

# Akkumulation der osmoprotektiven Substanz Glucosylglycerol in transgenen Linien von *Solanum tuberosum*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen der Universität Rostock

vorgelegt von  
**Diplom-Biologin Nanette Sievers**  
geboren am 10. Januar 1979  
wohnhaft in Rostock

Rostock, 26. August 2011

**Betreuer**

Prof. Dr. Martin Hagemann

Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzenphysiologie

**Gutachter**

Prof. Dr. Martin Hagemann

Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzenphysiologie

Prof. Dr. Inge Broer

Universität Rostock, Institut für Landnutzung, Abteilung Agrobiotechnologie

**Einreichung:** 26.08.2011

**Verteidigung:** 16.12.2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Ionen-Stress . . . . .	1
1.1.1 Anpassungsstrategien . . . . .	2
1.1.1.1 Morphologische Anpassung . . . . .	2
1.1.1.2 Physiologische Anpassung . . . . .	3
1.1.1.2.1 Kompartimentierung der Ionen . . . . .	3
1.1.1.2.2 Ausschluss von Ionen . . . . .	3
1.1.2 Regulation der Ionen-Toleranz . . . . .	3
1.2 Osmotischer Stress . . . . .	4
1.2.1 Anpassungsstrategien . . . . .	5
1.2.1.1 Morphologische Anpassung . . . . .	5
1.2.1.2 Physiologische Anpassung durch die Synthese von <i>compatible solutes</i> . . . . .	5
1.2.1.2.1 Glucosylglycerol . . . . .	6
1.2.2 Regulation der osmotischen Toleranz . . . . .	7
1.2.2.1 ABA-abhängige Regulation . . . . .	8
1.2.2.2 ABA-unabhängige Regulation . . . . .	8
1.3 Transgene Ansätze zur Verbesserung der Trocken- und Salztoleranz von Pflanzen	9
1.3.1 Steigerung der Ionen-Toleranz . . . . .	9
1.3.2 Steigerung der osmotischen Toleranz . . . . .	10
1.4 Bisherige Untersuchungen zur Etablierung der GG-Synthese in höheren Pflanzen	12
1.5 Ziel und Fragestellungen der Arbeit . . . . .	14
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Materialien . . . . .	15
2.1.1 Chemikalien . . . . .	15
2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien . . . . .	15
2.1.3 Standards . . . . .	21
2.1.3.1 DNA-Standard . . . . .	21
2.1.3.2 Protein-Standard . . . . .	21
2.1.4 Oligonukleotide . . . . .	22
2.1.5 Plasmide . . . . .	22
2.1.5.1 pGEM-T . . . . .	22
2.1.5.2 35S-CaMV-Kassette . . . . .	23
2.1.5.3 pGreen0029 . . . . .	23
2.1.5.4 pGreenII0229 . . . . .	24
2.1.5.5 pCambia1305.1 . . . . .	24

2.1.5.6	pB33-Hyg2 . . . . .	25
2.1.5.7	pLH-AF . . . . .	26
2.1.5.8	pG0029-TP-SF, pG0029-SF . . . . .	26
2.1.6	Bakterienstämme . . . . .	28
2.1.6.1	<i>Escherichia coli</i> . . . . .	28
	TG1 . . . . .	28
2.1.6.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> . . . . .	28
	GV3101 . . . . .	28
	GV3101+pSoup . . . . .	28
2.1.7	Pflanzenmaterial . . . . .	28
2.2	Methoden . . . . .	28
2.2.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden . . . . .	28
2.2.1.1	Agarosegel-Elektrophorese . . . . .	28
2.2.1.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten . . . . .	28
2.2.1.3	PCR (polymerase chain reaction) . . . . .	28
2.2.1.4	Restriktionsverdau von DNA . . . . .	29
2.2.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA . . . . .	29
2.2.1.6	RNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .	30
2.2.1.7	Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	30
2.2.1.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	30
2.2.1.9	Western Blot und Nachweis der Proteine . . . . .	31
2.2.2	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> . . . . .	31
2.2.2.1	Kultivierung und Lagerung . . . . .	31
2.2.2.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA . . . . .	31
2.2.2.3	Extraktion von Plasmid-DNA . . . . .	32
2.2.3	Arbeiten mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . . . . .	32
2.2.3.1	Kultivierung und Lagerung . . . . .	32
2.2.3.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA . . . . .	32
2.2.3.3	Extraktion von Plasmid-DNA . . . . .	33
2.2.4	Arbeiten mit <i>Solanum tuberosum</i> . . . . .	33
2.2.4.1	Kultivierung . . . . .	33
	2.2.4.1.1 Sterilanzucht . . . . .	33
	2.2.4.1.2 Erdanzucht . . . . .	33
2.2.4.2	Extraktion genomischer DNA . . . . .	33
2.2.4.3	RNA-Extraktion . . . . .	34
	2.2.4.3.1 Blatt- und Stolonenmaterial . . . . .	34
	2.2.4.3.2 Knollenmaterial . . . . .	34
2.2.4.4	cDNA-Synthese . . . . .	34
2.2.4.5	Proteinextraktion . . . . .	35
2.2.4.6	Transformation von <i>Solanum tuberosum</i> mittels <i>A. tumefaciens</i> . . . . .	35
	2.2.4.6.1 Transformationsprotokoll I . . . . .	35
	2.2.4.6.2 Optimiertes Transformationsprotokoll II . . . . .	35
2.2.4.7	Entfernen von Mikroorganismen aus <i>in vitro</i> -Pflanzenmaterial . . . . .	36
2.2.4.8	X-Gluc-Färbung . . . . .	36
2.2.4.9	Extraktion niedermolekularer Substanzen . . . . .	36

2.2.4.10	Derivatisierung der Proben für die Gaschromatografie . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Herstellung von Plasmid-Konstrukten . . . . .	39
3.1.1	35S-Promotor-Konstrukte mit alternativem Markergen . . . . .	39
3.1.2	B33-Promotor-Konstrukte . . . . .	40
3.1.3	rd29A-Promotor-Konstrukte . . . . .	42
3.2	Optimierung des Transformationsprotokolls für die Kartoffelsorte Albatros . . .	44
3.3	Expression des <i>gppPS</i> -Gens unter der Kontrolle des <i>35S</i> -Promotors . . . . .	47
3.3.1	Selektion der transgenen Linien . . . . .	47
3.3.2	Stressversuche im Gewächshaus . . . . .	50
3.3.2.1	Ablauf der Stressversuche . . . . .	50
3.3.2.2	Ergebnisse der Stressversuche . . . . .	50
3.3.2.2.1	Sprosslängenwachstum . . . . .	50
	Kontrolle . . . . .	50
	Salzstress . . . . .	51
	Trockenstress . . . . .	51
3.3.2.2.2	Ertrag und Lagerfähigkeit der Knollen . . . . .	52
	Kontrolle . . . . .	52
	Salzstress . . . . .	53
	Trockenstress . . . . .	54
3.3.2.2.3	Gaschromatografische Analyse . . . . .	54
	Kontrolle . . . . .	55
	Salzstress . . . . .	55
	Trockenstressversuch . . . . .	56
3.3.3	Untersuchungen zur GG-Akkumulation in den transgenen Pflanzen . . .	56
3.3.3.1	GG-Akkumulation in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Blattes . . . . .	57
3.3.3.2	GG-Akkumulation in Abhängigkeit von der Zeit der Kultivierung	57
3.3.3.3	GG-Akkumulation in den Stolonen . . . . .	57
3.3.3.4	GG-Akkumulation in der M2-Generation der transgenen Linien	57
3.4	Expression des <i>gppPS</i> -Gens unter der Kontrolle des rd29A-Promotors . . . . .	59
3.4.1	Selektion der transgenen Linien . . . . .	59
3.4.2	Stressversuch im Gewächshaus . . . . .	59
3.4.2.1	Ablauf des Stressversuches . . . . .	61
3.4.2.2	Ergebnisse des Stressversuches . . . . .	61
3.4.2.2.1	Sprosslängenwachstum . . . . .	61
3.4.2.2.2	Ertrag und Lagerfähigkeit der Knollen . . . . .	61
3.4.2.2.3	Gaschromatografische Analyse . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1	Optimierung des Transformationsprotokolls . . . . .	69
4.2	Etablierung der GG-Synthese in <i>S. tuberosum</i> . . . . .	70
4.3	GG-Akkumulation in den transgenen Linien . . . . .	71
4.4	Einfluss der GG-Synthese auf den Gehalt anderer Metabolite . . . . .	74
4.5	Auswirkungen der GG-Akkumulation auf Wachstum und Ertrag . . . . .	75
4.6	Stressinduzierte <i>gppPS</i> -Expression . . . . .	76

4.7 Ausblick . . . . .	78
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>Anhang</b>	<b>101</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<i>A. tumefaciens</i>	.....	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>E. coli</i>	.....	<i>Escherichia coli</i>
Abb.	.....	Abbildung
Aqua dest.	.....	destilliertes Wasser
bp	.....	Basenpaare
bzw.	.....	beziehungsweise
CaMV	.....	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	.....	copy DNA
CTAB	.....	N-Cetyl-N,N,N,-Trimethylammoniumbromid
DEPC	.....	Diethyldicarbonat
DMSO	.....	Dimethylsulfoxid
DNA	.....	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	.....	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dS	.....	Dezisiemens
EDTA	.....	Ethylendiamintetraacetat
FM	.....	Frischmasse
GUS	.....	<i>β-Glucuronidase</i>
LB	.....	Luria Broth
m	.....	Meter
M-MuLV	.....	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mcs	.....	<i>multi cloning site</i>
min	.....	Minute
mM	.....	Millimolar
mm	.....	Millimeter

MS .....	Murashige and Skoog
Oligo-dT .....	Oligodesoxythymidin
PCR .....	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG .....	Polyethylenglycol
PMSF .....	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF .....	Polyvinylidenfluorid
RNA .....	Ribonucleinsäure
RT-PCR .....	<i>reverse transcriptase</i> PCR
T-DNA .....	Transfer-DNA
TAE .....	Tris-Acetat-EDTA
TBE .....	Tris-Borat-EDTA
TBS .....	Tris-buffered Saline
TE .....	Tris/EDTA
Ti-Plasmid .....	<i>tumor inducing plasmid</i>
TM .....	Trockenmasse
Tris .....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA .....	transfer-RNA
TSS .....	Transformation & Storage Solution
u.a. ....	unter anderem
UV .....	ultraviolett
VT .....	Volumenteil
WT .....	Wildtyp
z.B. ....	zum Beispiel

# 1 Einleitung

Pflanzen sind an ihren Standort gebunden und somit ständig wechselnden biotischen und abiotischen Faktoren ausgesetzt, denen sie sich anpassen müssen. Kommt es zu plötzlichen oder starken Abweichungen, können diese zu einer Stresssituation für die Pflanze führen. Als Stressfaktor wird jeder äußere Einfluss bezeichnet, der sich schädigend auf die Pflanze auswirkt (Taiz u. Zeiger, 2000). Dazu zählen unter anderem die abiotischen Faktoren wie Hitze, Kälte, Niederschlag, Trockenheit sowie pH-Wert, Nährstoff- und Salzgehalt des Bodens. Trockenstress und Salzstress spielen besonders im Bezug auf die Landwirtschaft eine immer größer werdende Rolle. Weltweit sind etwa 7 % der Landfläche versalzen (Flowers u. Yeo, 1995). Die Ursachen dafür liegen einerseits in natürlichen Erscheinungen wie den klimatischen Bedingungen und Boden-Verhältnissen bestimmter Regionen oder dem salzigen Regenwasser in Küstennähe. Andererseits führt die Zunahme der künstlichen Bewässerung landwirtschaftlicher Nutzflächen in ariden Gebieten zur Bodenversalzung, da das Wasser verdunstet und Salz im ausgetrockneten Boden an der Oberfläche akkumuliert. Laut FAO werden etwa 20 % der weltweit kultivierbaren Fläche bewässert (<http://faostat.fao.org>). In Folge dessen sind große Ertragseinbußen bei den auf diesen Flächen angebauten Kulturpflanzen zu verzeichnen.

Salz- und Trockenstress erzeugen bei sensitiven Pflanzen vielfältige Symptome wie Wachstumsreduktion, Nekrosen, beschleunigte Entwicklung bis hin zum Absterben der Pflanze. Die Ursache liegt zum einen in einer reduzierten Wasserverfügbarkeit (osmotischer Effekt) für die Pflanze und zum anderen in der direkten Toxizität intrazellulär akkumulierter anorganischer Ionen (Ioneneffekt).

Alle Pflanzen haben Strategien entwickelt, die es ihnen sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf Ebene der gesamten Pflanze ermöglichen, in einem artspezifischen Maße mit Trockenheit oder erhöhten Salzkonzentrationen in ihrer Umgebung umzugehen.

## 1.1 Ionen-Stress

Vorrangig erhöhte Salzkonzentrationen im Boden aber auch Trockenstressbedingungen führen in der Pflanze zum Ionen-Stress, der auf die Aufnahme von Ionen gemeinsam mit Wasser aus dem Boden in die Pflanze zurückzuführen ist. Die Salinität eines Bodens oder einer Lösung bezieht sich auf die elektrische Leitfähigkeit bei 25°C bei einem Elektrodenabstand von 10 mm (Steppuhn et al., 2005). Hinsichtlich der Böden wird diese elektrische Leitfähigkeit in dS/m (dezi Siemens/ Meter) angegeben. Ein Boden gilt ab 4 dS/m als salin, was einer NaCl-Konzentration von etwa 40 mM entspricht (Richards, 1954) (Meerwasser: 55 dS/m bzw. etwa 500-600 mM NaCl) und führt bei den meisten Kulturpflanzen zu Ertragsverminderungen (Withers et al., 1978). Neben den im Boden vorkommenden Calcium-, Magnesium-, Kalium-, Nitrat-, Ammonium- und Carbonat-Ionen, wirken sich vor allem die Natrium-Ionen schädigend auf die Pflanze aus. Hinsichtlich ihrer Salztoleranz werden Pflanzen in Halophyten und Glycophyten unterteilt, wobei Halophyten Salinitäten von 300 mM NaCl und mehr überleben und diese Umgebung teilweise sogar benötigen, um zu gedeihen. Dagegen weisen Glycophyten bereits bei 100 - 200 mM NaCl

Stresssymptome auf und können absterben (Zhu, 2007). Die Toleranz von Pflanzen gegenüber Salzstress kann über einen *Salinity Tolerance Index* (ST-Index) ausgedrückt werden. Dieser berechnet sich aus der Summe der elektrischen Leitfähigkeit, bei der der Ertrag einer nicht-salinen Kulturpflanze um 50 % gemindert ist ( $C_{50}$ ) und dem Anstieg des Ertragsabfalls unter diesen salinen Bedingungen ( $s$ ). Demnach gilt für die moderat salzsensitive Kartoffel ein ST-Index von 6,56. Im Vergleich dazu beträgt der Wert für die Tomate 8,29 und für die weniger salzsensitive Sonnenblume 15,46 (Steppuhn et al., 2005).

