgene, die mit *MAR* Sequenzen flankiert werden, können unabhängig vom Aktivitätszustand des Chromatins eine aktive Chromatinschleife bilden, die vom restlichen Chromatin separiert ist (Spiker und Thompson, 1996).
Über Erfolge bei der Anwendung von *MAR*s zur Steigerung der Transgenexpression bei Pflanzen wurde bereits berichtet. Bei transgenen Reispflanzen wurde durch Einsatz von *MAR*s eine erhöhte und stabile GUS-Expression über 2 Generationen dokumentiert (Vain *et al*., 2002). Eine durch *MAR*s gesteigerte Aktivität von Transgenen wurde gleichermaßen bei Tabak erzielt (Luke Mankin *et al*., 2003).

### 4.2. Etablierung einer regenerationsfähigen *in vitro* Suspensionskultur

Ein effizientes Regenerationssystem ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für die erfolgreiche Transformation. Die Leistungsfähigkeit eines Transformationssystems zu verbessern ist von großer Wichtigkeit, um für die verschiedenen Forschungs- und Anwendungszwecke eine angemessene Anzahl transgener Pflanzen zu erhalten.

Die in dieser Arbeit erhaltenen transgenen Perlhirsepflanzen wurden basierend auf dem von Morgenstern (2000) etablierten Regenerationssystem erzeugt, bei dem im Durchschnitt eine Regenerationsrate von 6 Pflanzen/Embryo erreicht wurde.

Die Regenerationsrate der hier entwickelten *in vitro* Suspensionskultur von ca. 60 Pflanzen pro Kallus ist deutlich höher und somit eine attraktive Alternative für die Etablierung eines effizienteren Transformationssystem (siehe 3.6.1.).

Ein generelles Problem der *in vitro* Kultur stellt das Auftreten somaklonaler Variationen dar. Somaklonale Variationen sind Veränderungen im Phäno- bzw. Genotyp bei Nachkommen eines Ausgangsklons, die sich dann innerhalb der Kultur klonal vermehren (Kaeppler *et al.*, 2000). Diese durch die *in vitro* Kultur bedingten Veränderungen äußern sich auf verschiedene Weise. Obwohl die somaklonalen Variationen ursprünglich in der Neuzüchtung genutzt wurden, stellen die häufig auftretenden unerwünschten Eigenschaften, wie Sterilität, Entstehung von Albinos und Wachstumsanomalien ein Problem in der *in vitro* Kultur dar (Larkin und Scowcroft, 1981; Heß, 1992).

Diese Problematik muss besonders bei der Anwendung von Suspensionskulturen berücksichtigt werden, da die Kallusinduktionsphase relativ lang ist.

In den Pflanzen, die aus der hier entwickelten Suspensionskultur regeneriert wurden, ließen sich keine auffälligen Anomalien erkennen. Dennoch könnten makroskopisch nicht erkennbare Veränderungen im Metabolom oder Variationen im Ploidiegrad aufgetreten sein.

Die in dieser Arbeit erzeugte transgene Pflanze 70L1 war steril (siehe 3.3.3.4.). Sterilität wurde bei der Transformation von unreifen zygotischen Embryonen in anderen Systemen ebenfalls beobachtet. Beispielsweise zeigten Untersuchungen von transgenen Reispopulationen, dass bei 28% der erhaltenen Pflanzen die Fertilität reduziert war und dass weitere 28% steril waren (Wakita *et al*., 1998). Über ähnliche Probleme mit der Fertilität von Transformanden wurde bei Weizen (Bialy, 1992) und Mais (O'Kennedy *et al*., 2001) berichtet.

Obwohl das Ausgangsgewebe für die Transformation im Fall der Pflanze 70L1 ein Primärexplantat war und nicht aus einer Erhaltungskultur stammte, könnte die Veränderung in der nachfolgenden *in vitro* Kallusinduktionsphase aufgetreten sein.

Die Regeneration transgener Pflanzen aus unreifen zygotischen Embryonen beansprucht nach dem hier entwickelten Protokoll ca. 7 Monate. Da die Regenerationsdauer der in dieser Arbeit etablierten Suspensionskultur nur ca. 4 Monate beträgt, könnten durch die verkürzte Regenerationszeit negative Effekte zumindest teilweise kompensiert werden.

Das Potential insbesondere von frisch etablierten Suspensionskulturen sollte für Transformationszwecke genutzt werden. Die Verwendung von älteren Suspensionskulturen ist dagegen aufgrund der höheren Wahrscheinlichkeit des Auftretens somaklonaler Variationen und des Nachlassens der Regenerationsfähigkeit nicht zu empfehlen.

### 4.3. Phytopathologische Untersuchungen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei transgene Ansätze zur Verbesserung der Pilzresistenz bei Perlhirse durchgeführt. Die *c*DNA des antifungalen Peptids *Ag*-AFP aus *Aspergillus giganteus* (Lacadena *et al*., 1995) und die für das synthetische Magainin-Analogon Pep20 kodierende DNA (Ali und Reddy, 2000) wurden stabil in Perlhirse transformiert.

Die antifungale Wirkung der eingesetzten Peptide *Ag*-AFP und Pep20 wurde zunächst in einem *in vitro* Wachstumsinhibitionstest mit dem Pilz *Pyricularia grisea* untersucht (siehe 3.5.1).

Bereits bei einer *Ag*-AFP Konzentration von 10 µM konnte eine deutliche Reduktion des Myzelwachstums von *P. grisea in vitro* beobachtet werden. Die in der Literatur beschriebenen minimalen Hemmkonzentrationen *MIC* (*minimal inhibitory concentration*) von *Ag*-AFP gegen verschiedene getestete Pilze darunter *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans, Magnaporthe grisea* und *Trichoderma harzianum* liegen in Bereichen zwischen 0,1 µM und 25 µM (Lacadena *et al*., 1995; Vila *et al*., 2001). Diese *in vitro* hemmende Wirkung des *Ag*-AFPs gegen diverse Pathogene weist darauf hin, dass es das Wachstum weiterer Pilzpathogene der Perlhirse ebenfalls hemmen könnte. Dies wurde in dem hier durchgeführten Infektionstest gezeigt, bei dem Blattsegmente von Perlhirse mit dem Rosterreger *Puccinia substriata in vitro* infiziert wurden.

Mit Hilfe des hier durchgeführten *in vitro* Infektionstests konnten größere Mengen an Pflanzen gleichzeitig untersucht werden. Seine Sensitivität reichte aus, um Unterschiede in der Resistenz deutlich feststellen zu können. Durch Zusatz des Seneszenzinhibitors Benzimidazol wurde ein vorzeitiges Absterben des Blattgewebes während der Inkubationszeit verhindert, wie bei den nicht-infizierten Kontrollen gezeigt wurde (siehe 3.5.2.).

Bei den durchgeführten *in vitro* Infektionstests konnte bei allen getesteten *afp*-Linien M1, B1 und 701 eine deutliche Steigerung der Resistenz von Perlhirse gegen Befall mit dem Rosterreger *Puccinia substriata* beobachtet werden.

In dem *in vitro* Infektionstest von homozygoten $T_2$-Nachkommen der *afp*-Linien M1 und 701 wurde eine signifikante Steigerung der Resistenz von bis zu 90% erreicht. Unter den $T_2$-Nachkommen zeigte sich eine große Variabilität bezüglich des Befallsgrads. Im Vergleich zur Wildtypkontrolle variierte der Befall von 0 bis 155% für die *afp*-Linie M1 und von 0 bis 78% für die *afp*-Linie 701, wobei der Anteil der Pflanzen, die eine 100%ige Resistenz zeigten, insgesamt bei 50% lag.

Bei den $T_1$-Nachkommen der *afp*-Linie B1 konnte im Durchschnitt eine Steigerung der Resistenz um 76% festgestellt werden. Da sich unter den $T_1$-Nachkommen in Bezug auf die Transgene homo-, hemizygote und nicht transgene Pflanzen befanden, erfolgte die Selektion der transgenen Pflanzen durch einen BASTA-Sprühtest. Die BASTA-empfindlichen $T_1$-Nachkommen glichen in ihrem Infektionsgrad den Wildtypkontrollen und waren somit anfällig für *P. substriata*. Unter den BASTA-resistenten $T_1$-Nachkommen befanden sich bezüglich der Transgene homo- und hemizygote Pflanzen. Im Vergleich zum Wildtyp reichte der Befallsgrad dieser Pflanzen von 0 bis 126%.

Insgesamt war der Anteil an Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp einen starken Befall aufwiesen, sehr gering. Von den untersuchten Pflanzen zeigten 5% einen Befallsgrad von mehr als 70%, wobei im Ganzen nur 2 Pflanzen stärker befallen waren als der Wildtyp.

Diese unter den Nachkommen der transgenen *afp*-Linien M1, 701 und B1 beobachtete Variabilität im erreichten Grad an Resistenz könnte auf Unterschiede in der Expressionsstärke des *Ag*-AFPs beruhen, die auf den Zygotiestatus der transgenen Pflanzen, die Anzahl der Integrierten *afp*-Kopien oder transkriptionelle bzw. posttranskriptionelle Mechanismen der Transgeninaktivierung zurückzuführen ist. Solche Differenzen in der Pilzresistenz auf Grund von unterschiedlicher Expressionsstärke des *Ag*-AFPs wurden bei Untersuchungen von Oldach und Mitarbeitern gezeigt. Dabei wies eine stark *afp*-exprimierende Weizenlinie eine erhöhte Resistenz von 36% auf, während eine mäßig exprimierende Linie zu keiner Verbesserung der Resistenz führte (Oldach *et al*., 2001b).

Bei den Infektionstests konnte eine starke *HR* beobachtet werden, die sich in Form von begrenzten Läsionen äußerte. Dieser lokale Zelltod stellt eine der stärksten Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogenbefall dar und führt zur Expression von Genen und zur Synthese von Metaboliten, die die Abwehrreaktionen aktivieren (Wong *et al*., 2002). Neben der signifikant gesteigerten Resistenz konnte bei den transgenen Pflanzen eine klare Verzögerung bei der Bildung von Pusteln im Vergleich zu den Wildtypkontrollen festgestellt werden. Wahrscheinlich war das sezernierte *Ag*-AFP Protein durch die konstitutive Expression des *afp*-Gens permanent im Apoplasten vorhanden. Die angreifenden

Pilzsporen könnten bereits vor dem Kontakt mit der Pflanzenzelle durch das *Ag*-AFP gehemmt worden sein. Dadurch würde den *afp*-exprimierenden Pflanzen ein zeitlicher Vorsprung im Vergleich zu den Wildtyp Pflanzen gewährt sein, um ihre Abwehrmechanismen zu aktivieren und eine *HR* zu entwickeln. Demnach würde das so genannte Zeitmodell bestätigt, bei dem sich resistente von suszeptiblen Pflanzen in der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Aktivierung der Abwehrkräfte unterscheiden (Prell, 1996; Elstner *et al*., 1996).

Das *Ag*-AFP zeigt in den Konzentrationen, die *in vitro* das Pilzwachstum hemmen, keine negativen Effekte auf Säugerzellen (Nakaya *et al*., 1990; Campos-Olivas *et al*., 1995). Trotzdem müssen eventuelle Risiken, die durch den Verzehr von *afp*-exprimierenden Pflanzen für die Gesundheit von Mensch und Tier entstehen könnten, wie beispielsweise Allergien, Unverträglichkeiten und Toxizität, untersucht und ausgeschlossen werden. Außerdem könnte durch die Expression des *Ag*-AFPs der Geschmack des Perlhirsekorns verändert werden. Daher wäre ein Ansatz zur gewebespezifischen und induzierbaren *afp*-Expression wünschenswert.

Wie bereits in anderen Pflanzensystemen gezeigt, kann durch den Einsatz gewebespezifischer Promotoren die Expression des Transgens in bestimmten Teilen der Pflanze erfolgen, welche dem Pathogenbefall ausgesetzt sind. Beispielsweise könnte durch die Verwendung des Promotors des Tabakgens *Nt-PHYB-1* eine spezifische Expression in Blättern, Stamm und einigen Blütenorganen erfolgen (Adam *et al.*, 1996).

Der erste Kontakt vieler Krankheitserreger mit der Pflanzen erfolgt über die Epidermis. Daher wäre eine spezifische Expression von antifungalen Genen in Zellen der Epidermis, wie z. B. unter Kontrolle des Promotors der Chitinase *ChtC2* aus Kartoffel (Ancillo *et al*., 2003), eine vielversprechende Methode zum Eindämmen einer Infektion in ihren frühen Stadien.

Die konstitutive Expression der antifungalen Gene könnte den Stoffwechsel der Pflanze unnötig belasten. Deswegen wäre eine pathogeninduzierte Expression der antifungalen Gene wichtig, weil die entsprechenden Proteine erst bei Bedarf gebildet werden. Inzwischen sind viele, durch verschiedene Agenzien induzierbare Systeme bekannt. Beispielsweise könnte der Promotor des *fis1*-Gens aus Flachs, der spezifisch nach Interaktion mit dem Flachrost Erreger *Melamspora lini* aktiviert wird, in gentechnischen Ansätzen zur Verbesserung der Pilzresistenz bei Pflanzen genutzt werden (Ayliffe *et al*., 2002). Weitere Beispiele für induzierbare Promotoren stellen die *PR*-Gene *P69B* und *P69C* aus Tomate dar, deren Promotoren erst nach Infektion mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* aktiviert werden

(Jordá und Vera, 2000) und der Promotor des *LTP1*-Gens aus Reis, der nach Inokulation mit dem Pilz *Magnaporthe grisea* induziert wird (Guiderdoni *et al*., 2002).
Dennoch sollten spezifische bzw. induzierbare endogene Promotoren aus Perlhirse isoliert und eingesetzt werden, um die Funktionsfähigkeit zu sichern, die durch Übertragung von Promotoren anderer Spezies eventuell nicht gewährleistet werden könnte.
In den hier durchgeführten *in vitro* Infektionstests variierte die für die Inokulation der Blattsegmente verwendete Sporendichte zwischen 2,3 und 20 Sporen/mm$^2$. Dabei wurden keine Unterschiede im Ablauf der Infektion bzw. Ausmaß der Resistenz festgestellt. Übertragen auf die Pflanze unter natürlichen Bedingungen wäre eine vom Infektionsgrad unabhängige Resistenzausprägung, die sich hier andeutete, vorteilhaft. Durch die insgesamt verringerte Pustelbildung an resistenten Pflanzen könnte eine Seuchenausbreitung verlangsamt oder gar verhindert werden (Obst und Paul, 1993).
Oldach und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Expression von *Ag*-AFP in Weizenpflanzen eine 30-40%ige Reduktion des Befalls durch *Erysiphe graminis f. sp. tritici* sowie *Puccinia recondita f. sp. tritici* bewirkte (Oldach *et al*., 2001b).
Die neben der hier vorliegenden Arbeit in diversen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen gezeigte antifungale Wirkung von *Ag*-AFP demonstriert, dass *Ag*-AFP gegen ein breites Spektrum von pilzlichen Krankheitserregern wirkt (Lacadena *et al*., 1995; Vila *et al*., 2001; Theis *et al*., 2003; Oldach *et al*., 2001b). Dessen Anwendung im Bereich des Pflanzenschutzes stellt daher einen erfolgversprechenden Ansatz dar.

Die *in vitro* wachstumshemmende Wirkung von Pep20 war im Vergleich zum *Ag*-AFP eingeschränkt. Selbst bei einer Konzentration von 400 µM konnte nur eine leichte Reduktion des Myzelwachstums von *P. grisea* beobachtet werden. Die inhibitorischen Konzentrationen von Pep20 gegen andere Pathogene liegen generell niedriger, wie z. B. bei 2,7 µM für *A. Solani*, 14 µM für *P. infestans* und 0,1 µM für *F. oxysporum* (Ali und Reddy, 2000; Dykes *et al*., 1998).
Die antifungale Wirkung von Pep20 auf die Pflanzenresistenz konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da das *leapep20*-Gen in der Linie 70L2 nicht transkribiert wurde bzw. die Pflanze 70L1 steril war.
Pflanzen produzieren keine linearen amphiphatischen Peptide. Die Expression dieser neuartigen, synthetischen Peptide könnten deswegen das Immunsystem von Pflanzen erweitern (Garcia-Olmedo *et al*., 1998). Die Tatsache, dass das Wachstum von *P. grisea in vitro* durch Pep20 nicht signifikant gehemmt wurde, bedeutet nicht unbedingt, dass das Peptid