Auf der Ebene der gesamten Pflanze bedeutet Salztoleranz das Verhindern der Akkumulation großer Mengen an  $Na^+$ -Ionen in den Blättern bzw. die Kompartimentierung in spezialisierten, stoffwechselärmeren Teilen des Blattes, da sich dort nur eine geringe toxische Wirkung der Ionen entfaltet. Die Grundlage der Adaptionsmechanismen auf zellulärem Niveau liegt darin, den Gehalt an  $Na^+$ -Ionen im Cytoplasma gering zu halten (Zhu, 2002). Genaue Werte über den  $Na^+$ -Gehalt im Cytoplasma bzw. in den Organellen sind schwierig zu bestimmen. Es wird jedoch angenommen, dass die  $Na^+$ -Konzentration im Cytoplasma unter natürlichen Bedingungen zwischen 10 und maximal 30 mM liegt (Carden et al., 2003). Bei *in vitro*-Versuchen zur Messung der toxischen Ionenwirkung auf Biomoleküle wurde für die meisten Enzyme eine Hemmung ab einer Konzentration von etwa 100 mM gefunden, wobei die Grenze zur Toxizität vom Enzym abhängt (Greenway u. Osmond, 1972; Borges et al., 2002).

Die Toxizität der  $Na^+$ -Ionen liegt vermutlich insbesondere in der Zerstörung des Ionengleichgewichtes in der Zelle. Der Überschuss an  $Na^+$ -Ionen behindert die Pflanze bei der Aufnahme der lebenswichtigen Kalium- und Calcium-Ionen. Zusätzlich werden durch die  $Na^+$ -Ionen viele cytoplasmatische Enzyme inhibiert, die durch Kalium-Ionen aktiviert werden. Die  $Na^+$ -Ionen konkurrieren mit den  $K^+$ -Ionen um deren Bindestellen an Transportern oder für die Struktur wichtigen Bestandteilen, können die Funktion der Kalium-Ionen jedoch nicht ersetzen (Bhandal u. Malik, 1988). Insbesondere wird die Proteinbiosynthese gestört, da Kalium-Ionen für die Bindung der tRNA an die Ribosomen benötigt werden (Blaha et al., 2000). Die Salz-Sensitivität einer Pflanze ist letztlich entweder auf die hohe  $Na^+$ -Ionen-Konzentration in den Blättern oder die geringe Toleranz auf angereicherte  $Na^+$ -Ionen zurückzuführen. Die Reaktion von Pflanzen auf den Ionen-Stress erfolgt im Vergleich zur Reaktion auf osmotischen Stress langsamer und zeigt sich in der zunehmenden Seneszenz der alten Blätter (Munns u. Tester, 2008).

### 1.1.1 Anpassungsstrategien

#### 1.1.1.1 Morphologische Anpassung

Viele Halophyten können  $Na^+$ -Ionen über Salzdrüsen oder Salzhaare auf der Blattoberfläche aus der Pflanze sekretieren (z.B. Mohrenhirse (McWorther et al., 1995) und Wild-Reis (Flowers et al., 1990)). Über diese erfolgt eine spezifische Ausscheidung von  $Na^+$ - aber auch  $Cl^-$ -Ionen, indem die Ionen aktiv entweder in die Haare bzw. in die Drüsen transportiert werden. Während die Salzhaare anschließend abknicken oder aufplatzen, erfolgt die Ausscheidung von Salz an die Blattoberfläche über die Drüsen passiv.

Andere Pflanzen sind in der Lage, stetig Salz aufzunehmen und zu tolerieren. Sie schließen ihren Lebenszyklus jedoch in relativ kurzer Zeit ab, noch bevor die  $Na^+$ -Konzentration innerhalb der Pflanze die Grenze zur Toxizität überschreitet (z.B. Queller).

Das Abwerfen von Pflanzenteilen ist ein weiterer Mechanismus der Salzanpassung. Die toxischen Ionen werden zum Beispiel in den alten Blättern akkumuliert, die bei Überschreitung eines Grenzwertes absterben und abgeworfen werden (z.B. Strandaster).



### 1.1.1.2 Physiologische Anpassung

**1.1.1.2.1 Kompartimentierung der Ionen** Ein wichtiger Mechanismus zur Ionenstressanpassung aller Pflanzen auf zellulärer Ebene ist die Kompartimentierung der Ionen in den Vakuolen bzw. im Apoplasten, um diese aus dem stoffwechselaktiven Cytoplasma zu entfernen. Dies erfolgt durch einen aktiven Transport über den Tonoplasten in die Vakuole bzw. das Plasmalemma in den Apoplasten. Für die Ionenaufnahme in die Vakuole scheinen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, z.B. SOS1 in Arabidopsis, verantwortlich zu sein, die den durch eine ATPase errichteten  $\text{H}^+$ -Gradienten nutzen (Zhu, 2002). Damit entsteht zwischen diesen beiden Zellkompartimenten jedoch ein osmotisches Gefälle, welches ausgeglichen werden muss. Um das zu gewährleisten, dient hier die Synthese und Akkumulation von *compatible solutes* im Cytoplasma der Reduktion des osmotischen Potenzials (siehe Abschnitt 1.2) und spielt somit auch indirekt eine Rolle bei der Anpassung an ionischen Stress. Einigen Pflanzen ist es auch möglich, die in der Vakuole entstehenden hohen Salzkonzentrationen über die Aufnahme größerer Wassermengen zu verdünnen (Salz-Sukkulenten).

**1.1.1.2.2 Ausschluss von Ionen** Eine weitere Möglichkeit der physiologischen Anpassung ist die Vermeidung der Salzaufnahme durch *salt exclusion*, d.h. den Transport der  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Blätter niedrig zu halten. So erfolgt in der Pflanze eine Kontrolle über die Ionen-Aufnahme in die Wurzel und des Ionen-Transportes über das Xylem in den Spross. Dadurch sind einige Pflanzen in der Lage, die passiv (Cheeseman, 1982) über die Wurzel aufgenommenen  $\text{Na}^+$ -Ionen, aktiv (Blumwald et al., 2000) wieder aus der Wurzel zu transportieren und somit die Konzentration der Ionen in der Wurzel zu minimieren. Außerdem sind diese Pflanze bestrebt, die  $\text{Na}^+$ -Ionen-Konzentration im Xylem durch die Kontrolle der Aufnahme und der Rückführung möglichst gering zu halten. In Lupine und Mais konnte außerdem ein Rücktransport der  $\text{Na}^+$ -Ionen aus dem Spross in die Wurzel über das Phloem nachgewiesen werden (Munns et al., 1988; Lohaus et al., 2000).

## 1.1.2 Regulation der Ionen-Toleranz

Es ist bisher kein Sensor bekannt, der für die Perzeption von Salzstress verantwortlich ist. Ebenso ist noch nicht geklärt, ob die zelluläre Wahrnehmung von  $\text{Na}^+$ -Ionen bei ionischem Stress extra- oder intrazellulär erfolgt. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass Salzstress zu einer steigenden Calcium-Ionen-Konzentration im Cytosol (Knight et al., 1997) führt, könnten Kanäle direkt oder indirekt als Salzstresssensor fungieren. Die Akkumulation dieser Ionen leitet den sogenannten SOS-Weg (*Salt Overly Sensitive Pathway*) ein (Zhu, 2002), indem  $\text{Ca}^{2+}$  an das SOS3-Protein bindet. Dieses bildet gemeinsam mit SOS2 einen Proteinkinase-Komplex, der wiederum die Genexpression von SOS1, einem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter in der Plasmamembran, reguliert (Qiu et al., 2002). Außerdem kontrolliert der SOS2-SOS3-Komplex dessen Aktivität. Möglicherweise werden ebenfalls ein  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter des Tonoplasten sowie  $\text{K}^+$ -Transporter in ihrer Aktivität beeinflusst, um die  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle zu exportieren oder in der Vakuole zu kompartimentieren bzw. das  $\text{K}^+:\text{Na}^+$ -Verhältnis im Cytoplasma zu erhöhen. Außerdem wird auf diese Weise die Expression verschiedener Gene, zum Beispiel für Transkriptionsfaktoren reguliert, die ihrerseits wiederum die verstärkte Expression stressinduzierbarer Gene induzieren (Abb. 1.1).

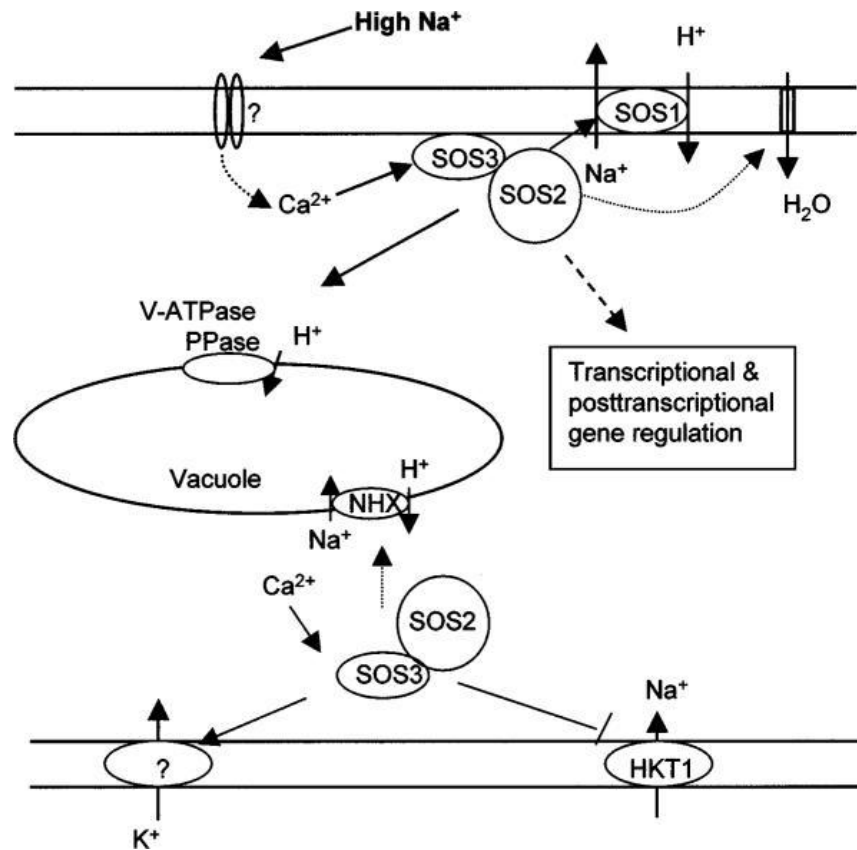


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des *SOS-Pathway* in Pflanzen zur Regulation des zellulären Ionengleichgewichtes unter Salzstress (Xiong u. Zhu, 2002).

## 1.2 Osmotischer Stress

Vor allem Trockenheit aber auch Salzstress führen bei Pflanzen zu osmotischem Stress, d.h. es besteht Wassermangel. Bezüglich ihrer Trockentoleranz werden Xerophyten, die an trockene Standorte mit extrem geringer Wasserverfügbarkeit angepasst sind und Mesophyten, die sensitiv auf Trockenheit reagieren, unterschieden. Die Wasseraufnahme der Pflanzen durch die Wurzel erfolgt entlang eines Wasserpotentialgradienten, wobei das Wasserpotential in der Pflanze niedriger ist als im Boden. Trocknet der Boden aus, ist Transpiration der Pflanze oder die Salzkonzentration im Boden zu hoch, sinkt dort das Wasserpotential entsprechend und somit auch der Gradient. Die daraus resultierende reduzierte Fähigkeit zur Wasseraufnahme durch die Pflanze führt wiederum zu einem verringerten Turgor, der für das Wachstum und die Funktion der Pflanzenzelle essentiell ist. Das führt im Vergleich zur relativ langsamen Reaktion auf ionischen Stress zu einer schnellen Reaktion der Trockenstress-sensitiven Pflanze, die sich in der Reduktion des Sprosswachstums und der jungen Blätter zeigt (Munns u. Tester, 2008). Prinzipiell stellt die Aufnahme von anorganischen Ionen, z.B. in den tolerantsten Halophyten, eine energetisch effiziente Anpassung an dieses Problem dar, da mit Hilfe der einströmenden Ionen der osmotische Potentialgradient aufrecht erhalten wird.

## 1.2.1 Anpassungsstrategien

### 1.2.1.1 Morphologische Anpassung

Besonders Pflanzen, die an trockene Standorte angepasst sind, zeichnen sich durch verschiedene morphologische Eigenschaften aus, die es ihnen ermöglichen, mit geringen Wassermengen bzw. langen Trockenperioden umzugehen. So sind sie z.B. in der Lage, Wasser in den Vakuolen verschiedener Organe zu speichern (Sukkulenten). Häufig führt Trockenstress auch zur Ausbildung eines stark ausgeprägten Wurzelsystems, um an Grundwasser zu gelangen. Oder diese Pflanzen weisen unterirdische Organe, wie eine gestauchte Sprossachse (Zwiebel) auf, um Wasser zu speichern. Pflanzen mit einer sehr kurzen Vegetationsperiode nutzen eine kurzzeitige Wasserverfügbarkeit, um Samen zu bilden und dann abzusterben (Ephemere). Neben diesen Merkmalen spielt außerdem die Regulation der Transpiration über die Stomata eine große Rolle, um den Wasserverlust möglichst gering zu halten. Pflanzen an sehr trockenen Standorten öffnen die Stomata nur zu Tages- oder Nachtzeiten, an denen geringe Temperaturen vorherrschen oder besitzen Stomata, die tiefer in der Blattoberfläche liegen. Durch die Ausbildung von Blatthaaren entsteht auf der Blattoberfläche ein feuchter, vor Wind geschützter Bereich, um den Transpirationssog zu verringern. Andere Pflanzen, auch Mesophyten (Nadelbäume), weisen nur wenige Stomata auf oder bilden eine starke Kutikula aus. Auch die Verringerung der transpirierenden Blattoberfläche durch das Abwerfen der Blätter oder die Ausbildung von Dornen oder Nadeln führt zu einer verminderten Transpiration.

### 1.2.1.2 Physiologische Anpassung durch die Synthese von *compatible solutes*

Als wichtigste physiologische Anpassung an osmotischen Stress ist die Synthese von osmoprotektiven Substanzen, sogenannten *compatible solutes* anzusehen. Deren Akkumulation dient den Pflanzen zur Reduktion des osmotischen Potentials in den physiologisch aktivsten Teilen der Zelle. Entsprechend ihrer Bezeichnung ist die Akkumulation dieser hydrophilen niedermolekularen Substanzen im Cytoplasma auch in hohen Konzentrationen mit dem zellulären Metabolismus kompatibel (Brown u. Simpson, 1972). Vertreter solcher *compatible solutes* sind Aminosäuren und deren Derivate, Polyole, Kohlenhydrate sowie Heteroside (Abb. 1.2). Sie sind bezüglich ihrer osmoprotektiven Funktion sowohl aus Mikroorganismen als auch aus Pflanzen und Tieren bekannt (Roberts, 2005; Kietwietdejonge et al., 2006; Hagemann et al., 2008; Burg et al., 2007; Ashraf u. Foolad, 2007). Sie dienen einerseits dem Schutz von Proteinen und Membranen unter Stressbedingungen, ohne ihre Struktur oder Funktion zu beeinflussen (Luzardo et al., 2000; Borges et al., 2002; Hinchu u. Hagemann, 2004). Die dabei zu Grunde liegenden biochemischen bzw. biophysikalischen Mechanismen sind bisher noch nicht aufgeklärt. *Compatible solutes* scheinen auch den negativen Effekt der  $\text{Na}^+$ -Ionen auf die Enzymaktivität zu reduzieren. Andererseits sind sie an der Aufrechterhaltung des osmotischen Potentials der Zelle bei Salzstress beteiligt, da sie in osmotisch wirksamen, bis zu molaren Konzentrationen akkumuliert werden können. Außerdem wurde am Beispiel von Mannitol gezeigt, dass auch eine Beteiligung am Schutz vor freien Radikalen durch *compatible solutes* gewährleistet werden kann (Shen et al., 1997). In Kulturpflanzen kommen häufig Saccharose und Prolin als natürliche *compatible solutes* vor, während relativ salzresistente Arten wie Spinat und Gerste Glycinbetain synthetisieren können.

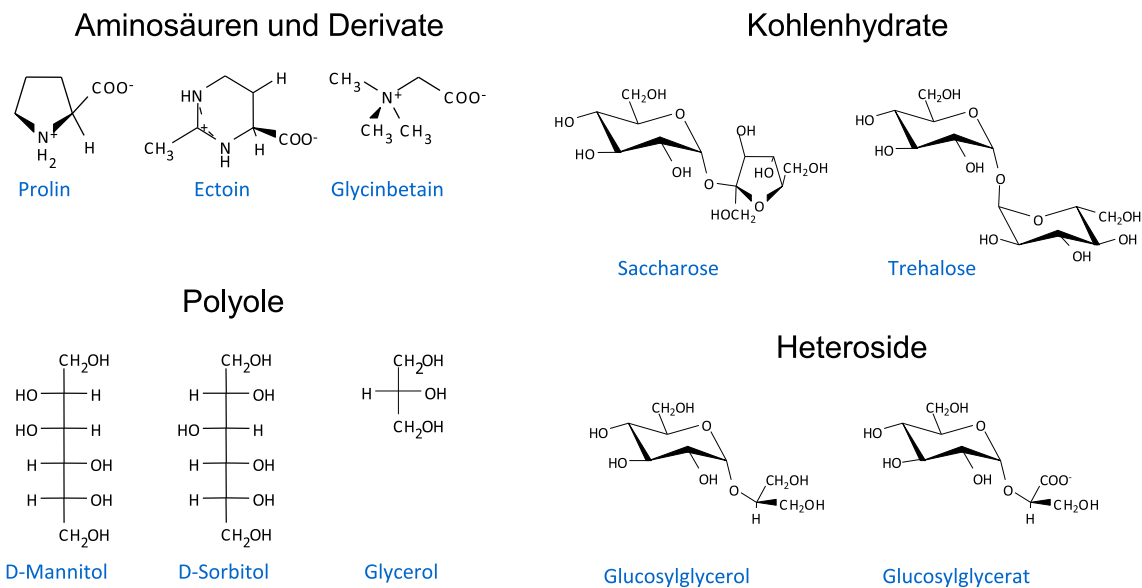


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einiger *compatible solutes* aus verschiedenen Strukturklassen wie sie in Bakterien und Pflanzen vorkommen.

**1.2.1.2.1 Glucosylglycerol** Ein Vertreter aus der Gruppe der Heteroside ist das Glucosylglycerol (GG), welches für moderat salztolerante Cyanobakterien charakteristisch ist (Reed u. Stewart, 1988). Das Vorkommen, die Synthese und Funktion von GG als *compatible solute* wurden bereits detailliert untersucht. GG besteht aus dem Monosaccharid Glucose, an das Glycerol, ein Polyol, gebunden vorliegt. Neben der Wirkung auf das osmotische Potential ist GG direkt am Schutz von Enzymen (Borges et al., 2002) und Membranen (Hincha u. Hagemann, 2004) vor Denaturierung unter Stressbedingungen beteiligt.

GG wurde sehr früh als *compatible solute* innerhalb der Cyanobakterien identifiziert (Kollman et al., 1979; Borowitzka et al., 1980). Die Biochemie der Glucosylglycerol-Synthese wurde für das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 beschrieben (Hagemann u. Erdmann, 1994), welches nach einem Salzschock GG in Mengen von bis zu 20 % der Trockenmasse akkumulieren kann (Hagemann et al., 1989). Die GG-Synthese findet im Cytoplasma dieser Blaualge durch eine Zwei-Schritt-Reaktion statt (Abb. 1.3a). Das Enzym Glucosylglycerolphosphat-Synthase (GgpS, (Marin et al., 1998)) katalysiert die Reaktion von Glycerol-3-Phosphat und ADP-Glucose zu Glucosylglycerolphosphat, welches anschließend durch die Glucosylglycerolphosphat-Phosphatase (StpA oder GgpP, (Hagemann et al., 1997)) dephosphoryliert wird, sodass GG entsteht.

Dagegen verläuft die GG-Synthese in heterotrophen Bakterien wie *Azotobacter vinelandii* und *Stenotrophomonas rhizophila* über ein Fusionsprotein (GppPS), welches eine Glucosylglycerolphosphat-Synthase- und -Phosphatase-Domäne in sich vereint. Dieses Enzym ist im Gegensatz zur GgpS aus *Synechocystis* in der Lage, neben ADP-Glucose ebenso UDP-Glucose als Ausgangsstoff zu nutzen ((Hagemann et al., 2008), Abb. 1.3b).

Bisher ist die Synthese von GG fast ausschließlich aus Bakterien bekannt. Zwei Ausnahmen bilden die Pflanzen *Myrothamnus flabellifolia* (Bianchi et al., 1993), eine xerophytische und sogenannte Auferstehungspflanze, und *Lilium japonicum* aus der Gattung der Lilien (Kaneda et al., 1984). Auch einige Pilze, die bei der Fermentation zu Sake und Miso in der japanischen Küche benutzt werden, können GG synthetisieren (Takenaka et al., 2000).

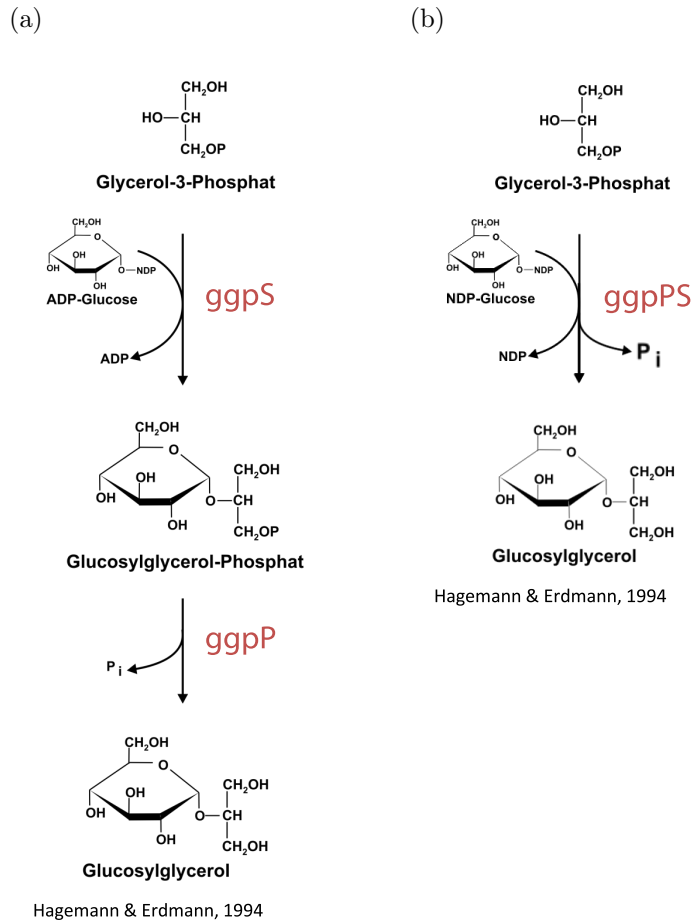


Abbildung 1.3: Vergleichende schematische Darstellung der GG-Synthese (a) im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 und (b) in heterotrophen Bakterien wie *A. vinelandii*; GgpS: Glucosylglycerolphosphat-Synthase; GgpP: Glucosylglycerolphosphat-Phosphatase; GgpPS: Glucosylglycerolphosphat-Phosphatase/Synthase

### 1.2.2 Regulation der osmotischen Toleranz

Über die Perzeption von osmotischem Stress ist bisher wenig bekannt. In *Arabidopsis* konnte jedoch eine Histidin-Kinase (ATHK1) identifiziert werden, die eventuell als Osmosensor fungieren könnte. Das Protein ATHK1 ist in der Lage, SLN1, einen gut charakterisierten Osmosensor in Hefe, in einer Hefe-SLN1-Deletionsmutante zu ersetzen (Urao et al., 1999). Daneben zeigt die Histidin-Kinase (Cre1), ein Cytokinin-Rezeptor in Pflanzen, Sequenzähnlichkeiten mit SLN1. Auch in diesem Fall wiesen Komplementationsversuche mit SLN1-Hefemutanten auf eine zweite Funktion von Cre1 als potentiellen Osmosensor in Pflanzen hin (Reiser et al., 2003). Infolge von Salz- und Trockenstress wird in den Pflanzen die Expression verschiedener Gene induziert. Die Proteine können entweder regulatorisch (z.B. Transkriptionsfaktoren oder Proteinkinasen) oder funktionell (z.B. Enzyme für die *compatible solute*-Biosynthese oder Transport-Proteine) an der Stressantwort beteiligt sein. Viele dieser durch osmotischen Stress induzierten Gene werden auch durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) beeinflusst, wonach ABA-abhängige und ABA-unabhängige Gene unterschieden werden.

### 1.2.2.1 ABA-abhängige Regulation

Als zelluläre Reaktion der Pflanze auf osmotischen Stress, infolge von Trocken- und Salzstress, wird das Phytohormon ABA gebildet. An der ABA-Synthese, die sich über zwei Zellkompartimente, Plastiden und das Cytoplasma erstreckt, sind mehrere Proteine beteiligt, deren Expression unter Trocken- und Salzstressbedingungen hochreguliert wird. Die Aktivierung der Synthesegene wird möglicherweise durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phosphorylierung reguliert (Xiong et al., 2002). Es ist zudem bekannt, dass eine Überexpression von *athk1* zur Induktion der ABA-Synthese und damit zu einem erhöhten ABA-Gehalt unter osmotischem Stress (Wohlbach et al., 2008) führt. Über den ABA-Signalweg wird die Expression verschiedener stressinduzierbarer Gene induziert (Abb. 1.4). In Arabidopsis konnte eine Protein-Familie (PYR/PYL/RCAR) identifiziert werden, die als ABA-Rezeptor fungiert (Park et al., 2009). In Abwesenheit von ABA liegt der Rezeptor als Homodimer vor. In Anwesenheit von ABA bindet dies an eine Untereinheit des Rezeptors. Durch die folgende Bindung einer Serin/Threonin-Protein-Phosphatase (PP2C) wird die Autophosphorylierung einer weiteren pflanzenspezifischen Kinase (SnRK2- AMP-aktivierte Serin/Threonin-Protein-Kinase) induziert, die wiederum einen Transkriptionsfaktor wie ABF2 phosphoryliert. Durch diese Aktivierung kann dieser Transkriptionsfaktor an das *cis acting element* ABRE (ABA responsive element) im Promotor von ABA-induzierten Genen binden (z.B. *rd29*) und somit deren Genexpression induzieren (Klingler et al., 2010). ABA kann ebenso die Proteinsynthese von Transkriptionsfaktoren induzieren, die wiederum an *cis acting elements* wie MYC, MYB von stressinduzierbaren Genen binden und somit deren Expression induzieren (z.B. *rd22*, (Shinozaki u. Yamaguchi-Shinozaki, 1996)).

### 1.2.2.2 ABA-unabhängige Regulation

Neben den ABA-abhängigen gibt es auch Salz- und Trockenstress-regulierte Gene, deren Expression zwar durch osmotischen Stress, aber nicht durch exogenes ABA induziert werden kann. Das zeigt, dass auch eine ABA-unabhängige Regulation der Genexpression als Reaktion auf osmotischen Stress existiert (Abb. 1.4). Diese beruht auf der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die an ein *dehydration-responsive element* (DRE) bzw. *C-repeat* (CRT) im Promotor der stressinduzierbaren Gene binden (Shinozaki u. Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Boudsocq u. Luarière, 2005). Diese *cis acting elements* fungieren als DNA-Bindestelle für Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel DREB2 (DRE-Binde-Faktor) (Nakashima et al., 2000) bzw. CBF (CRT-Binde-Faktor) (Boudsocq u. Luarière, 2005).

Neben den stressinduzierbaren Genen, deren Expression entweder vollkommen ABA-abhängig oder ABA-unabhängig reguliert wird, gibt es außerdem Gene, die über beide Regulationsmechanismen verfügen, wie z.B. *rd29A*.

Die Gene *rd29A* und *rd29B*, die für Proteine unbekannter Funktion kodieren, sind im Arabidopsis-Genom im Tandem innerhalb einer 8kb-Region lokalisiert (Yamaguchi-Shinozaki u. Shinozaki, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Gene durch abiotische Stressfaktoren wie Kälte, Trockenheit und Salz induziert wird. Untersuchungen zu den Promotoren dieser beiden *rd29*-Gene zeigen, dass sich in den Promotorregionen von *rd29A* und *rd29B* ein ABA responsive element (ABRE) befindet, an welches ein durch ABA aktivierter Transkriptionsfaktor bindet, wodurch eine ABA-abhängige Expression der Gene induziert wird. Außerdem enthält der *rd29A*-Promotor mit dem *dehydration-responsive element* (DRE) ein weiteres *cis-acting element*, das in die schnelle, ABA-unabhängige Induktion der *rd29A*-Expression als Reaktion auf Trocken-, Kälte- und Salzstress involviert ist (Yamaguchi-Shinozaki u. Shinozaki, 1994).