generell unwirksam gegen Pilzbefall wäre. Die antimikrobiellen Peptide weisen eine gewisse Spezifität in Bezug auf Mikroorganismen auf (Oren und Shai, 1998). Dies bedeutet, dass Pep20 gegen andere Pathogene der Perlhirse, wie beispielsweise *Puccinia substriata* und *Sclerospora graminicola* eine antifungale Wirkung besitzen könnte. Außerdem verhalten sich einige synthetische Peptide *in vitro* anders als *in vivo*. Die Interaktion mit anderen Komponenten der Zelle könnte synergistisch oder aber auch antagonistisch auf die Funktion des Peptids wirken (Ali und Reddy, 2000). Zusätzlich könnte die Faltung bzw. Modifikation des Peptids in Pflanzenzellen eine Rolle bei seiner antimikrobiellen Aktivität spielen.
Die bei *in vitro* und *in planta* Ansätzen bereits gezeigte antimikrobielle Wirkung von synthetischen Peptiden gegen diverse Pflanzenpathogene (Ali und Reddy, 2000; Osusky *et al*., 2000; Li *et al*., 2001; Lopez-Garcia *et al*., 2000), ihre schnelle Synthese mit geringem Energieaufwand (Shai und Oren, 2001) und ihre niedrige Toxizität auf Säugerzellen (Dykes *et al*., 1998; Matsuzaki, 1998; Cavallarin *et al*., 1998) machen sie zu einem attraktiven Ansatz im Pflanzenschutz.

### 4.4. Ausblick

Die Verbesserung der Pilzresistenz bei Kulturpflanzen ist eins der wichtigsten Ziele der Landwirtschaft. Neben klassischen Züchtungsmethoden bietet die Gentechnik eine Methode, mit derer Hilfe neue nützliche Eigenschaften in Pflanzen eingebracht werden können.
Das in dieser Arbeit für Perlhirse etablierte Transformationssystem stellt eine Grundlage für weitere gentechnische Ansätze bereit. Die Bedingungen für die Transformation, wie z. B. Transformationsdruck, Vorbehandlungen und das Selektionssystem können weiterhin in Richtung einer höheren Transformationseffizienz optimiert werden. Ein Potential dazu bietet die in dieser Arbeit etablierte *in vitro* Suspensionskultur, aus der mit hoher Rate Pflanzen regeneriert werden können. Sie kann als Ausgangsmaterial für Methoden des Gentransfers, wie die Agrobakterien-vermittelte Transformation oder den Partikelbeschuss, genutzt werden.
Durch die Transformation des *afp*-Gens konnte in dieser Arbeit die Resistenz von Perlhirse gegen Befall durch *Puccinia substriata* deutlich gesteigert werden. Ergänzt durch Untersuchungen der Expression auf Proteinebene ergäben sich Hinweise auf das Resistenzverhalten transgener Pflanzen mit unterschiedlicher Expressionsstärke des *Ag*-AFPs.
Um die Resultate des hier durchgeführten Infektionstest zu verifizieren, wird in Zusammenarbeit mit bereits beteiligten Kooperationspartnern das Resistenzverhalten *afp*-exprimierender Pflanzen *in vivo* studiert. In Abhängigkeit von den Ergebnissen dieser Tests und der Stabilität der Transgenexpression über mehrere Generationen werden sich

Freilandversuche anschließen, um zu überprüfen ob die Resistenz unter Feldbedingungen erhalten bleibt. Des weiteren bliebe die Auswirkung des *Ag*-AFPs auf andere potentielle Pathogene der Perlhirse zu testen, um das vermittelte Resistenzspektrum zu überprüfen.

## 5. Zusammenfassung

Perlhirse (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.) gehört zu den wichtigsten Getreidearten Asiens und Afrikas und stellt dort die Lebensgrundlage für ca. 500 Millionen Menschen dar. Weltweit belegt sie in der Ertragsproduktion den sechsten Platz.
Perlhirse zeichnet sich durch ihre hohen Erträge, Toleranz gegen Hitze und Trockenheit sowie gegenüber nährstoffarmen Böden aus. Dennoch ist Perlhirse anfällig für verschiedene Krankheiten, die durch Pilzinfektion entstehen. Durch Befall mit dem Pilz *Sclerospora graminicola*, einem ihrer wichtigsten Pathogene, werden jährlich hohe Ertragseinbußen verursacht. Daher stellt die Pilzresistenz eines der wichtigsten Ziele der landwirtschaftlichen Züchtung dar. Neben klassischen Züchtungsmethoden können mit Hilfe der Gentechnik einzelne Gene gezielt in Pflanzen eingebracht werden.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung eines Transformationssystems von Perlhirse als Voraussetzung für die gentechnische Verbesserung der Pilzresistenz.
Als Methode des Gentransfers wurde die biolistische Transformation gewählt, bei der Skutelli unreifer zygotischer Embryonen transformiert wurden. Verschiedene Transformationsparameter, wie Transformationsdruck, osmotische Vorbehandlung und die Selektion wurden optimiert. Mit dem hier für die Transformation von Perlhirse entwickelten Protokoll wurde eine Transformationsrate von 0,3% erreicht.
Ferner wurden das antifungale *afp*-Gen aus *Aspergillus giganteus* und das für das synthetische antimikrobielle Peptid Pep20 kodierende Gen *leapep20* jeweils stabil in Perlhirse transformiert. Insgesamt konnten 6 transgene Perlhirse Pflanzen regeneriert werden. Bei der Pflanzen B2 wurden die Transgene nicht an die Nachkommen vererbt. Von den 2 *leapep20*-Pflanzen war die Pflanze 70L1 steril, bei der Linie 70L2 konnte kein Transkript des antimikrobiellen Gens nachgewiesen werden.
Die 3 *afp*-exprimierenden Linien M1, B1 und 701 zeigten in dem hier durchgeführten *in vitro* Infektionstest mit dem Rosterreger *Puccinia substriata* eine deutliche Steigerung der Resistenz von bis zu 90%.
Zusätzlich wurde eine Suspensionskultur und ein effizientes *in vitro* Regenerationssystem für Suspensionskulturen von Perlhirse etabliert. Hierdurch können größere Mengen an regenerationsfähigem Material schnell produziert und dessen Potenzial insbesondere für Transformationszwecke genutzt werden.

## 6. Literatur

Adam E, Kozma-Bognar L, Kolar C, Schafer E, Nagy F (1996). The tissue-specific expression of a tobacco phytochrome B gene. Plant Physiol 110(4): 1081-1088.

Agrios GN (1994). Plant pathology, 4. eds, Academic Press.

Albert H, Dale EC, Lee E, Ow DW (1995). Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. The Plant J 7(4): 649-659.

Ali GS, Reddy AS (2000). Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: *in vitro* growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression. Mol Plant Microbe Interact 13: 847-859.

Allouis S, Qi X, Lindup S, Gale MD, Devos KM (2001). Construction of a BAC library of pearl millet, *Pennisetum glaucum*. Theor Appl Genet 102: 1200-1205.

Ancillo G, Hoegen E, Kombrink E (2003). The promoter of the potato chitinase C gene directs expression to epidermal cells. Planta Published online 6 May 2003, DOI: 10.1007/s00425-003-1029-0.

Armaleo D, Ye GN, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. Curr Genet 17: 97-103.

Ayliffe MA, Roberts JK, Mitchell HJ, Zhang R, Lawrence GJ, Ellis JG, Pryor TJ (2002). A plant gene up-regulated at rust infection sites. Plant Physiol 129: 169-180.

Baldino F, Chesselet MF, Lewis ME (1989). High-resolution *in situ* hybridization histochemistry. Meth Enzymol 168: 761-777.

Baucher M, Monties B, Montagu MV, Boerjan W (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. Crit Rev Plant Sci 17(2): 125-197.

Bechinger B (1999). The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. Biochim Biophys Acta 1462(1-2): 157-83

Becker D, Brettschneider R, Lörz H (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue . Plant J 5(2): 299-307.

Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ (2001). The rest is silence. RNA 7: 1509-1521.

Bialy H (1992). Transgenic wheat finally produced. Bio/Technol 10: 630.

Board on science and technology for international development (1996). Volume 1: Lost crops of Africa, Grains. National Research Council, USA.

Bohlmann H (1994). The role of thionins in plant protection. Crit Rev Plant Sci 13(1): 1-16.

Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annu Rev Phytopathol 28: 113-138.

Bolar JP, Norelli JL, Harman GE, Brown SK, Aldwinckle HS (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride (T. harzinum)* against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. Trans Res 10: 533-543.

Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. Cell 70: 21-30.

Breitler JC, Labeyrie A, Meynard D, Legavre T, Guiderdoni E (2002). Efficient microprojectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. Theor Appl Genet 104: 709-719.

Brettschneider R, Becker D, Lörz H (1997). Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. Theor Appl Genet 94: 737-748.

Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. The Plant Cell 6: 1703-1712.

Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW (1997). Antimicrobial peptides from plants. Crit Rev Plant Sci 16(3): 297-323.

Campbell MA, Fitzgerald HA, Ronald PC (2002). Engineering pathogen resistance in crop plants. Trans Res 11: 599-613.

Campos-Olivas R, Bruix M, Santoro J, Lacadena J, Martinez del Pozo A, Gavilanes JG, Rico M (1995). NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. Biochemistry 34: 3009-3021.

Carvalho CHS, Bohorova N, Bordallo PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W, Paiva E (1997). Typ II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. Plant Cell Rep 17: 73-76.

Cavallarin L, Andreu D, San Segundo B (1998). Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. MPMI 11(3): 218-227.

Chakrabarti A, Ganapathi TR, Mukherjee PK, Bapat VA (2003). MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. Planta 216: 587-596.

Chen L, Zhang S, Beachy RN, Fauquet CM (1998). A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. Plant Cell Rep 18: 25-31.

Cheng M, Joyce EF, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan D, Conner T, Wan Y (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol 115: 971-980.

Choi S, Begum D, Koshinsky H, Ow DW, Wing RA (2000). A new approach for the identification and cloning of genes: the pBACwich system using Cre/lox site-specific recombination. Nucleic Acide Res 28(7): E19.

Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Mol Biol 18: 675-689.

Christou P, Ford TL, Kofron M (1991). Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Technol 9: 957-962.

Colilla FJ, Rocher A, Mendez E (1990). γ-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. FEBS Lett 270: 191-194.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B (2002). Priming in plant-pathogen interactions. Trends Plant Sci 7(5): 210-216.

Davis JM, Wu H, Cooke JEK, Reed JM, Scott Luce K, Michler CH (2002). Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologues in pine. MPMI 15(4): 380-387.

Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H, Ow DW (2000). Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. Gen Dev 14: 2869-2880.

De Gray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Physiol 127: 852-862.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol Biol Rep 4: 19-21.

Deng XY, Wei ZM, An HL (2001). Transgenic peanut plants obtained by particle bombardment via somatic embryogenesis regenerationsystem. Cell Res 11(2): 156-160.

Desmyter S, Vandenbussche F, Hao Q, Proost P, Peumans WJ, Van Damme EJM (2003). Type-1 ribosome-inactivating protein from iris bulbs: a useful agronomic tool to engineer virus resistance? Plant Mol Biol 51: 567-576.

Devi P, Zhong H, Sticklen MB (2000). *In vitro* morphogenesis of pearl millet *(Pennisetum glaucum* (L:) R. Br.): efficient production of multiple shoots and inflorescences from shoot apices. Plant Cell Rep 19: 251-260.

De Wit PJGM (1992). Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plants pathogens. Annu Rev Phytopathol 30: 391-418.

De Wit PJGM (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends Plant Sci 2(12): 452-458.

Dixon RA (2001). Natural products and plant disease resistance. Nature 411: 843-847.

Dixon RA, Steele CL (1999). Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. Trends Plant Sci 4(10): 394-400.

Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL, Simmonds DH (2001). Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotina sclerotiorum*. Physiol and Mol Plant Pathol 59: 297-307.

Dykes GA, Aimoto S, Hastings JW (1998). Modification of a synthetic antimicrobial peptide (ESF1) for improved inhibitory activity. Biochem Biophys Res Comm 248: 268-272.

Ellis J, Dodds P, Pryor T (2000a). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. Curr Opin Plant Biol 3: 278-284.

Ellis J, Dodds P, Pryor T (2000b). The generation of plant disease resistance gene specificities. Trends Plant Sci 5(9): 373-379.

Elstner EF, Oßwald W, Schneider I (1996). Phytopathologie, Allgemeine und biochemische Grundlagen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford.

Emani C, Sunilkumar G, Rathore KS (2002). Transgene silencing and reactivation in *Sorghum*. Plant Sci 162: 181-192.

Emons AMC, Samallo-Droppers A, Van Der Toorn C (1993). The influence of sucrose, mannitol, L-prolin, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. J Plant Physiol 142: 597-604.

Endo S, Kasahara T, Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H (2001). The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SRI). Plant Cell Rep 20: 60-66.

Epand RF, Umezawa N, Porter EA, Gellman SH, Epand RM (2003). Interactions of the antimicrobial β-17 with phospholipid vesicles differ from membrane interactions of magainins. Eur J Biochem 270: 1240-1248.

FAO (1998) Production yearbook. Vol 52, FAO, United Nations, Rome.

FAO (2000) http//:www.fao.org.

Finer JJ, Vain P, Jones MW, McMullen MD (1992). Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. Plant Cell Rep 11: 323-328.

Finnegan J, McElroy D (1994). Transgene inactivation: plants fight back! Bio/Technol 12: 883-888.

Finnegan E, Genger R, Peacock W, Dennis E (1998). DNA methylation in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 223-247.

Flor HH (1947). Host-parasite interactions in flax rust. Its genetics and other implications. Phytopathol 45: 680-685.

Flor HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol 9: 275-296.

Fu X, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A (2000). Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. Trans Res 9: 11-19.

Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo A, Rodriguez-Palenzuela P (1998). Plant defense peptides. Biopoly 47: 479-491.

Gao A, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J, Rommens CMT (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of plant defensin peptide. Nature Biotech 18: 1307-1310.

Girgi M,. O'Kennedy MM, Morgenstern A, Mayer G, Lörz H, Oldach KH (2002). Transgenic and herbicide resistant pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) R.Br. via microprojectile bombardment of scutellar tissue. Mol Breeding 10: 243-252.

Gless C, Lörz H, Jähne-Gärtner A (1998). Transgenic oat plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of leaf base segments. J Plant Physiol 152: 151-157.

Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams WR, Willetts NG, Rice TB, Mackey CJ, Krueger RW, Kausch AP, Lemaux PG (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. The Plant Cell 2: 603-618.

Graham TL, Graham MY (1996). Signaling in soybean phenylpropanoid responses (Dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments). Plant Physiol 110(4): 1123-1133.

Guiderdoni E, Cordero MJ, Vignols F, Garcia-Garrido JM, Lescot M, Tharreau D, Meynard D, Ferriere N, Notteghem JL, Delseny M (2002). Inducibility by pathogen attack and developmental regulation of the rice *Ltp1* gene. Plant Mol Biol 49(6): 683-699.

Gun Lee D, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS (1999). Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. Biochem Biophys Res Commun 263(3): 646-651.

Hahn MG (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. Annu Rev Phytopathol 34: 387-412.

Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stöcker RH, Stenzel K (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature 361: 153-156.

Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT (1998). Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. Plant Cell Rep 18: 76-81.

Hammond-Kosack K, Jones JDG (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. The Plant Cell 8: 1773-1791.

Hammond-Kosack K, Jones JDG (2000). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones RL (ed.), Responses to plant pathogens. Biochemistry and molecular biology of plants, American society of plant physiologists, pp: 1102-1156.

Hannon GJ (2002). RNA interference. Nature 418: 244-251.

Hansen G, Wright MS (1999). Recent advances in the transformation of plants. Trends Plant Sci 4(6): 226-231.

Haran S, Schickler H, Chet I (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiol 142: 2321-2331.

Heath MC (1997a). Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. Europ J of Plant Pathol 104: 117-124.

Heath MC (1997b). Signaling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. Annals of Botany 80: 713-720.

Hennin C, Diederichsen E, Höfte M (2001). Local and systemic resistance to fungal pathogens triggered by an AVR9-mediated hypersensitive response in tomato and oilseed rape carrying the Cf-9 resistance gene. Physiol and Mol Plant Pathol 59: 287-295.

Heß, D (1992). Biotechnologie der Pflanzen: eine Einführung. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.

Hoa TTC, Bong BB, Huq E, Hodges TK (2002). Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a trangene from the rice genome. Theor Appl Genet 104: 518-525.

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholz D, Rogers SG, Fraley RT (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. Sci 227: 1229-1231.

Horvath H, Rostoks N, Brueggeman R, Steffenson B, Von Wettstein D, Kleinhofs A (2003). Genetically engineered stem rust resistance in barley using the *Rpg1* gene. PNAS 100(1): 364-369.