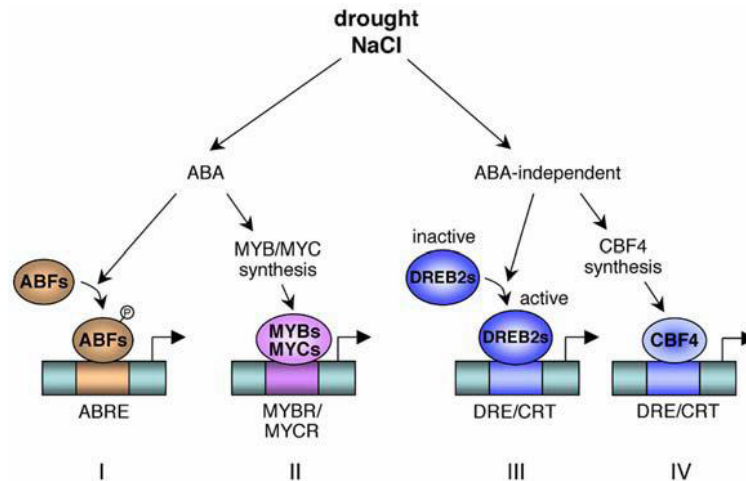


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der ABA-abhängigen und ABA-unabhängigen Genregulation in Pflanzen als Reaktion auf Salz- und Trockenstress (Boudsocq u. Luarière, 2005).

## 1.3 Transgene Ansätze zur Verbesserung der Trocken- und Salztoleranz von Pflanzen

Auf Grund der problematischen Situation steigender Salzgehalte und verminderter Wasserverfügbarkeit auf landwirtschaftlichen Nutzflächen, spielt die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegenüber diesen abiotischen Stressfaktoren eine große Rolle. Bezüglich dieser Zielstellung versucht die klassische Pflanzenzüchtung, die heute wenig salztoleranten Kulturpflanzen mit den Wildformen zu kreuzen, um Sorten mit einer erhöhten Toleranz zu erhalten. Allerdings ist diese Methode sehr zeitaufwendig, da die Anpassungsmechanismen wie oben beschrieben sehr komplex sind. Deshalb gibt es viele Arbeiten, die sich mit der Steigerung der Salz- oder Trocken-toleranz von Modell- oder verschiedenen Kulturpflanzen durch transgene Ansätze beschäftigen. Dabei werden transgene Pflanzen erzeugt, in denen gezielt Gene überexprimiert werden, deren Proteine an verschiedenen Toleranzmechanismen beteiligt sind.

### 1.3.1 Steigerung der Ionen-Toleranz

Um die  $\text{Na}^+$ -Toleranz unter Salzstressbedingungen zu erhöhen, gibt es drei Schlüsselstellen, an denen Untersuchungen ansetzen können. Das ist zum einen die Kontrolle der  $\text{Na}^+$ - bzw.  $\text{K}^+$ -Aufnahme in die Zelle, zum anderen die der Ionen-Kompartimentierung in der Vakuole und letztlich die des  $\text{Na}^+$ -Exportes aus der Zelle. Verschiedene Arbeiten haben diese Ansätze aufgegriffen und Versuche mit Hilfe transgener Pflanzen durchgeführt, in denen Gene, die an der Regulation des Ionengleichgewichtes beteiligt sind, exprimiert wurden. So resultierte die Überexpression des *nhx1*-Gens, welches für einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter im Tonoplasten von Arabidopsis kodiert, in einer erhöhten Salztoleranz bis zu 200 mM NaCl in Arabidopsis und Tomate, ohne nachteilige phänotypische Effekte aufzuweisen (Apse et al., 1999; Zhang u. e. Blumwald, 2001). Yang et al. (2009) konnten dies für Arabidopsis jedoch nicht bestätigen. Im Gegensatz zur angestrebten verbesserten Kompartimentierung der  $\text{Na}^+$ -Ionen führte die Überexpression des *sos1*-Gens in Arabidopsis nach Salzstress zu einer reduzierten  $\text{Na}^+$ -Akkumulation im Xylem und damit auch im Spross, was ebenfalls zu einer erhöhten Salztoleranz von Arabidopsis

fürte (Shi et al., 2002). Eine ähnliche Wirkung erzielte die Überexpression des *hkt1;1*-Gens, was für einen  $\text{Na}^+$ -Transporter in der Plasmamembran der Parenchymzellen im Xylem in *Arabidopsis* kodiert. Durch den Transport der Ionen in die Zellen des Leitbündelgewebes wurde deren Transport über das Xylem aus der Wurzel in den Spross reduziert und somit eine erhöhte Salztoleranz erreicht (Møller et al., 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die zeitgleiche Überexpression mehrerer Gene des *SOS-Pathways* in *Arabidopsis* zu keiner zusätzlich erhöhten Salztoleranz im Vergleich zu transgenen Pflanzen führt, die ausschließlich *sos1* oder *sos3* verstärkt exprimierten (Yang et al., 2009).

### 1.3.2 Steigerung der osmotischen Toleranz

Eine weitere Möglichkeit ist die heterologe Expression von Synthesegenen verschiedener *compatible solutes* in Modell- und Nutzpflanzen (Tabelle 1.1). Da viele Nutzpflanzen von Natur aus Prolin, Glycinbetain oder Saccharose unter Salzstress akkumulieren, liegt es nahe, die Expression dieser *compatible solutes* zu erhöhen oder deren Syntheseweg in andere Pflanzen zu übertragen. So gibt es zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Steigerung des Prolin-Gehaltes in Pflanzen beschäftigen, indem z.B. die Feedback-Hemmung der Prolinsynthese gestört wird. Hong et al. (2000) transformierten Tabakpflanzen mit einer mutierten Form der P5CS ( $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase) aus *V. aconitifolia* (Mattenbohne, eine in Indien angebaute Hülsenfrucht), wodurch die Feedback-Hemmung der Biosynthese durch Prolin verhindert wurde. Das Ergebnis war eine zweifach gesteigerte Prolin-Akkumulation in den Pflanzen, die die mutierte Form der P5CS exprimierten im Vergleich zu den Pflanzen, die mit der Wildtyp-Form der P5CS transformiert wurden. Außerdem zeigte sich eine verstärkte Toleranz gegenüber osmotischem Stress und Salzstress. Im Gegensatz dazu basiert ein anderer Ansatz auf der Überexpression des *p5cs*-Gens aus *Arabidopsis* in Kartoffelpflanzen, der ebenfalls zu einer erhöhten Prolin-Akkumulation und Salztoleranz der transgenen Pflanzen führte (Hmida-Sayari et al., 2005). Außerdem wirkte sich eine stressinduzierte verglichen mit der konstitutiven Prolin-Synthese positiv auf die Wachstumsgeschwindigkeit von transgenen Reispflanzen aus, die das *p5cs*-Gen aus *V. aconitifolia* exprimierten (Su u. Wu, 2004).

Eine weitere Möglichkeit ist die *Down-Regulation* der AtProDH, einer Prolin-Dehydrogenase, die in *A. thaliana* den Prolinabbau katalysiert. Durch die Transformation von *AtProDH*-Antisense-Konstrukten in *Arabidopsis* konnten ebenfalls erhöhte Prolin-Werte und eine gesteigerte Kälte- und Salztoleranz der transgenen Pflanzen nachgewiesen werden (Nanjo et al., 1999).

Alternativ zur genetischen Manipulation der Prolin-Synthese mit dem Ziel der Verbesserung der Stresstoleranz, beschäftigen sich viele Arbeiten mit der Steigerung des Glycinbetain-Gehaltes in Pflanzen. Die Biosynthese erfolgt in Pflanzen wie z.B. Spinat im Chloroplasten, ausgehend von Cholin über eine Zweischritt-Reaktion, an der die Cholin-Monooxygenase (CMO) und die Betainaldehyd-Dehydrogenase (BADH) beteiligt sind. So führte die heterologe Expression der BADH aus Spinat in den Chloroplasten transgener Tabakpflanzen zu einem verbesserten Keimlingswachstum unter Salzstress, was möglicherweise auf die protektive Wirkung des Glycinbetains auf verschiedene Enzyme der Photosynthese (z.B. RubisCo) zurückgeführt werden kann (Yang et al., 2008). Zudem resultierte die Überexpression der BADH aus *Atriplex hortensis* (Gartenmelde oder Spanischer Spinat) in Weizen sowohl in einer Zunahme der Kältetoleranz infolge der Schutzwirkung von Glycinbetain auf die Plasmamembran als auch in einer erhöhten Salztoleranz (Zhang et al., 2010). In der Arbeit von Kathuria et al. (2009) wurde das Glycinbetainsynthese-Gen *codA* aus *Arthrobacter globiformis* in Reis transformiert. Reis gehört, wie Tabak und *Arabidopsis* zu den Pflanzen, die unter natürlichen Bedingungen kein Glycinbe-



tain akkumulieren. Das Gen *codA* kodiert für die Cholin-Oxidase, die die Reaktion von Cholin zu Glycinbetain katalysiert. Infolge der Übertragung des *codA*-Gens in die Reispflanzen, wurde Glycinbetain in den Chloroplasten mit bis zu 2  $\mu\text{mol/g}$  Trockengewicht akkumuliert und scheint dort am Schutz des Reparaturmechanismus des Photosystems II unter Stressbedingungen beteiligt zu sein (Kathuria et al., 2009). Die transgenen Pflanzen waren im Vergleich zum Wildtyp toleranter gegenüber Trockenstress und bildeten zudem mehr Körner pro Rispe aus.

Neben Prolin und Glycinbetain, wurde auch die Synthese von Sorbitol in Tabak-Pflanzen mittels *s6pdh*-Gen (Sorbitol-6-phosphat-Dehydrogenase) aus Apfel übertragen und resultierte in einer Sorbitol-Akkumulation bis zu 130  $\mu\text{mol/g}$  Frischmasse (FM), wobei die transgenen Pflanzen mit Sorbitol-Gehalten von mehr als 3  $\mu\text{mol/g}$  FM phänotypische Auffälligkeiten wie Nekrosen, Unfruchtbarkeit und Beeinträchtigung der Wurzelbildung aufwiesen (Sheveleva et al., 1998).

Auch die heterologe Expression von Genen, die an der Synthese von *compatible solutes* in Mikroorganismen oder Pilzen beteiligt sind, wurde bereits untersucht. So führte die Synthese von Mannitol in Tabak-Pflanzen durch Transformation des *mt1D*-Gens (Mannitol-1-phosphat-Dehydrogenase) aus *E. coli* zu einer erhöhten Salztoleranz, gleichzeitig aber auch zu einer Beeinträchtigung des Wachstums unter Kontrollbedingungen (Tarczynski et al., 1992, 1993).

Trehalose ist ein Beispiel für *compatible solutes*, welches in Mikroorganismen, Pilzen, Tieren (außer Wirbeltieren) und trotz der vorhandenen Synthesegene gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen in höheren Pflanzen nachweisbar ist (Ausnahmen sind einige sogenannte Wiederauferstehungspflanzen). Es gibt fünf bekannte Wege zur Trehalose-Synthese, wobei die Synthese über eine Trehalose-6-phosphat Synthase (TPS) und eine Trehalose-6-phosphat-Phosphatase (TPP) sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten am häufigsten vorkommt. Die heterologe Expression des *tps1*-Gens aus Hefe unter der Kontrolle des *rbcS*-Promotors aus Arabidopsis resultierte in der Akkumulation von Trehalose in transgenen Tabakpflanzen und vermittelte einerseits Trockenstresstoleranz, führte aber andererseits zu einer verminderten Wachstumsrate um bis zu 50 % (Holmström et al., 1996). Transgene Tabakpflanzen bzw. Kartoffelpflanzen, deren *tps1*-Expression anhand des Trockenstress-induzierbaren *rd29*-Promotors aus Arabidopsis oder *35S*-Promotors aus CaMV kontrolliert wurde, zeigten ähnliche Ergebnisse bezüglich der Stresstoleranz und phänotypischen Erscheinung, wie reduzierte Wachstumsrate, abnorme Wurzelentwicklung oder veränderte Blattmorphologie, infolge der Trehalose-Akkumulation (Zhao et al., 2000; Yeo et al., 2000).

Garg et al. (2002) nutzten die Trehalose-Synthese-Gene *otsA* und *otsB* aus *E. coli* und transformierten diese als Fusionsgen in Reispflanzen. Es konnten wiederum nur sehr geringe Trehalose-Gehalte in den Blättern und eine erhöhte Trockenstress- sowie Salztoleranz der transgenen Pflanzen nachgewiesen werden. Jedoch wurden keine phänotypischen Effekte beobachtet.

Aufgrund solcher Arbeiten und deren Beobachtungen bezüglich der veränderten Morphologie der transgenen Pflanzen bei Trehalose-Akkumulation zeigte sich in weiteren Untersuchungen, dass Trehalose auch in höheren Pflanzen synthetisiert wird, dort jedoch nicht an der Stresstoleranz, sondern am *sugar signalling* beteiligt ist (Iturriaga et al., 2009).

Tabelle 1.1 zeigt eine vergleichende Zusammenstellung von Untersuchungen zur heterologen Expression verschiedener Synthesegene für *compatible solutes* in höheren Pflanzen. In den meisten Fällen wurde die Expression der Gene von einem konstitutiven Promotor kontrolliert, der Gehalt der akkumulierten Substanz war relativ gering oder führte in größeren Mengen zu morphologischen Abnormitäten der transgenen Pflanzen. Die Arbeiten beziehen sich auf Laboruntersuchungen, auf dessen Grundlage sich bisher wenig über die Anwendung unter Feldbedingungen aussagen lässt.

Substanz	μmol/g FM	Pflanze	Toleranz	Quelle	Jahr
Prolin	5	Arabidopsis	Salz/ Kälte	Nanjo et al.	1999
Prolin	18	Tabak	Salz	Hong et al.	2000
Prolin	?	Reis	Trockenheit/ Salz	Su und Wu	2004
Prolin	?	Kartoffel	Salz	Hmida-Sayari et al.	2005
Glycinbetain	1	Arabidopsis	Salz	Hayashi et al.	1997
Glycinbetain	4,6	Tabak	Salz	Yang et al.	2008
Glycinbetain	2	Reis	Trockenheit	Kathuria et al.	2009
Sorbitol	130	Tabak	-	Sheveleva et al.	1998
Mannitol	6	Tabak	Salz	Tarczyński et al.	1993
Mannitol	12	Arabidopsis	Salz	Thomas et al.	1995
Trehalose	9	Tabak	Trockenheit	Holmström	1996
Trehalose	0,6	Tabak	Trockenheit	Pilon-Smits et al.	1998
Trehalose	?	Kartoffel	Trockenheit	Yeo et al.	2000
Trehalose	1,6	Reis	Trockenheit	Garg et al.	2002

Tabelle 1.1: Zusammenstellung ausgewählter Beispiele für die heterologe Expression von Synthesegenen für „compatible solutes“ in Pflanzen.