Huang HW (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. Biochem 39(29): 8347-8352.

Hunold R, Bronner R, Hahne G (1994). Early event in microprojectile bombardment, cell viability and particle location. Plant J 5: 593-604.

Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotech 14: 745-750.

Jähne A, Lazzeri PA, Lörz H (1991). Regeneration of fertile plants from protoplasts derived from embryogenic cell suspension of barley (*Hordum vulgare* L.). Plant Cell Rep 10: 1-6.

James VA, Avart C, Worland B, Snape JW, Vain P (2002). The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. Theor Appl Genet 104: 553-561.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Rep 5: 387-405.

Jordá L, Vera P (2000). Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of PR gene expression. Plant physiol 124: 1049-1057.

Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Mol Biol 43: 179-188.

Kamoun S, Huitema E, Vleeshouwers VGGA (1999). Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? Trends Plant Sci 4(5): 196-200.

Kirk TK (1971). Effects of microorganisms on lignin. Ann Rev Phytopathol 9: 185-210.

Kishimoto K, Nishizawa Y, Tabei Y, Hibi T, Nakajima M, Akutsu K (2002). Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). Plant Sci 162: 655-662.

Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70-73.

Klein, TM, Jones, TJ (1999). Methods of genetic transformation: the gene gun. In: I.K. Vasil (ed.) Molecular improvement of Cereal Crop, Kluwer Academic, London, pp 21-42 ISBN 0-7923-5471-0.

Knogge W (1996). Fungal infection of plants. The Plant Cell 8: 1711-1722.

Kohli A, Leech M, Vain P, Laurie D, Christou P (1998). Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. PNAS 95: 7203-7208.

Kumar VU, Meera MS, Shishupala S, Shetty HS (1993). Quantification of *Sclerospora graminicola* in tissues of *Pennisetum glaucum* using an enzyme-linked immunosorbent assay. Plant Pathol 42: 251-255.

Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Iyer LM, Li G, Hall TC (1998). Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. Trends Plant Sci 3(3): 97-104.

Lacadena J, Martinez del Pozo A, Gasset M, Patino B, Campos-Olivas R, Vazquez C, Martinez-Ruiz A, Mancheno JM, Onaderra M, Gavilanes JG (1995). Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. Archives of Biochemistry and Biophysics 2(20):273-281.

Lambé P, Dinant M, Matagne RF (1995). Differential long-term expression and methylation of the hygromycin phosphotransferase (*hph*) and beta glucuronidase (*gus*) genes in transgenic pearl millet (*Pennisetum glaucum)* plants. Plant Science 108(1): 51-62.

Lambé P, Dinant M, Deltour R (2000). Transgenic pearl millet (*Pennisetum glaucum*). In: Bajaj YPS (ed.), Biotechnology in agriculture and forestry, Transgenic crops I. Vol. 46. Springer, New York, pp: 84-108.

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet 60: 197-214.

Lawton KA, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessman H, Staub T, Ryals J (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant J 10(1): 71-82.

Lazzeri PA, Brettschneider R, Lührs R, Lörz H (1991). Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. Theor Appl Genet 81: 437-444.

Leah, R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J (1991). Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. J Biol Chem 266: 1464-1473.

Li H, Devaux P (2003). High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. Plant Sci 164: 379-386.

Li Q, Lawrence CB, Xing HY, Babbitt RA, Troy Bass W, Maiti IB, Everett NP (2001). Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. Planta 212: 635-639.

Linthorst HJM (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. Crit Rev Plant Sci 10(2): 123-150.

Lörz H, Baker B, Schell J (1985). Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. Mol Gen Genet 199: 178-182.

Lörz H, Göbel E, Brown P (1988). Advances in tissue culture and progress towards genetic transformation of cereals. Plant Breeding 100: 1-25.

Lörz H, Lazzeri PA (1992). In vitro regeneration and genetic transformation of barley. Barley genet VI, II: 807815.

López-García B, González-Candelas L, Pérez-Payá E, Marcos JF (2000). Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. MPMI 13(8): 837-846.

Lorito M, Peterauer C, Hayes CK, Harman GE (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. Microbiol 140: 632-629.

Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. PNAS 95: 7860-7865.

Lucca P, Ye X, Potrykus I (2001). Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. Mol Breeding 7: 43-49.

Luke Mankin S, Allen GC, Phelan T, Spiker S, Thompson WF (2003). Elevation of transgene expression level by matrix attachment regions (MAR) is promoter dependent: a study of the interactions of six promoters with the RB7 3‘ MAR. Trans Res 12: 3-12.

Martin GB (1999). Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. Curr Opin Plant Biol 2: 273-279.

Matsuzaki K (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypetides. Biochem et Biophys Acta 1376: 391-400.

McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Cristou P (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technol 6: 923-926.

Mejza SJ, Morgant V, DiBona DE, Wong JR (1993). Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. Plant Cell Rep 12: 149-153.

Mellersh DG, Foulds IV, Higgins VJ, Heath MC (2002). $H_2O_2$ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. The Plant Journal 29(3): 257-268.

Michelmore R (2000). Genomic approaches to plant disease resistance. Curr Opin Plant Biol 3: 125-131.

Mitchell-Olds T, Bergelson J (2000). Biotic interactions. Genomic and coevolution. Curr Opin Plant Biol 3: 273-277.

Morgenstern A (2000). Etablierung eines *in vitro*-Kultursystems für *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Müller E, Brown PTH, Hartke S, Lörz H (1990). DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. Theor Appl Genet 80: 673-679.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.

Nagarathna KC; Shetty SA; Harinarayana G; Shekar Shetty H (1993). Selection for downy mildew resistance from the regenerants of pearl millet. Plant Sci 90: 53-61.

Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. Nucl Acid Res 28(1): 292.

Nakaya K, Omata K, Okahashi I, Nakamura Y, Kolkenbrock H, Ulbrich N (1990). Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. Eur J Biochem 193: 31-38.

Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G (2000). The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. Plant Cell Rep 19: 798-803.

Nehra NS, Chibbar RN, Leung N, Caswell K, Mallard C, Steinhauer L, Baga M, Kartha KK (1994). Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissue following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. The Plant J 5(2): 285-297.

Nösberger J, Geiger HH, Struik PC (2001). Crop science: progress and prospects: Heidhues F, The future of world, national and household food security. CABI Publishing, UK.

Oakeley EJ (1999). DNA methylation analysis: a review of current methodologies. Pharmacol Ther 84: 389-400.

Obst A, Paul VH (1993). Krankheiten und Schädlinge des Getreides. 1. Auflage, Th. Mann Verlag. Gelsenkirchen-Buer, Deutschland.

O'Kennedy MM, Burger JT, Berger DK (2001): Transformation of elite white maize using the particle inflow gun and detailed analysis of a low-copy integration event. Plant Cell Rep 20: 721-730.

Oldach KH, Morgenstern A, Rother S, Girgi M, O'Kennedy M, Lörz H (2001a). Efficient *in vitro* regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Plant Cell Rep 20: 416-421.

Oldach K, Becker D, Lörz (2001b). Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. MPMI 14(7): 832-838.

Oren Z, Shai Y (1998). Mode of action of linear amphipatic alpha-helical antimicrobial peptides. Biopoly 47(6): 451-463.

Osusky M, Zhou G, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S (2000). Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogenes. Nat Biotechnol 18: 1162-1166.

Park SW, Stevens NM, Vivanco JM (2002). Enzymatic specificity of three ribosome-inactivating proteins against fungal ribosomes, and correlation with antifungal activity. Planta 216: 227-234.

Pawlowski WP, Somers DA (1998). Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. PNAS 95: 12106-12110.

Prell HH (1996). Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

Rajasekaran K, Stromberg KD, Cary JW, Cleveland TE (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity *in vitro* of the synthetic peptide D4E1. J Agric Food Chem 49: 2799-2803.

Renckens S, De Greve H, Van Montagu M, Hernalsteens JP (1992). *Petunia* plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. Mol Gen Genet 233: 53-64.

Ritala A, Mannonen L, Aspegren K, Salmenkallio-Marttila M, Kurtén U, Hannus R, Mendez-Lozano J, Teeri TH, Kauppinen V (1993). Stable transformation of barley tissue culture by particle bombardment. Plant Cell Rep 12: 435-440.

Ritala A, Aspegren K, Kurtén U, Salmenkallio-Marttila M, Mannonen L, Hannus R, Kauppinen V, Teeri TH, Enari TM (1994). Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. Plant Mol Biol 24: 317-325.

Rother S (1995). Etablierung von *in vitro*-Regenerationssystemen als Grundlage für die Transformation von *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Dissertation, Universität Hamburg.

Ryals J, Uknes S, Ward E (1994). Systemic acquired resistance. Plant Physiol 104: 1109-1112.

Sadri R, Hornsby PJ (1996). Rapid analysis of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification. Nucleic Acid Res 24(24): 5058-5059.

Sairam RV, Seetharama N, Devi PS, Verma A, Murthy UR, Potrykus I (1999). Culture and regeneration of mesophyll-derived protoplasts of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Plant Cell Rep 18: 972-977.

Sambrook F, Fritsch EF, Maniatis F (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2nd. ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987). Delivery of substances into cells and tissue using a particle bombardment process. J Part Sci Technol 5: 27-37.

Serazetdinova L. (2001). Transformation von weizen (*Triticum aestivum* L.) mit drei stilbensynthasekodierenden Genen zur Verbesserung der Pilzresistenz. Dissertation, Universität Hamburg.

Shai Y, Oren Z (2001). From "carpet" mechanism to *de novo* designed diastereometric cell-selective antimicrobial peptides. Peptides 22: 1629-1641.

Shetty HS, Vasanthi NS, Sarosh BR, Kini KR (2001). Inheritance of downy mildew resistance, β-1,3-glucanases and peroxidases in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] crosses. Theor Appl Genet 102: 1221-1226.

Shirasu K, Schulze-Lefert P (2000). Regulators of cell death in disease resistance. Plant Mol Biol 44: 371-385.

Silva MG, Nicole M, Guerra-Guimaraes L, Rodrigues CJ (2002). Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. Physiol Mol Plant Pathol 60: 169-183.

Singh SD, King SB, Werder J (1993). Downy mildew disease of pearl millet. ICRISAT (India), Information Bulletin No. 37.

Spiker S, Thompson WF (1996). Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants. Plant Physiol 110: 15-21.

Srivastava V, Anderson OD, Ow DW (1999). Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. PNAS 96: 11117-11121.

Strauch E, Wohlleben W, Arnold W, Alijah R, Pühler H, Wöhner G, Marquardt R, Grabley S, Brauer D, Bartsch K (1988). Phosphinotricin resistance gene and its use. Patent Hoechst AG. EP 0257542-A1.

Stripe F, Barbieri L (1986). Ribosome-inactivating proteins up to date. FEBS Lett 195 (1-2): 1-8.

Stripe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. Bio/Technol 10: 405-412.

Svitashev SK, Pawlowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA (2002). Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. The Plant J 32: 433-445.

Swedlund B, Vasil IK (1985). Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. Theor Appl Genet 69: 575-581.

Takei J, Remenyi A, Dempsey CE (1999). Generalized bilayer perturbation from peptide helix dimerisation at membrane surfaces: vesicle lysis induced by disulphide-dimerised melittin analogues. FEBS Lett 442: 11-14.

Tang W, Luo XY, Sanmuels V (2001). Gene silencing: double-stranded RNA mediated *m*RNA degradation and gene inactivation. Cell Res 11(3): 181-186.

Taylor GM, Vasil IK (1991). Histology of, and physical factors affecting, transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) embryos following microprojectile bombardment. Plant Cell Rep 10: 120-125.

Taylor NJ, Fauquet CM (2002). Microprojectile bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. DNA and Cell Biol 21(12): 963-977.

Terras FRG, Eggermount K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF (1995). Small cystein-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. The Plant Cell 7: 573-588.

Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U (2003). The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47(2): 588-593.

Tiwari BS, Belenghi B, Levine A (2002). Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. Plant Physiol 128: 1271-1281.

Tomes DT (1990). Transformation in corn: non sexual gene transfer. In Annual Meeting Proceedings of 26$^{th}$ Annual Corn Breeders School, J Dudley, ed (Champaign, IL: University of Illinois), 7-9.

Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidobsis*. MPMI 15(1): 27-34.

Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, Hinata K (1988). Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. Biotch 6: 1072-1074.

Toyoda K, Collins NC, Takahashi A, Shirasu K (2002). Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. Trans Res 11: 567-582.

Umesha S, Shylaja Dharmesh, Shekar Shetty H (2000). Lytic activity in pearl millet: its role in downy mildew disease resistance. Plant Sci 157: 33-41.

Vain P, McMullen MD, Finer JJ (1993). Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. Plant Cell Rep 12: 84-88.

Vain P, James VA, Worland B, Snape JW (2002). Transgene behavior across two generations in a large population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. Theor Appl Genet 105: 878-889.

Valent B, Farrall L, Chumley F (1991). *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics 127: 87-101.

Van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrenssen AWM, Van der Plas LHW, Van der Krol AR (2001). Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promotor activity in plants. J Exp Bot 52(358): 949-959.

Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol Biol Rep 12(3): 245-264.

Van Loon LC, Van Strien (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol Mol Plant Pathol 55: 85-97.

Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann Rev Phytopathol 18: 259-288.

Vasil V, Vasil IK (1981a). Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum*). Ann Bot 47: 669-678.

Vasil V, Vasil IK (1981b). Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* x *P. Purpureum* hybrid. Amer J Bot 68(6): 864-872.

Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Bio/Technol 10: 667-674.

Vieira J, Messing J (1982). The pUC plasmid, a M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19: 259-268.

Vila L, Lacadena V, Fontanet P, Martinez del Pozo A, San Segundo B (2001). A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. MPMI 14(11): 1327-1331.

Wakita Y, Otani M, Iba K, Shimada T (1998): Co-integration, co-expression and co-segregation of an unlinked selectable marker gene and *NtFAD3* gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment. Genes Genet Syst 73: 219-226.

Wan Y, Lemaux PG (1994). Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol 104: 37-48.

Wassenegger M (2000). RNA-directed DNA methylation. Plant Mol Biol 43: 203-220.

Wendt S, Ulbrich N, Stahl U (1994). Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. Curr Genet 25: 519-523.

Wilson JP (2000). Pearl millet diseases: A compilation of information on the known pathogens of pearl millet, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Agriculture Handbook No. 716.

Wong CE, Carson RAJ, Carr JP (2002). Chemically induced virus resistance in *Arabidobsis thaliana* is indipendent of pathogenesis-related protein expression and the NPR1 gene. MPMI 15(1): 75-81.

Wu H, McCormac AC, Elliott MC, Chen DF (1998). *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordum vulgare*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 54: 161-171.

Yang Y, Shah J, Klessig DF (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. Gen Dev 11: 1621-1639.

Young ND (2000). The genetic architecture of resistance. Curr Opin in Plant Biol 3: 285-295.

Zasloff M (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415: 389-395.

Zhao ZY, Cai T, Tagliani L, Miller M, Wang N, Pang H, Rudert M, Schroeder S, Hondred D, Seltzer J, Pierce D (2000). *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. Plant Mol Biol 44: 789-798.

Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA, Lamb CJ (1994). Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in tobacco. Bio/Technol 12: 807-812.

Zimny J, Becker D, Brettschneider R, Lörz H (1995). Fertile, transgenic *Triticale* (x *Triticosecale* Wittmack). Mol Breed 1: 155-164.

# 7. Anhang

**Tabelle 1:** Inokulation von homozygoten $T_2$-Blattsegmenten der Linie M1 mit 20 Sporen/mm$^2$.

| **Pflanze** | **Pusteln/Blattsegment** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp** | 98 | 92 | 68 | | | |
| **Manga Nara** | 96 | 65 | 58 | | | |
| | 49 | 83 | 49 | 73,1 | 19,6 | **100%** |
| **M1-$T_2$** | | | | | | |
| 1 | 7 | 1 | 1 | 3 | 3,5 | 4,1 |
| 2 | 52 | 32 | 14 | 32,7 | 19 | 44,7 |
| 3 | 90 | 33 | 60 | 61 | 28,5 | 83,4 |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 0,3 | 0,6 | 0,4 |
| 5 | 0 | 0 | 7 | 2,3 | 4 | 3,1 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 8 | 4 | 1 | 4,3 | 3,5 | 5,8 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 6 | 2 | 0 | 2,7 | 3,1 | 3,5 |
| 11 | 0 | 2 | 0 | 0,7 | 1,2 | 0,9 |
| 12 | 6 | 7 | 8 | 7 | 1 | 9,6 |
| 13 | 10 | 16 | 8 | 11,3 | 4,2 | 15,5 |
| 14 | 0 | 1 | 13 | 4,7 | 7,2 | 6,4 |
| 15 | 0 | 8 | 0 | 2,7 | 4,6 | 3,7 |
| 16 | 1 | 0 | 20 | 7 | 11,3 | 9,6 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | **Mittelwert des Befalls** | | **10,6%** |