## 1.4 Bisherige Untersuchungen zur Etablierung der GG-Synthese in höheren Pflanzen

Trotz der vielfältigen Bemühungen zur gentechnischen Übertragung von Genen für die Synthese verschiedener *compatible solutes* war bisher keine Arbeit bekannt, die sich mit der heterologen Expression eines *compatible solutes* aus der Gruppe der Heteroside in höheren Pflanzen beschäftigt hat. So könnte GG als Vertreter dieser Stoffgruppe in seiner Funktion als *compatible solute* ebenfalls zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salz- und Trockenstress durch eine verbesserte Wasseraufnahme und -rückhaltung führen und zusätzlich Proteine und Membranen vor Denaturierung schützen.

Im Vergleich zu anderen *compatible solutes* hätte die erfolgreiche Übertragung der GG-Synthese in Nutzpflanzen noch weitere verschiedene Vorteile. So ist z.B. der Gehalt von Prolin oder Saccharose, die in vielen Pflanzen natürlicher Weise vorkommen und verschiedene Funktionen im Stoffwechsel haben, Schwankungen unterlegen, die auf eine permanente Synthese oder den Um- und Abbau der Substanzen zurückzuführen sind. Aufgrund dessen ist eine gezielte Steigerung der Akkumulation solcher *compatible solutes* zur Erhöhung der Stresstoleranz oftmals schwierig, ohne dabei den Stoffwechsel zu beeinflussen. GG dagegen sollte dem pflanzlichen Stoffwechsel vollkommen unbekannt sein. Es ist zudem nicht reduzierend. Ein Abbau von GG oder eine Interaktion mit dem Stoffwechsel, wie bei Trehalose, welches auch als wichtiges Signalmolekül in der Pflanze fungiert, ist demnach nicht zu erwarten. Die Synthese von Glycinbetain zum Beispiel erfolgt im Chloroplasten und ist vom Cholin-Transport in den Chloroplasten sowie der Stickstoffversorgung abhängig. Andere *compatible solutes* wie Mannitol, Prolin, Saccharose oder Inositol konnten ebenfalls bereits sowohl im Cytosol als auch in der Vakuole nachgewiesen werden (Yamaki, 1982; Keller u. Matile, 1989; Nadwodnik u. Lohaus, 2008; Martinoia et al., 2007). Im Gegensatz dazu kann GG gezielt im Cytoplasma synthetisiert und akkumuliert werden. Ein Transport von Ausgangsstoffen oder Produkt in Zellkompartimente oder aus Zellkompartimenten heraus ist nicht erforderlich. Zudem ist eine Akkumulation in anderen Zellkompartimenten durch GG-Import oder die GG-Synthese in diesen ohne das Anfügen einer Transidpeptidsequenz

an die GG-Synthesegene *gpps* bzw. *gppps* unwahrscheinlich. Außerdem ist GG als Heterosid, bestehend aus Kohlenhydrat- und Polyolrest, keine stickstoffhaltige Verbindung, wie Prolin oder Glycinbetain, sodass eine heterologe GG-Synthese in transgenen Pflanzen keinen Einfluss auf den Stickstoffhaushalt zur Folge hätte.

Wenn es gelänge, GG in transgenen Pflanzen in hohen Mengen zu akkumulieren, wäre auch eine industrielle Nutzung des isolierten Naturstoffes denkbar. Im Vergleich zu anderen Zuckern besitzt GG eine hohe Süßkraft und Hitzestabilität und eine geringe Tendenz zur Maillardreaktion. Außerdem erfolgt durch GG keine Stimulation von Kariesbakterien. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass es für die menschliche Ernährung unbedenklich ist, da GG als Bestandteil von Sake, einem alkoholischen Getränk in Japan, schon lange in der Nahrungsmittelindustrie bekannt ist (Takenaka et al., 2000). Allgemein kommt *compatible solutes* bereits eine ökonomische Bedeutung als Stabilisator in der Kosmetik- und Pharmaindustrie zu (<http://www.bitop.de>).

Vor Beginn dieser Arbeit, wurden erste Versuche zur GG-Synthese in höheren Pflanzen unternommen, indem die Synthese-Gene *gppS* und *gppP* aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (siehe Abb. 1.2(a)) in die Kartoffelsorte Désirée transformiert wurden. Das Ziel war die Erzeugung transgener GG-akkumulierender Pflanzen, die eine gesteigerte Toleranz gegenüber Salzstress besitzen (Marquardt, 2001). Die transgenen Pflanzen exprimierten entweder das *gppS*-Gen, das *gppP*-Gen oder beide Gene. Es wurde davon ausgegangen, dass der für die GG-Synthese benötigte Ausgangsstoff ADP-Glucose in höheren Pflanzen hauptsächlich in den Chloroplasten vorkommt, da es dort natürlicherweise als Ausgangsstoff für die Stärkesynthese fungiert. Baroja-Fernández et al. (2004) konnten jedoch zeigen, dass ADP-Glucose, welches für die Stärkesynthese zur Verfügung steht, im Cytoplasma akkumuliert. Um die angenommene Limitierung der Synthesereaktion durch einen Mangel an ADP-Glucose im Cytoplasma zu verhindern, erfolgte die Akkumulation der Proteine durch das Anfügen der chloroplastidären Transitpeptidsequenz des *rbcS*-Gens aus Erbse in den Chloroplasten. Die Untersuchungen zeigten, dass GG-Mengen von 0,3 bis 0,7  $\mu\text{mol/g}$  FM in den transgenen Pflanzen akkumuliert wurden und die GG-Synthese in Kartoffelpflanzen grundsätzlich möglich ist. Transgene Pflanzen, die beide Synthesegene ohne ein Transitpeptid exprimierten, wiesen dagegen kein GG auf. Außerdem scheint die Dephosphorylierung des Glucosylglycerol-Phosphates auch ohne die GgpP aus *Synechocystis* stattzufinden. Signifikante Unterschiede im Ertrag zwischen dem Wildtyp und den transgenen Linien waren nicht zu beobachten ((Marquardt, 2001) sowie unveröffentlichte Voruntersuchungen).

Es wurde vermutet, dass die geringen GG-Mengen in diesen Voruntersuchungen aus der Limitierung an ADP-Glucose resultierten. Daher wurde in weiteren Versuchen angestrebt, das UDP-Glucose-abhängige GG-Synthese-Gen *gppPS* aus *A. vinelandii* in Pflanzen zu transformieren. Die Vorteile dieser Herangehensweise bestehen zum einen darin, dass für die Transformation nur ein Gen mit kombinierter GgpS- und GgpP-Domäne verwendet werden muss und zum anderen in der besseren Verfügbarkeit von UDP-Glucose im Cytosol als Ausgangsstoff für die GG-Synthese. Daher konnte auch auf das Anfügen einer chloroplastidären Transitpeptidsequenz an die *gppPS*-Sequenz verzichtet werden.

Aufgrund ihres Modellcharakters (z. B. geringe Generationszeit, einfache Kultivierung) für höhere Pflanzen erfolgten die Untersuchungen zunächst an *Arabidopsis thaliana* (Klähn et al., 2009). Das transformierte Konstrukt enthielt das *gppPS*-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus CaMV. Drei transgene Linien wurden für die Versuche ausgewählt und im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Northern Blot Analysen bestätigten die *gppPS*-Expression, die mit der akkumulierten GG-Menge von bis zu 30  $\mu\text{mol/g}$  FM im Blatt korrelierte. Diese Werte waren bereits 50mal höher als in den vorhergehenden Versuchen zur Etablierung der GG-Synthese in Kartoffel mit den GG-Synthesegenen aus *Synechocystis*. Trotz der hohen GG-Akkumulation

war bis auf eine geringe Wachstumsreduktion keine Beeinträchtigung der Morphologie zu beobachten, was die Kompatibilität großer GG-Mengen mit dem pflanzlichen Stoffwechsel von *Arabidopsis* zeigt. Unter Salzstress konnte in den Pflanzen mit geringerer GG-Akkumulation ( $17 \mu\text{mol/g FM}$ ) sowohl ein erhöhtes Wachstum der Wurzel als auch der gesamten Pflanze im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden.

## 1.5 Ziel und Fragestellungen der Arbeit

Aufbauend auf die vorrangegangenen Untersuchungen ergab sich für die vorliegende Arbeit die Zielstellung, transgene, GG-akkumulierende Kartoffellinien zu erzeugen und diese hinsichtlich verschiedener Fragestellungen zu untersuchen. Wie in den Versuchen mit *Arabidopsis* wurde das GG-Synthese-Gen *gppPS* aus den heterotrophen Bakterien *A. vinelandii* und *S. rhizophila* genutzt, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Modellpflanze auf die Nutzpflanze *S. tuberosum* zu überprüfen. Das erforderte die Herstellung verschiedener Konstrukte, die das *gppPS*-Gen zunächst unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors aus CaMV beinhalten. Nach erfolgreicher Transformation wurden die transgenen Linien bezüglich ihrer akkumulierten GG-Mengen analysiert.

Die transgenen Linien wurden anschließend hinsichtlich der GG-Wirkung auf das Wachstum und den gesamten Phänotyp der Pflanze, den Ertrag und die Lagereigenschaften der Knollen in Gewächshausversuchen untersucht. Um weiterhin zu überprüfen, ob GG in transgenen Kartoffellinien in seiner Funktion als *compatible solute* wirksam ist und in diesen Pflanzen eine gesteigerte Toleranz gegenüber Salz- und Trockenstress vermittelt, erfolgte die Anzucht der Pflanzen unter verschiedenen Stressbedingungen.

Zusätzlich wurde ein weiterer Versuchsansatz realisiert, bei dem eine stressinduzierbare Expression des *gppPS*-Gens mit Hilfe des *rd29A*-Promotors aus *A. thaliana* angestrebt wurde. Promotoranalysen mit Hilfe des Reportergens  $\beta$ -*Glucoronidase* weisen auf eine gewebeunspezifische Expression des Gens in allen Organen hin, die osmotischem Stress ausgesetzt sind (Yamaguchi-Shinozaki u. Shinozaki, 1994). Auch in Kartoffelpflanzen konnte die Funktionalität dieses Promotors bereits nachgewiesen werden (Zhang et al., 2005).

Aufgrund der zuvor beschriebenen vorteilhaften Eigenschaften von GG, ergab sich zusätzlich die Absicht, transgene Kartoffelpflanzen mit einer hohen GG-Akkumulation in den Knollen zu erzeugen. Das Ziel war in dem Fall eine knollenspezifische Expression des *gppPS*-Gens mit Hilfe des *B33*-Promotors aus *S. tuberosum*, der in Wildtyp-Pflanzen die Expression des knollenspezifischen Proteins Patatin in den Knollen kontrolliert (Andrews et al., 1988; Pikaard et al., 1987; Rocha-Sosa et al., 1989). Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob in den transgenen Pflanzen ausreichend GG akkumuliert werden kann, um eine eventuelle Co-Produktion von GG und Stärke, mit dem Ziel einer industriellen Verwertbarkeit des GGs, zu ermöglichen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle hier verwendeten Grundchemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, analyserein von folgenden Firmen bezogen:

APPLICHEM, ROTH, DUCHEFA, DIFCO, FLUKA,  
OTTO NORDWALD, SIGMA-ALDRICH

#### 2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

##### 1 M Tris-HCl

12,114 g Tris in 100 ml Aqua dest. lösen, pH 8,0 mit HCl einstellen

##### 0,5 M EDTA

146,14 g in 100 ml Aqua dest. lösen, pH 7,6 mit HCl einstellen

##### Chloroform/Isoamylalkohol (C/I)

24	VT	Chloroform
1	VT	Isoamylalkohol

##### Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (P/C/I)

25	VT	Phenol
24	VT	Chloroform
1	VT	Isoamylalkohol

##### Ethidiumbromidstammlösung

10 mg/ml in H<sub>2</sub>O lösen

##### TE-RNase

100	μl	RNaseA (10mg/ml)
10	ml	1 x TE-Puffer

### **NaHSO<sub>3</sub> + Pefablock**

60	mM	NaHSO <sub>3</sub>
6	mM	Pefablock

im Verhältnis 1:1 mischen

### **PMSF**

30	mM	PMSF
----	----	------

in Isopropanol lösen

### **EDTA-Tris-HCl**

75	mM	Tris-HCl
1,5	mM	EDTA

pH 7,5 einstellen

### **Lösung I (alkalische Plasmid-DNA-Präparation)**

2,5	ml	1 M Tris-HCl, pH 8,0
2	ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
900	mg	Glucose

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen und autoklavieren

### **Lösung II (alkalische Plasmid-DNA-Präparation)**

1	g	SDS
800	mg	NaOH

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

### **Lösung III (alkalische Plasmid-DNA-Präparation)**

29,45	g	3M Kaliumacetat
20	ml	reine Essigsäure

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

**Lösung A (Proteinnachweis)**

2,5	mM	Luminol in DMSO lösen
400	$\mu$ M	p-Coumaric Acid in DMSO lösen
100	mM	Tris-HCl, pH 8,5

mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen und dunkel lagern

**Lösung B (Proteinnachweis)**

5,4	mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
100	mM	Tris-HCl, pH 8,5

mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen und dunkel lagern

**2x CTAB-Puffer**

2	%	CTAB
1,4	M	NaCl
100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
20	mM	EDTA
0,2	%	$\beta$ -Mercaptoethanol

**50x TAE-Puffer**

242	g	Tris
57,1	ml	Essigsäure
100	ml	0,5 M EDTA, pH 7,6

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 8,0 mit Essigsäure einstellen und autoklavieren

**0,1x TE-Puffer**

10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
0,1	mM	EDTA

**TBE-Puffer**

0,2	M	Tris
10	mM	EDTA

pH 8,0 mit Borsäure einstellen und autoklavieren

### TSS

10	%	PEG
25	mM	MgCl <sub>2</sub>
25	mM	MgSO <sub>4</sub>
5	%	DMSO

in LB-Medium

### 10x TBS

24,3	g	Tris
80	g	NaCl

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und pH 7,6 einstellen

### 10x Transferpuffer

58	g	Tris
29	g	Glycin
3,7	g	SDS

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

### 1x Transferpuffer

80	ml	10x Transferpuffer
200	ml	Methanol

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

### X-Gluc-Puffer

100	mM	Natriumphosphatpuffer pH 7
10	mM	EDTA, pH 8
5	mM	K <sub>3</sub> [Fe(cN) <sub>6</sub> ] <sup>III</sup>
5	mM	K <sub>4</sub> [Fe(cN) <sub>6</sub> ] <sup>II</sup>
0,1	%	(v/v) Triton X-100
1	mM	X-Gluc (kurz vor Gebrauch zugeben)

mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen

### 3x Lämmli-Puffer

3	ml	0,5 mM Tris-HCL, pH 6,8
2,4	ml	Glycerol
1,2	ml	β-Mercaptoethanol
1,2	ml	1 % Bromphenolblau (in H <sub>2</sub> O gelöst)
480	mg	SDS
0,2	ml	H <sub>2</sub> O



**LB-Flüssigmedium**

10	g	Trypton
10	g	NaCl
5	g	Hefeextrakt

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 7,5 mit NaOH einstellen und autoklavieren

**LB-Agar**

10	g	Trypton
10	g	NaCl
5	g	Hefeextrakt
20	g	Bactoagar

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 7,5 mit NaOH einstellen und autoklavieren

**YEB-Medium**

5	g	Fleischextrakt
1	g	Hefeextrakt
5	g	Pepton
5	g	Saccharose

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren und anschließend 2 mM steril filtriertes  $\text{MgSO}_4$  zugeben

**1/2 MS-Medium**

2,48	g	MS-Salze und Vitamine (DUCHEFA)
5	g	Saccharose
8	g	Agar

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert 5,8 mit KOH einstellen und autoklavieren

**2 MS-Flüssigmedium (Kartoffeltransformation)**

4,8	g	MS-Salze und Vitamine (DUCHEFA)
20	g	Saccharose
200	$\mu\text{M}$	Acetosyringon (39,24 mg)

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert 5,7 mit KOH einstellen und autoklavieren

### CIM-Kallusinduktionsmedium (Kartoffeltransformation)

4,8	g	MS-Salze und Vitamine (DUCHEFA)
16	g	Glucose
8	g	Agar

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert 5,7 mit KOH einstellen, autoklavieren und vor der Verwendung folgende Komponenten zufügen:

5	mg	$\alpha$ -Naphthylelessigsäure
0,1	mg	Benzylaminopurin
250	mg	Cefotaxim
50	mg	Kanamycin bzw.
40	mg	Hygromycin (entsprechend dem transformierten Plasmid)

### SIM-Sprossinduktionsmedium (Kartoffeltransformation)

4,8	g	MS-Salze und Vitamine (DUCHEFA)
16	g	Glucose
8	g	Agar

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 5,7 mit KOH einstellen, autoklavieren und vor der Verwendung folgende Komponenten zufügen:

20	$\mu$ g	$\alpha$ -Naphthylelessigsäure
0,02	mg	Gibberellinsäure
2	mg	Zeatinribose
250	mg	Cefotaxim
50	mg	Kanamycin bzw.
40	mg	Hygromycin (entsprechend dem transformierten Plasmid)

### RIM-Wurzelinduktions-/Erhaltungsmedium (Kartoffeltransformation)

4,8	g	MS-Salze und Vitamine (DUCHEFA)
25	g	Saccharose
8	g	Agar

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 5,7 mit KOH einstellen, autoklavieren und vor der Verwendung folgende Komponenten zufügen:

0,1	mg	Indol-3-Essigsäure
200	mg	Cefotaxim
80	mg	Kanamycin bzw.
40	mg	Hygromycin (entsprechend dem transformierten Plasmid)

## Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin	50	mg in 1 ml H <sub>2</sub> O
Rifampicin	25	mg in 1 ml Methanol
Kanamycin	10	mg in 1 ml H <sub>2</sub> O
Gentamycin	50	mg in 1 ml H <sub>2</sub> O
Tetracyclin	5	mg in 1 ml Ethanol
Hygromycin	40	mg in 1 ml H <sub>2</sub> O

## 2.1.3 Standards

### 2.1.3.1 DNA-Standard

Der Lambda-DNA *EcoRI*+*HindIII* Marker diene als Größenstandard für DNA-Fragmente bei der Agarosegel-Elektrophorese (Abschnitt 2.2).

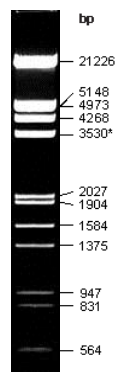


Abbildung 2.1: Lambda-DNA *EcoRI*+*HindIII*-Größenstandard(Fermentas).

### 2.1.3.2 Protein-Standard

Der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* von Fermentas diene als Größenstandard für Proteine bei der SDS-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2).

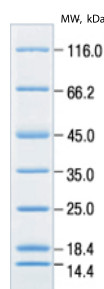


Abbildung 2.2: *Unstained Protein Molecular Weight*-Größenstandard(Fermentas).

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden zur Amplifikation von DNA-Fragmenten in der PCR als Primer verwendet. Sie wurden von der Firma Eurofins MWG Operon im lyophilisierten Zustand bezogen und in Aqua bidest. aufgenommen. Die Stamm-Konzentration betrug 100 pmol/ $\mu$ l. Für die PCR-Reaktionen wurden diese 1:20 verdünnt.

Name	Sequenz
AF-PCR-S	5'-AGCCTGCTGCAATGCGACTA-3'
AF-PCR-A	5'-TGAAGGCGACGATGTGGAAC-3'
AFggpPS-3'	5'-GGTGACATAGGCCAACTGGA-3'
AFggpPS-HpaI-5'	5'-CGTTAACATGCTACTTGCCACCGA-3'
AFggpPS-HpaI-3'	5'-CGTTAACTCAGGCGATGGCGCGGA-3'
rd29A-5'	5'-CGACTCAAAACAAACTTAACG-3'
rd29A-3'	5'-AATCAAACCCTTTATTCCTG-3'
rd29A-5'-HindIII	5'-CAAGCTTCGACTCAAAACAAACTTACG-3'
rd29A-3'-BamHI	5'-CGGATCCAATCAAACCCTTTATTCCTG-3'
60s ST5'	5'-GACAAGGCTGGAATGACTCACATTGTC-3'
60s ST3'	5'-CTCCTCAAGAGCAACACGAGAGGTCTG-3'
Kan-S	5'-AACAGACAATCGGCTGCTCTGATG-3'
Kan-A	5'-CGCCAAGCTCTTCAGCAATATCAC-3'
hptII-S	5'-ARCCGGTTCGGCATCTACTCTAT-3'
hptII-A	5'-TTAGCGAGAGCCTGACCTATTG-3'

### 2.1.5 Plasmide

#### 2.1.5.1 pGEM-T

Der pGEM-T-Vektor wird für die Klonierung von PCR-Fragmenten verwendet. Durch die Taq-Polymerase wird während der PCR an beide Enden eines amplifizierten Produktes jeweils ein 3'-überhängendes Adenosin anfügt. pGEM-T ist ein linearisierter Vektor, dessen Enden jeweils ein 3'-überhängendes Thymidin aufweisen. Das ermöglicht die Ligation von Vektor und PCR-Produkt, welches so gelagert und für weitere Klonierungsschritte verwendet werden kann.

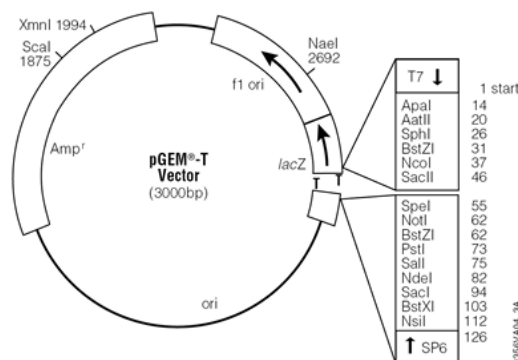


Abbildung 2.3: Plasmidkarte des pGEM-T-Vektors (Promega).

### 2.1.5.2 35S-CaMV-Kassette

Mit Hilfe der 35S-CaMV-Kassette der pGreen-Serie als Übergangsvektor konnten Konstrukte hergestellt werden, die das *gppPS*-Gen unter der Kontrolle des B33- bzw. rd29A-Promotors enthielten, indem diese zuvor gegen den 35S-Promotor der Kassette ausgetauscht wurden.

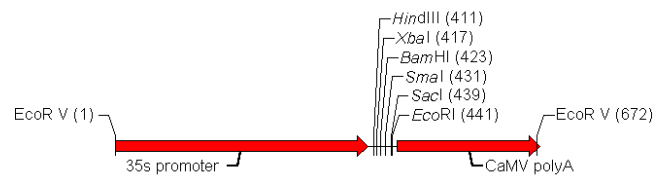


Abbildung 2.4: Plasmidkarte der 35S-CaMV-Kassette (JIC, Norwich).

### 2.1.5.3 pGreen0029

pGreen0029 ist ein binärer Vektor der sowohl die bakterielle als auch die pflanzliche Selektion über ein Kanamycin-Resistenzgen (*nptII*) erlaubt und wurde für die Erzeugung der Konstrukte pG0029-TP-SF, pG0029-SF, pG0029-AF und pG0029-B33-AF verwendet.

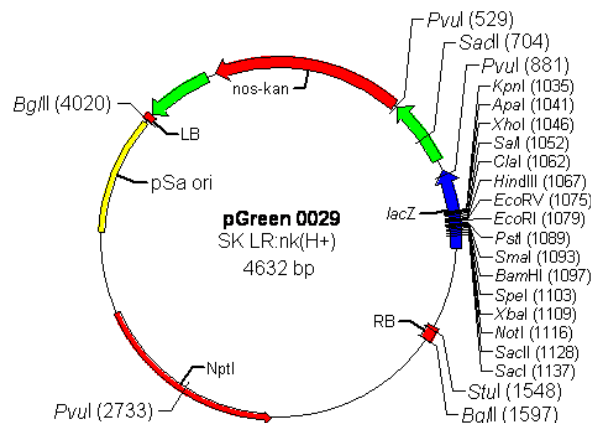


Abbildung 2.5: Plasmidkarte des pGreen0029-Vektors (JIC, Norwich).

### 2.1.5.4 pGreenII0229

Der binäre Vektor pGreenII0229 beinhaltet ein Kanamycin-Resistenzgen (*nptII*) für die Selektion transgener Bakterien und das BASTA®-Resistenzgen (*nos-bar*) für die Selektion transgener Pflanzen und diente der Herstellung der Konstrukte pGII0229-TP-SF, pGII0229-SF und pGII0229-AF sowie pGII0229-B33-AF und pGII0229-rd29A-AF.

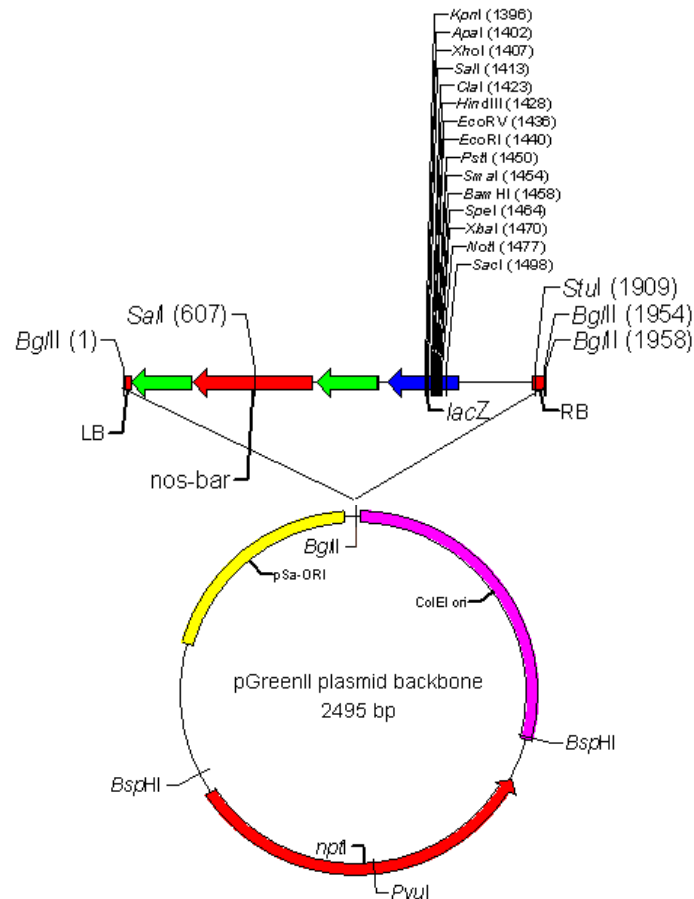


Abbildung 2.6: Plasmidkarte des pGreenII0229-Vektors (JIC, Norwich).

### 2.1.5.5 pCambia1305.1

Für die vorliegende Arbeit wurde der Vektor pCambia1305.1 verwendet, welcher ein Kanamycin-Resistenzgen (*npt*) für die Bakterienselektion, ein Hygromycin-Resistenzgen (*hptII*) für die Pflanzenselektion, den pUC18-Polylinker (mcs) sowie das  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergen besitzt. Er wurde für die Herstellung der Konstrukte pCambia-rd29A-AF und pCambia-rd29A-GUS genutzt.

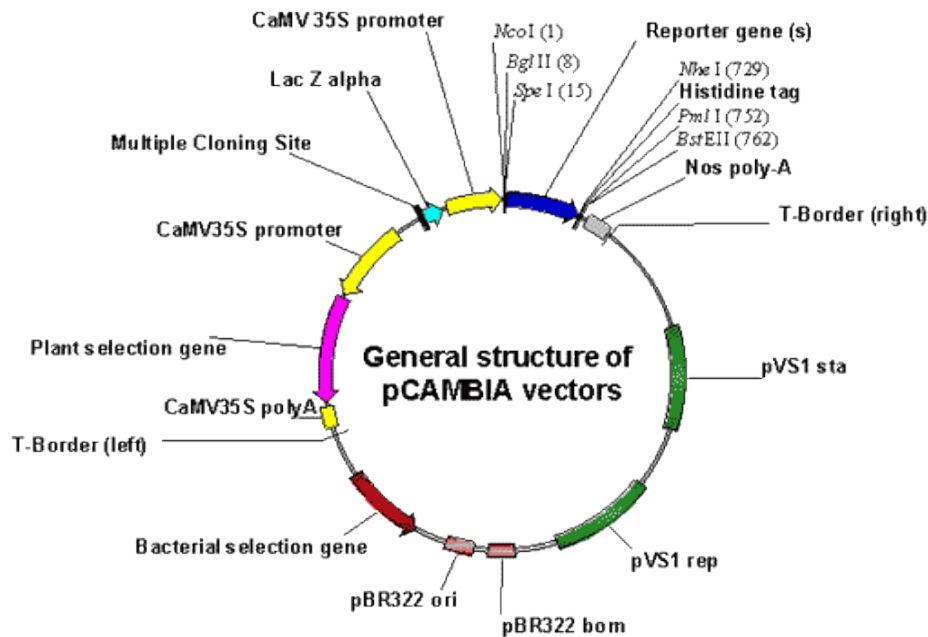


Abbildung 2.7: Plasmidkarte der Grundstruktur der pCambia-Vektoren (Cambia). Der Zahlen-code (z.B. 1305.1) gibt Aufschluss über die vorliegenden Resistenzgene für die Bakterien- bzw. Pflanzenselektion, den Polylinker und das Reportergen.