**Tabelle 2:** Inokulation von homozygoten $T_2$-Blattsegmenten der Linie M1 mit 2,4 Sporen/mm$^2$.

| **Pflanze** | **Pusteln/Blattsegment** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp** | 17 | 17 | 19 | | | |
| **Manga Nara** | 36 | 31 | 25 | | | |
| | 14 | 13 | 25 | | | |
| | 21 | 15 | 25 | | | |
| | 14 | 16 | 19 | | | |
| | 15 | 17 | 20 | 19,9 | 6,3 | **100%** |
| **M1-$T_2$** | | | | | | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 1 | 0 | 1 | 0,7 | 0,6 | 3,5 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 1 | 1 | 0,7 | 0,6 | 3,5 |
| 8 | 10 | 15 | 13 | 12,7 | 2,5 | 60 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 37 | 30 | 28 | 31,7 | 4,7 | 155 |
| 11 | 2 | 0 | 0 | 0,7 | 1,2 | 3,5 |
| 12 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 5 |
| 13 | 5 | 2 | 0 | 2,3 | 2,5 | 11,5 |
| 14 | 16 | 8 | 13 | 12,3 | 4 | 61,5 |
| 15 | 5 | 0 | 7 | 4 | 3,6 | 20 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 1 | 0 | 1 | 0,7 | 0,6 | 3,5 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 22 | 16 | 11 | 16,3 | 5,5 | 81,5 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1,7 | 5 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 1 | 0 | 1 | 0,7 | 0,6 | 3,5 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 3 | 4 | 3 | 3,3 | 0,6 | 16,7 |
| 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | **Mittelwert des Befalls** | | **14,5%** |

**Tabelle 3:** Inokulation von homozygoten $T_2$-Blattsegmenten der Linie M1 mit 3,2 Sporen/mm$^2$.

| **Pflanze** | **Pusteln/Blattsegment** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp Manga Nara** | 17 | 19 | 20 | | | |
| | 15 | 11 | 20 | | | |
| | 8 | 13 | 10 | | | |
| | 15 | 25 | 34 | | | |
| | 12 | 16 | 15 | 16,7 | 6,5 | **100%** |
| **M1-$T_2$** | | | | | | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 7 | 1 | 1 | 3 | 3,5 | 18 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 13 | 7 | 5 | 8,3 | 4,2 | 50 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 3 | 4 | 2,3 | 2,1 | 14 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 1 | 0 | 0 | 0,3 | 0,6 | 2 |
| 9 | 0 | 0 | 1 | 0,3 | 0,6 | 2 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 2 | 0 | 0,7 | 1,2 | 4 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 1 | 0 | 0 | 0,3 | 0,6 | 2 |
| 14 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 6 |
| 15 | 1 | 1 | 0 | 0,7 | 0,6 | 4 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 1 | 1 | 0,7 | 0,6 | 4 |
| 19 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 6 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 1 | 0,3 | 0,6 | 2 |
| 25 | 9 | 6 | 4 | 6,3 | 2,5 | 38 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 6 |
| 28 | 0 | 1 | 4 | 1,7 | 2,1 | 10 |
| 29 | 11 | 10 | 18 | 13 | 4,4 | 78 |
| | | | | **Mittelwert des Befalls** | | **8,5%** |

**Tabelle 4:** Inokulation von homozygoten $T_2$-Blattsegmenten der Linie 701 mit 2,4 Sporen/mm$^2$.

| **Pflanze** | **Pusteln/Blattsegment** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp 7042** | 10 | 15 | 11 | | | |
| | 26 | 20 | 25 | | | |
| | 10 | 10 | 12 | 15,4 | 6,6 | **100%** |
| **701-$T_2$** | | | | | | |
| 1 | 2 | 0 | 0 | 0,7 | 1,2 | 4,5 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 2 | 4 | 0 | 2 | 2 | 12,9 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 3 | 1 | 3 | 2,3 | 1,2 | 14,9 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 6,5 |
| 9 | 12 | 12 | 7 | 10,3 | 2,9 | 67,1 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2,3 | 1,2 | 14,9 |
| 12 | 0 | 5 | 1 | 2 | 2,6 | 12,9 |
| 13 | 6 | 6 | 4 | 5,3 | 1,2 | 34,6 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 6 | 7 | 4 | 5,7 | 1,5 | 36,7 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 1 | 1 | 0 | 0,7 | 0,6 | 4,5 |
| 19 | 8 | 12 | 16 | 12 | 4 | 77,9 |
| 20 | 0 | 0 | 6 | 2 | 3,5 | 12,9 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | **Mittelwert des Befalls** | | **14,3%** |

**Tabelle 5:** Inokulation von homozygoten $T_2$-Blattsegmenten der Linie 701 mit 2,3 Sporen/mm$^2$.

| **Pflanze** | **Pusteln/Blattsegment** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp 7042** | 37 | 29 | 35 | | | |
| | 35 | 28 | 31 | | | |
| | 36 | 31 | 23 | | | |
| | 31 | 29 | 27 | | | |
| | 25 | 22 | 24 | | | |
| | 22 | 17 | 26 | | | |
| | 20 | 16 | 19 | | | |
| | 22 | 15 | 21 | 25,9 | 6,4 | **100%** |
| **701-$T_2$** | | | | | | |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 0,3 | 0,6 | 1,3 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 1 | 2 | 1 | 1,3 | 0,6 | 5,2 |
| 4 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1,7 | 3,9 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 7 | 2 | 5 | 4,7 | 2,5 | 18 |
| 8 | 0 | 0 | 2 | 0,7 | 1,2 | 2,6 |
| 9 | 2 | 1 | 2 | 1,7 | 0,6 | 6,4 |
| 10 | 0 | 0 | 1 | 0,3 | 0,6 | 1,3 |
| 11 | 4 | 5 | 3 | 4 | 1 | 15,5 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 1 | 1 | 2 | 1,3 | 0,6 | 5,2 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 3 | 6 | 6 | 5 | 1,7 | 19,3 |
| 17 | 1 | 1 | 0 | 0,7 | 0,6 | 2,6 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 1 | 1 | 0,7 | 0,6 | 2,6 |
| 20 | 3 | 3 | 0 | 2 | 1,7 | 7,7 |
| 21 | 2 | 1 | 1 | 1,3 | 0,6 | 5,2 |
| 22 | 3 | 3 | 2 | 2,7 | 0,6 | 10,3 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 3 | 5 | 6 | 4,7 | 1,5 | 18 |
| 26 | 2 | 0 | 6 | 2,7 | 3,1 | 10,3 |
| 27 | 2 | 2 | 4 | 2,7 | 1,2 | 10,3 |
| 28 | 0 | 1 | 4 | 1,7 | 2,1 | 6,4 |
| 29 | 1 | 1 | 3 | 1,7 | 1,2 | 6,4 |
| **Mittelwert des Befalls** | | | | | | **5,5%** |

**Tabelle 6:** Inokulation von homozygoten $T_2$-Blattsegmenten der Linie 701 mit 3,2 Sporen/mm$^2$.

| **Pflanze** | **Blattsegmente** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp** | 63 | 52 | 56 | | | |
| **7042** | 45 | 65 | 62 | | | |
| | 98 | 85 | 87 | | | |
| | 41 | 51 | 33 | | | |
| | 36 | 24 | 42 | | | |
| | 38 | 36 | 36 | 52,8 | 20,6 | **100%** |
| **701-$T_2$** | | | | | | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 8 | 10 | 5 | 7,7 | 2,5 | 14,5 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1,9 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 1 | 0 | 0,3 | 0,6 | 0,6 |
| 8 | 1 | 1 | 3 | 1,7 | 1,2 | 3,2 |
| 9 | 3 | 4 | 3 | 3,3 | 0,6 | 6,3 |
| 10 | 21 | 10 | 7 | 12,7 | 7,4 | 24 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 3 | 2 | 8 | 4,3 | 3,2 | 8,2 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 1 | 0 | 0 | 0,3 | 0,6 | 0,6 |
| 21 | 8 | 9 | 2 | 6,3 | 3,8 | 12 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 20 | 22 | 10 | 17,3 | 6,4 | 32,8 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 15 | 10 | 8 | 11 | 3,6 | 20,8 |
| 27 | 20 | 22 | 15 | 19 | 3,6 | 36 |
| 28 | 5 | 0 | 5 | 3,3 | 2,9 | 6,3 |
| | | | | **Mittelwert des Befalls** | | **6%** |