#### 2.1.5.6 pB33-Hyg2

Dieses Plasmid enthält den knollenspezifischen Promotor B33 aus *Solanum tuberosum*, der aus diesem über Restriktionsverdau (Abschnitt 2.2) für eine Klonierung herausgeschnitten werden kann und wurde von der Arbeitsgruppe Agrobiotechnologie der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

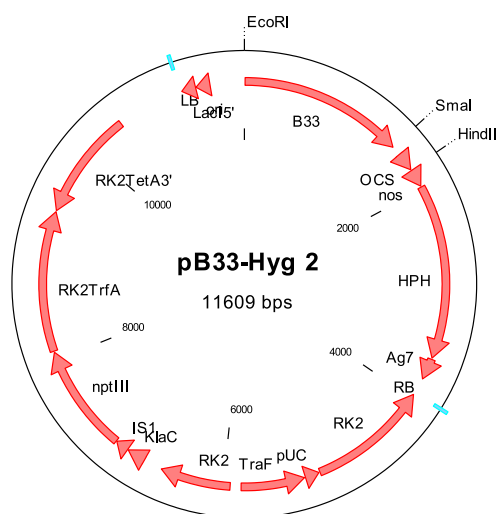


Abbildung 2.8: Plasmidkarte des pB33-Hyg2-Konstruktes (Hühns et al., 2009).

### 2.1.5.7 pLH-AF

Dieses Plasmid wurde von Dr. S. Klähn während seiner Untersuchungen zur GG-Synthese in *Arabidopsis thaliana* erzeugt (Klähn et al., 2009) und wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es besteht aus dem Vektor pLH9000, der das *gppPS*-Gen aus *Azotobacter vinelandii* unter der Kontrolle des 35S-Promotors, ein Streptomycin/ Spectinomycin-Resistenzgen für die Bakterien-Selektion sowie ein Kanamycin-Resistenzgen für die Pflanzen-Selektion enthält.

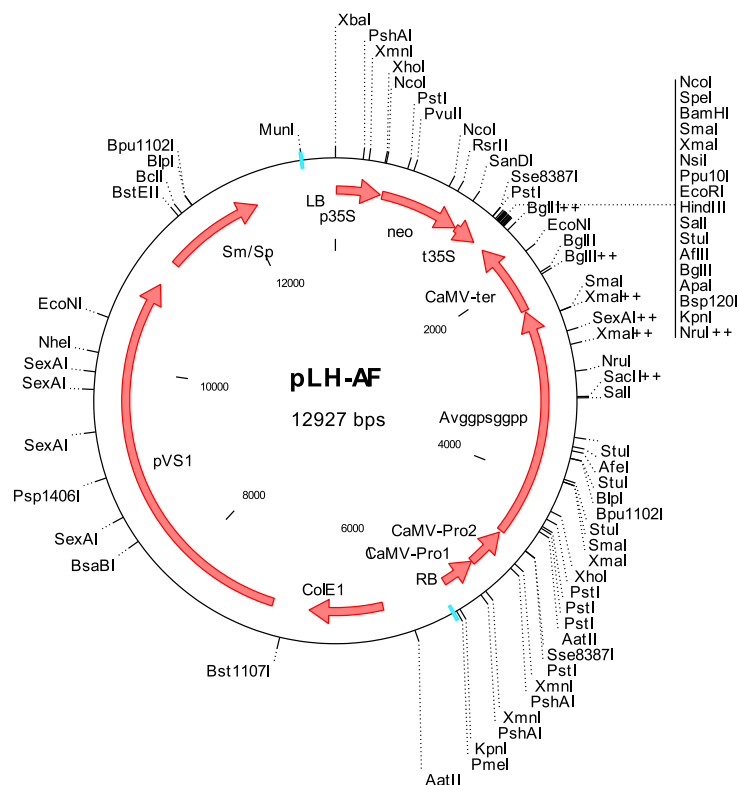


Abbildung 2.9: Plasmidkarte des pLH-AF-Konstruktes (Klähn et al., 2009).

### 2.1.5.8 pG0029-TP-SF, pG0029-SF

Diese beiden Vektoren wurden ebenfalls von Dr. S. Klähn zur Verfügung gestellt. Sie besitzen den pGreen0029-Hintergrund mit dem *gppPS*-Gen aus *Stenotrophomonas rhizophila* mit (pG0029-SF) bzw. ohne (pG0029-TP-SF) chloroplastidäres Transidpeptid unter der Kontrolle des 35S-Promotors.



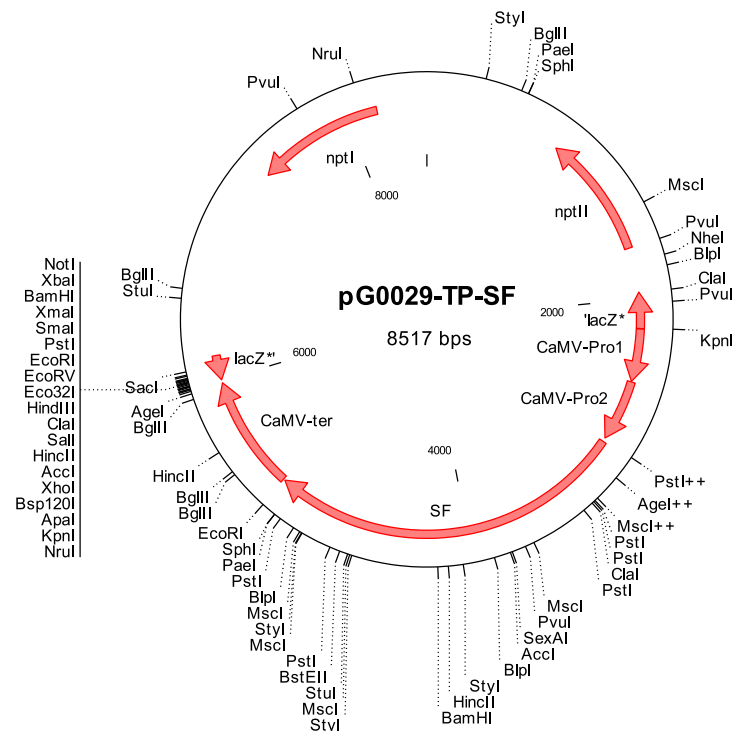


Abbildung 2.10: Plasmidkarte des pG0029-TP-SF-Konstruktes (Dr. S. Klähn).

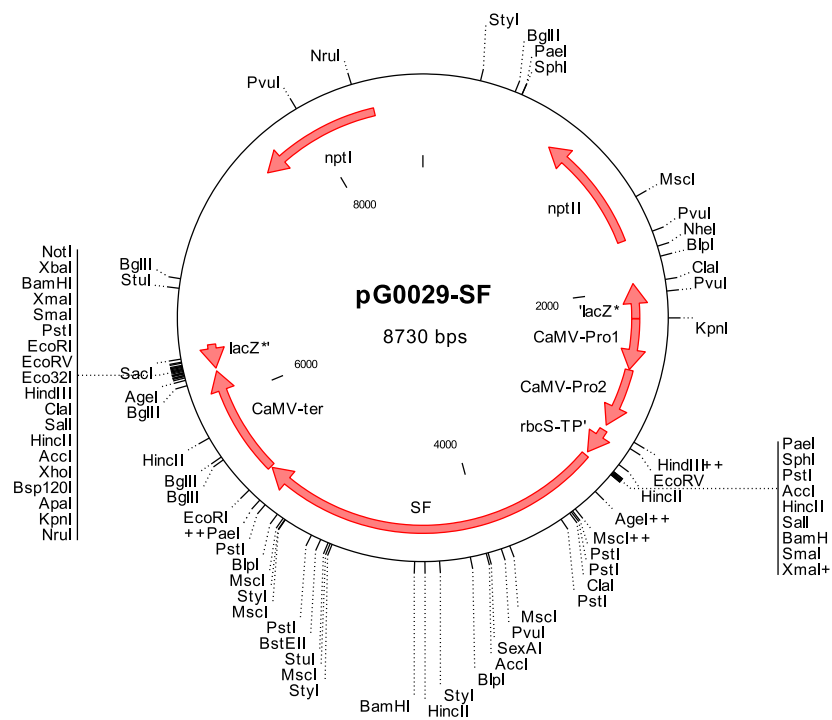


Abbildung 2.11: Plasmidkarte des pG0029-SF-Konstruktes (Dr. S. Klähn).

## 2.1.6 Bakterienstämme

### 2.1.6.1 *Escherichia coli*

**TG1** Genotyp: *supE hsdΔ5 thi triangle(lac-proAB) F' traD36 pro AB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15*

### 2.1.6.2 *Agrobacterium tumefaciens*

**GV3101** Genotyp: C58-C1 Rif<sup>R</sup> (Holsters et al., 1980)

**GV3101+pSoup** Genotyp: pMP90(pTiC58ΔT-DNA), Gent<sup>R</sup> (Koncz u. Schell, 1986)(bei Verwendung eines pGreen-Vektors)

## 2.1.7 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen wurden die drei Kartoffelsorten Albatros, Terrana und Pelikan der Firma NORIKA (Nordring-Kartoffelzucht- und Vermehrungs-GmbH, Groß Lüsewitz) verwendet, die als Stärke- und/oder Veredelungssorten kultiviert werden.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden in einem 1 %-igen Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in 1xTAE-Laufpuffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid (1:20000) versetzt, das an die DNA bindet und sie so unter UV-Licht sichtbar macht. Als Größenstandard diente der Lambda-DNA *EcoRI*+*HindIII* Marker (siehe Abschnitt 2.1). Die Stromversorgung des Elektrophoresesystems (Bio-Rad) erfolgte über Power Pac 300 (Bio-Rad) mit 5–8 V/cm Laufstrecke. Die anschließende Geldokumentation wurde an einem Gerät der Firma Vilber Lourmat durchgeführt.

#### 2.2.1.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung und Gelextraktion von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des paqGOLD Gel Extraction Kits von PaqLab nach mitgeliefertem Protokoll. Die aufgereinigte DNA wurde in 40 µl Elutionspuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

#### 2.2.1.3 PCR (polymerase chain reaction)

Die PCR dient dem Nachweis von DNA-Fragmenten durch deren Vervielfältigung innerhalb eines Programms, während dessen die DNA in mehreren Zyklen für eine bestimmte Zeit verschiedenen Temperaturen ausgesetzt ist. Dabei erfolgt zunächst ein Denaturierungsschritt bei 94° C, um aus der doppelsträngigen DNA Einzelstränge zu erzeugen. An diese Einzelstränge binden während des anschließenden *Annealing*-Schrittes bei 58° C (kann abhängig von Primersequenz variieren) die Primer (Oligonukleotide) und bilden somit den Startpunkt für die folgende Elongation bei 72° C. Dabei erfolgt mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* die

Bildung der komplementären Stränge. Dieser Zyklus wird anschließend 28–35 mal wiederholt, um das gewünschte DNA-Fragment, dass über die Primersequenzen begrenzt wird, bishin zu nachweisbaren Mengen zu vervielfältigen. Für die durchgeführten PCR-Reaktionen wurde ein Mastermix (Qiagen) bestehend aus Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> und Reaktionspuffer verwendet.

Für einen 10 µl-Reaktionsansatz ergab sich folgende Zusammensetzung:

1	µl	DNA
1	µl	Primer 1
1	µl	Primer 2
5	µl	Mastermix
2	µl	Wasser

Alle Komponenten wurden nacheinander auf Eis zusammenpipettiert. Die PCR wurde dann entweder im PCR-Cycler PTC-100 (MJ Research) oder Mastercycler<sup>®</sup>ep (Eppendorf) nach folgendem grundlegenden Programm durchgeführt:

### PCR-Programm-NL58SHORT

Schritt 1:	5 min 94° C
Schritt 2:	1 min 94° C
Schritt 3:	1 min 58° C (abhängig von der Primersequenz)
Schritt 4:	1 min 72° C (abhängig von der Fragmentgröße)
Schritt 5:	5 min 72° C
Schritt 6:	auf 4° C abkühlen und halten

Die Schritte zwei bis vier wurden in der Regel 34 mal wiederholt.

#### 2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Für die Durchführung von Restriktionsverdau wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Fermentas und New England Biolabs mit den entsprechenden Puffern verwendet. Ein 10 µl-Ansatz enthielt:

0,5–2	µl	DNA
0,25	µl	Enzym
1	µl	10x Restriktionspuffer
ad 10	µl	Aqua dest.

Der Ansatz inkubierte 1 Stunde bei 37° C, wonach die Reaktion bei einer dem Enzym entsprechenden Temperatur abgestoppt und in einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft wurde.

#### 2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Für die Ligationen wurde die T4 DNA-Ligase und der entsprechende Puffer der Firma Fermentas verwendet. Ein 15 µl-Ansatz enthielt:

x	$\mu\text{l}$	Vektor-DNA
y	$\mu\text{l}$	DNA-Fragment
1,5	$\mu\text{l}$	Ligationspuffer
ad 15	$\mu\text{l}$	Aqua dest.

Die Vektor-DNA und das DNA-Fragment wurden in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Der Ligationsansatz inkubierte über Nacht in einem mit Wasser gefüllten Styroporbehälter im Kühlschrank. Der Reaktionsstopp erfolgte für 7 Minuten bei 65° C.

### 2.2.1.6 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der aus den Kartoffelpflanzen isolierten RNA erfolgte am Photometer CARY 50 BIO (Varian) mit dem Programm CARY WIN UV RNA-DNA ESTIMATION. Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde jede RNA-Probe 1:100 verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (molarer Extinktionskoeffizient=40). Daraus ergibt sich folgende Gleichung für die Berechnung der RNA-Konzentration der Probe:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\text{ml}) = A_{260} \times \text{molarer Extinktionskoeffizient} \times \text{Verdünnung}$$

### 2.2.1.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung des aus den Kartoffelpflanzen isolierten Gesamtproteingehaltes erfolgte am Photometer CARY 50 BIO (Varian) nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976).

### 2.2.1.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die für die Elektrophorese benötigte Proteinmenge wurde mit 1/3 VT 3X Lämmli-Puffer gemischt, für 10 Minuten bei 95° C inkubiert und anschließend bis zum Auftragen auf Eis gelagert. Die folgende Zusammensetzung wurde für die Herstellung von zwei kleinen Glycin-SDS-Gelen verwendet.

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/BIS	0,975 ml	4 ml
Aqua dest.	2,735 ml	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	0 ml	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	0 ml
10 % SDS	50 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
10 % Ammoniumsulfat	25 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$

Die Stromversorgung der Elektrophoresesystems (Bio-Rad) erfolgte über Power Pac 300 (Bio-Rad) mit zunächst 80 V für die Sammeln der Proteine im Sammelgel und wurde dann für die Auftrennung der Proteine im Trenngel auf 120 V erhöht.