**Tabelle 7:** Inokulation von $T_1$-Blattsegmenten der Linie B1 mit 2,4 Sporen/$mm^2$.

| **Pflanze** | **Pusteln/Blattsegment** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp** | 2 | 13 | 20 | | | |
| **Bongo Nara** | 12 | 18 | 17 | | | |
| | 11 | 11 | 15 | | | |
| | 9 | 7 | 11 | | | |
| | 33 | 34 | 24 | | | |
| | 17 | 22 | 1 | | | |
| | 6 | 8 | 22 | | | |
| | 18 | 16 | 19 | 15,3 | 8,3 | **100%** |
| **B1-$T_1$** | | | | | | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 5 | 2 | 0 | 2,3 | 2,5 | 15,2 |
| 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 13,1 |
| 4 | 9 | 7 | 14 | 10 | 3,6 | 65,4 |
| 5 | 15 | 13 | 15 | 14,3 | 1,2 | 93,7 |
| 6 | 2 | 0 | 0 | 0,7 | 1,2 | 4,3 |
| 7 | 8 | 0 | 8 | 5,3 | 4,6 | 34,8 |
| 8 | 20 | 22 | 16 | 19,3 | 3,1 | 126,3 |
| 9 | 0 | 0 | 2 | 0,7 | 1,2 | 4,3 |
| 10 | 0 | 0 | 10 | 3,3 | 5,8 | 21,7 |
| 11 | 8 | 3 | 5 | 5,3 | 2,5 | 34,8 |
| 12 | 7 | 5 | 1 | 4,3 | 3,1 | 28,3 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Mittelwert des Befalls** | | | | | | **34%** |

**Tabelle 8:** Inokulation von $T_1$-Blattsegmenten der Linie B1 mit 2,3 Sporen/mm$^2$.

| **Pflanze** | **Pusteln/Blattsegment** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp** | 42 | 39 | 46 | | | |
| **Bongo Nara** | 49 | 55 | 47 | | | |
| | 45 | 40 | 49 | | | |
| | 30 | 35 | 37 | | | |
| | 25 | 23 | 27 | | | |
| | 26 | 32 | 30 | 37,6 | 9,6 | **100%** |
| **B1-$T_1$** | | | | | | |
| 1 | 3 | 0 | 2 | 1,7 | 1,5 | 4,4 |
| 2 | 4 | 5 | 7 | 5,3 | 1,5 | 14,2 |
| 3 | 15 | 19 | 26 | 20 | 5,6 | 53,2 |
| 4 | 2 | 4 | 0 | 2 | 2 | 5,3 |
| 5 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2,7 |
| 6 | 8 | 7 | 13 | 9,3 | 3,2 | 24,8 |
| 7 | 5 | 6 | 11 | 7,3 | 3,2 | 19,5 |
| 8 | 3 | 2 | 5 | 3,3 | 1,5 | 8,9 |
| 9 | 1 | 6 | 0 | 2,3 | 3,2 | 6,2 |
| 10 | 0 | 0 | 4 | 1,3 | 2,3 | 3,5 |
| **Mittelwert des Befalls** | | | | | | **14,3%** |

**Tabelle 9:** Inokulation von $T_1$-Blattsegmenten der Linie B1 mit 3,2 Sporen/mm$^2$.

| **Pflanze** | **Pusteln/Blattsegment** | | | **Mittelwert** | **STABW** | **Befall %** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Wildtyp** | 35 | 40 | 48 | | | |
| **Bongo Nara** | 46 | 41 | 38 | | | |
| | 35 | 38 | 31 | | | |
| | 23 | 38 | 45 | | | |
| | 32 | 23 | 24 | 35,8 | 8 | **100%** |
| **B1-$T_1$** | | | | | | |
| 1 | 4 | 4 | 3 | 3,7 | 0,6 | 10,2 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 25 | 21 | 24 | 23,3 | 2,1 | 65,2 |
| 4 | 3 | 0 | 4 | 2,3 | 2,1 | 6,5 |
| 5 | 13 | 2 | 2 | 5,7 | 6,4 | 15,8 |
| 6 | 3 | 1 | 0 | 1,3 | 1,5 | 3,7 |
| 7 | 9 | 13 | 7 | 9,7 | 3,1 | 27 |
| 8 | 2 | 7 | 9 | 6 | 3,6 | 16,8 |
| 9 | 12 | 4 | 9 | 8,3 | 4 | 23,3 |
| 10 | 11 | 5 | 4 | 6,7 | 3,8 | 18,6 |
| 11 | 10 | 11 | 7 | 9,3 | 2,1 | 26,1 |
| 12 | 10 | 14 | 19 | 14,3 | 4,5 | 40 |
| 13 | 15 | 7 | 22 | 14,7 | 7,5 | 41 |
| **Mittelwert des Befalls** | | | | | | **22,6%** |

**Danksagung**

Diese Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg in der Abteilung für Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen (AMPII) durchgeführt und durch das EU-Verbundprojekt „*EU Contract* IC18-CT-98-0316“ gefördert.

Mein Dank geht an Prof. Dr. Horst Lörz für die Bereitstellung des Projektthemas und des Arbeitsplatzes und für sein stetiges Interesse, seine Fürsorge und Unterstützung.
Prof. Dr. Wilhelm Schäfer danke ich für die Übernahme des Gutachtens dieser Arbeit.
Mein besonderer Dank gilt Dr. Klaus Oldach für seine umfangreiche Unterstützung meiner Arbeit, seine Hilfsbereitschaft und seinen Einsatz auch nach seinem Verlassen der Arbeitsgruppe.
Ferner geht ein großer Dank an Dr. Liliya Serazetdinova für die Einführung ins praktische Arbeiten zu Beginn meines Laboraufenthaltes und für die guten Ratschläge während der letzten drei Jahre.
Dr. Stefanie Lütticke möchte ich für ihre Unterstützung, die wissenschaftlichen Anregungen und Ideen danken.
Bei Dr. Stefan Scholten möchte ich mich herzlichst für die Sorgfalt und Geduld, die er für die Korrektur dieser Arbeit aufgebracht hat, bedanken.
Weiterhin danke ich allen aktuellen und ehemaligen AMPII Mitarbeitern für die ständige Motivation und das freundliche Arbeitsklima insbesondere Marlis Nissen, Dr. Jochen Kumlehn, Sandra Danner, Sandra Kerbach, Maren Schröder, Celia Friedrich, Christian Bergmann, Anne Folck, Dr. Manfred Gahrtz, Marion Klötzl, Uschi Reinitz und Renate Schmidt.
Dr. Jeffrey Wilson danke ich dafür, dass er mir die Pilzstämme zur Verfügung stellte. Ebenfalls danke ich Dr. Vera Meyer für die Bereitstellung des *Ag*-AFPs.
Anschließend möchte ich mich herzlich bei Dr. Frank Maier und Cathrin Kröger für ihre Unterstützung bei den phytopathologischen Untersuchungen.

**Lebenslauf**

| | |
|---|---|
| Name: | Maram Girgi |
| Geburtsdatum: | 04.11.1974 |
| Geburtsort: | Kirchen, Deutschland |
| Staatsangehörigkeit: | syrisch |

| | |
|---|---|
| 1980-1986 | Besuch der Grundschule in Damaskus, Syrien |
| 1986-1992 | Besuch der griechisch-orthodoxen Oberschule in Damaskus, Syrien |
| 06/1992 | Erhalt des Reifezeugnisses im naturwissenschaftlichen Zweig |
| 09/1992-06/1993 | Besuch des Goethe-Instituts in Damaskus, Syrien |
| 08/1993–07/1994 | Besuch des Studienkollegs in Hamburg und Abschluss mit der Feststellungsprüfung zur Hochschulreife |
| 10/1994-10/1999 | Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg |
| 08/1996 | Diplomvorprüfung |
| 02/1999 | Abschluss des Studiums mit der Diplomprüfung |
| 04-10/1999 | Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. W. Schäfer am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg |
| 12/1999 | Diplomurkunde |
| 03/2000 | Beginn der Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Lörz am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg |
| 07/2003 | Disputation und Abschluss der Promotion |

Hamburg, 25.07.2003

Maram Girgi