### 2.2.1.9 Western Blot und Nachweis der Proteine

Für den Western Blot wurde der LKB Nova Blot der Firma Pharmacia verwendet. Die Anode wurde mit Transferpuffer befeuchtet, um dann übereinander Whatman-Filterpapier, die PVDF-Membran, das Trenngel und wieder Whatman-Filterpapier aufzulegen. Das Filterpapier wurde zuvor in Transferpuffer getränkt, die Membran zunächst in Methanol und anschließend ebenfalls mit Transferpuffer gespült. Der Blot wurde mit der Katode geschlossen und die Proteine innerhalb von 1 Stunde und 30 Minuten bei 6 V auf die Membran übertragen. Nach dem Blot konnte der Standard von der Membran abgeschnitten werden, um ihn über Nacht in Amidoschwarz zu färben und am nächsten Tag in 7 %-iger Essigsäure zu entfärben. Die Membran dagegen wurde zunächst kurz in TBS-Puffer gespült und dann mindestens 1 Stunde in 5 %-iger Magermilch (in TBS-Puffer gelöst) inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit TBS-Puffer für 10 Minuten und anschließend die Inkubation mit dem GgpPS-Antikörper (1:5000 in 5 %-Magermilch-TBS-Lösung verdünnt) für mindestens 1 Stunde. Dann wurde die Membran fünfmal in TBS-Puffer für jeweils 10 Minuten gewaschen, um sie danach mit dem Peroxidase-Antikörper (1:5000 in 5 %-Magermilch-TBS-Lösung verdünnt) mindestens 1 Stunde zu inkubieren und dann wiederum fünfmal in TBS-Puffer für jeweils 10 Minuten zu waschen. Zum Schluss erfolgte die Detektion der Proteinbanden in der Dunkelkammer, indem die Membran in Folie gelegt und mit einem 1:1-Gemisch aus Lösung A und B benetzt wurde, das bis zur Röntgenfilmauflage 2-4 Minuten inkubieren musste. In der Dunkelkammer wurde alle Luftblasen aus der Folie ausgestrichen und der Film etwa 4-5 Minuten aufgelegt, anschließend erst in Entwickler, dann kurz in Wasser und letztendlich in Fixierer gespült bis der Film klar durchsichtig wirkte. Der Film konnte zum Schluss noch einmal mit Wasser abgespült und dann zum Trocknen aufgehängt werden.

## 2.2.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

### 2.2.2.1 Kultivierung und Lagerung

Für die Anzucht wurden Zellen des TG1-Stammes (Abschnitt 2.1) einer Glycerol-Erhaltungskultur mit einem sterilen Zahnstocher entnommen, auf LB-Medium mit einem dem Plasmid entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. 5 ml LB-Flüssigmedium wurden anschließend mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und wiederum über Nacht schüttelnd bei 37° C inkubiert. Eine Lagerung der Bakterien auf Fest- oder im Flüssigmedium ist bei 4° C zwei bis drei Wochen möglich. Für eine langfristige Lagerung wurden Glycerol-Erhaltungskulturen angelegt. Dafür wurden 300 µl einer über Nacht angezogenen Flüssigkultur 500 µl Glycerol zugesetzt und durch vortexen gemischt. Anschließend erfolgte eine 15- bis 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, während dessen das Glycerol in die Zellen eindringen konnte. Die Kulturen wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

### 2.2.2.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte modifiziert nach Hanahan (1985). Dazu wurden 0,3 ml einer über-Nacht-Kultur in 30 ml LB-Medium pipettiert und bei 37° C und 220 U/min bis zu einer optischen Dichte von 0,3–0,4 bei einer Wellenlänge von 600 nm geschüttelt. Danach folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 2500 g und 4° C. Das Sediment wurde in 3 ml kaltem TSS resuspendiert, die Zellen zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Für die Transformation wurden die Zellen zunächst auf

Eis aufgetaut und mit bis zu 10  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes oder 1–5  $\mu\text{l}$  einer DNA-Suspension gemischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, ein anschließender Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42° C und wieder eine Inkubation auf Eis für 3 Minuten. Danach wurden 900  $\mu\text{l}$  LB-Flüssigmedium zum Ansatz pipettiert und die Zellsuspension 45 Minuten im Schüttelschrank bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Festmedium, welches ein dem Plasmid entsprechendes Antibiotikum enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

### 2.2.2.3 Extraktion von Plasmid-DNA

Die Methode der alkalischen Miniplasmidpräparation wurde nach Birnboim und Doly (1979) modifiziert. Es wurden 2 ml einer über-Nacht-Kultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in der Biofuge pico (Heraeus) 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Bakterienrückstand wurde in 100  $\mu\text{l}$  Lösung I resuspendiert. Durch die folgende Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  der alkalischen Lösung II und das Invertieren der Suspension erfolgte die Lyse der Bakterien und die Denaturierung der DNA. Anschließend wurden 150  $\mu\text{l}$  Lösung III hinzugefügt und vorsichtig invertiert. Diese Neutralisierung führte dazu, dass die Stränge der Plasmid-DNA wieder hybridisierten, die der genomischen DNA aufgrund ihrer Größe jedoch nicht. Bei der folgenden Inkubation des Ansatzes von mindestens 5 Minuten auf Eis fiel die genomische Bakterien-DNA aus. Danach wurde die Suspension mit 1 VT P/C/I gut gemischt und 5 Minuten in der Biofuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 1 VT Isopropanol versetzt, 1–2 Minuten auf Eis inkubiert und erneut bei maximaler Geschwindigkeit 15 Minuten zentrifugiert. Die ausgefällte Plasmid-DNA wurde dann mit 200  $\mu\text{l}$  70 %-igem Ethanol überschichtet und ein letztes Mal für 5 Minuten zentrifugiert. Der DNA-Rückstand wurde nach dem Trocknen in 20  $\mu\text{l}$  TE-RNase aufgenommen, um sie bei -20° C lagern zu können.

## 2.2.3 Arbeiten mit *Agrobacterium tumefaciens*

### 2.2.3.1 Kultivierung und Lagerung

Für die Anzucht wurden Zellen aus einer Glycerol-Erhaltungskultur mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und auf LB-Medium ausgestrichen, dass je nach Plasmid ein entsprechendes Antibiotikum und Rifampicin enthielt. Die Inkubation erfolgte 2 Tage bei 29° C. Um dann eine Flüssigkultur anziehen zu können wurden 2 ml mit einer Bakterienkolonie angeimpft und diese dann wiederum für 2 Tage bei 29° C schüttelnd inkubiert. Sowohl die Agarplatten als auch die Flüssigkulturen konnten bei 4° C zwei bis drei Wochen aufbewahrt werden. Für eine langfristige Lagerung wurden Glycerinerhaltungskulturen angelegt und diese bei -80° C gelagert.

### 2.2.3.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Für die Transformationen wurden kompetente Zellen der Stämme GV3101 und GV3101+pSoup genutzt (Abschnitt 2.1). Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden diese zu 10 ml YEB-Medium und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rifampicin gegeben und über Nacht bei 29° C und 200 U/min geschüttelt. Dann wurden 2 ml der Kultur in 200 ml YEB-Medium überführt und wiederum bis zu einer optischen Dichte von 0,6–0,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4000 g und 4° C. Anschließend wurde das Sediment in 20 ml TE-Puffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 4 ml YEB-Medium aufgenommen, die Zellsuspension auf 200  $\mu\text{l}$  Aliquots verteilt und diese bei -80° C gelagert.

Für die Transformation mussten die kompetenten Zellen zunächst auf Eis aufgetaut werden. Danach folgte die Zugabe von der zu transformierenden Plasmid-DNA und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um sie dann für 5 Minuten bei 37° C wieder aufzutauen. Nachdem 1 ml LB-Flüssigmedium zum Ansatz pipettiert wurde, inkubierte dieser 4 Stunden bei 29° C im Schüttelinkubator. Das Ausstreichen der Zellen erfolgte auf LB-Medium, welches Rifampicin und Antibiotika entsprechend dem Plasmid enthielt. Die Platten wurden 2 Tage bei 29° C inkubiert.

### 2.2.3.3 Extraktion von Plasmid-DNA

Die Methode der Plasmid-Extraktion aus Agrobakterien entsprach dem Protokoll, welches für *E. coli* verwendet wurde.

## 2.2.4 Arbeiten mit *Solanum tuberosum*

### 2.2.4.1 Kultivierung

**2.2.4.1.1 Sterilanzucht** In der Sterilanzucht wurden die Pflänzchen in Gläsern auf einem Festmedium (entspricht dem Wurzelinduktionsmedium (Abschnitt 2.1)) kultiviert. Nach der Transformation bzw. zur Erhaltung oder Vermehrung wurden die Sprosse geschnitten, mit der Schnittfläche in das Medium gesteckt und das Wurzelwachstum mit Hilfe des Phytohormons Indol-3-Essigsäure induziert. Diese Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in einem Sanyo-Klimaschrank (Modell 350) der Firma Ewald Innovationstechnik GmbH bei 21° C während der 16-stündigen Lichtperiode und 18° C während der 8 Stunden Dunkelheit.

**2.2.4.1.2 Erdanzucht** Die Erdanzucht erfolgte während der Untersuchungen im Gewächshaus in 7,5 l Töpfen auf Einheitserde Typ-VM (Einheitserdewerk Uetersen). Die Erde wurde zunächst einmalig mit 0,2 % Wuxal-Flüssigdünger der Firma Aglukon gestaut, bevor die Pflänzchen aus der Sterilanzucht eingetopft wurden. Diese wurden anschließend für etwa eine Woche mit Plastik-Bechern abgedeckt, um eine optimale Anpassung an die veränderten Wachstumsbedingungen zu ermöglichen. Die Pflanzen wurden dann dem Versuchsprotokoll entsprechend bewässert und bei 16 Stunden Licht und 22° C sowie 8 Stunden Dunkelheit und 20° C und einer Luftfeuchte von 40 % kultiviert.

### 2.2.4.2 Extraktion genomischer DNA

Die Extraktion der genomischen DNA aus *Solanum tuberosum* erfolgte modifiziert nach der Methode von Murray und Thompson (1980). Das Pflanzenmaterial wurde zunächst in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und mit Hilfe der Schwingmühle MM400 (Retsch) homogenisiert. Nach dem Auftauen folgte der Zellaufschluss durch die Zugabe von 500 µl 2x CTAB. Vor und während der 30-minütigen Inkubation bei 68° C wurde durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden 500 µl PCI zugegeben, etwa 1 Minute durch Invertieren gemischt und 10 Minuten in der Biofuge pico (Heareus) bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wässrige Phase beinhaltete die genomische DNA, die in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 VT Isopropanol gemischt und 15 Minuten auf Eis gefällt wurde. Nach anschließender Zentrifugation (15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit) wurde der Überstand verworfen und das Sediment

durch Überschichten mit 200  $\mu$ l 70 %-igem Ethanol und Zentrifugieren (5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit) gewaschen. Danach wurde der Überstand verworfen und das Sediment getrocknet, um es abschließend in 50  $\mu$ l TE-RNase aufzunehmen. Die DNA konnte so bei -20° C gelagert werden.

### 2.2.4.3 RNA-Extraktion

**2.2.4.3.1 Blatt- und Stolonenmaterial** Die RNA-Extraktion aus Blatt- und Stolonenproben erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin® RNA Plant-Kits der Firma Macherey-Nagel nach dem mitgelieferten Protokoll. Die RNA wurde in 40  $\mu$ l Elutionspuffer aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -80° C gelagert.

**2.2.4.3.2 Knollenmaterial** Die RNA-Extraktion aus Knollenproben erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls nach Kumar (2007). Demnach wurden etwa 2 g Knollenmaterial lyophilisiert (Christ loc-1, Alpha1-4)), anschließend auf Eis unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nacheinander wurden dann folgende Lösungen zugegeben:

1	ml	5M NaCl
0,5	ml	10 % SDS
1,65	ml	1,95 % Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
1,75	ml	TBE-Puffer
0,1	ml	$\beta$ -Mercaptoethanol

Nach dem Mischen wurde die Lösung für 5 Minuten bei 65° C inkubiert. Danach wurde die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1800 g zentrifugiert. Es folgte eine DNase-Behandlung des Überstandes durch die Zugabe von 4  $\mu$ l DNase (Fermentas) zur Probe und eine Inkubation für 15 Minuten bei 37° C, um die DNA zu entfernen. Nach der Zugabe von 1 VT Tris-gesättigtem Phenol (pH 7,9) wurde gemischt und wiederum unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Für den Fall, dass diese ausblieb, führte die Zugabe von TBE-Puffer in 1 ml-Schritten zu einer solchen, um dann dem Überstand 1 VT C/I beizufügen und wieder zu zentrifugieren. Zu 1 ml des Überstandes wurden dann 0,9 ml Isopropylalkohol zugegeben und der Ansatz mindestens 1 Stunde oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation und das 4- bis 5-malige Waschen des Sedimentes mit 200  $\mu$ l 70 %-igen Ethanols. Die RNA wurde letztendlich bei 65° C getrocknet und in 70  $\mu$ l DEPC-Wasser aufgenommen, deren Konzentration bestimmt und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.4.4 cDNA-Synthese

Mit Hilfe der cDNA war es möglich, Expressionsanalysen durchzuführen. So diente sie in der RT-PCR als Matrize. Für die cDNA-Synthese wurden 2,5  $\mu$ g der zuvor extrahierten RNA eingesetzt. Dafür wurde zunächst die Konzentration der RNA am Photometer gemessen und die entsprechende Menge in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, um die RNA dann mit Hilfe der Vakuumzentrifuge Con 1000 Speed Vac (Fröbel) einzuengen. Zu diesen 2,5  $\mu$ g RNA wurde anschließend 1  $\mu$ l (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) Oligo-dT-Primer pipettiert, der Ansatz mit sterilem Wasser auf 12  $\mu$ l Gesamtvolumen aufgefüllt und gut gemischt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten



bei 70° C, um die RNA zu denaturieren, wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und kurz anzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 µl 5x Erststrangpuffer und 2 µl 10 mM dNTP-Mix. Nachdem vorsichtig gemischt und der Ansatz 5 Minuten bei 37° C inkubiert wurde, folgte die Zugabe von 1 µl M-MuLV-reverse Transkriptase. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 60 Minuten bei 42° C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation bei 70° C. Abschließend wurde 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit an der Biofuge pico (Hareus) zentrifugiert. So konnte die cDNA bei -20° C gelagert werden, um sie im weiteren Verlauf der Experimente in einer RT-PCR-Reaktion einsetzen zu können. Alle verwendeten Komponenten wurden von der Firma Fermentas bezogen.

#### 2.2.4.5 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und im Mörser auf Eis homogenisiert. Es wurden dann 10 µl NaHSO<sub>3</sub> und Pefablock, 10 µl PMSF und 200 µl EDTA-Tris-HCl zugegeben und mit der Blattprobe vermischt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 4° C und maximaler Geschwindigkeit, um abschließend die im Überstand befindliche Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) zu bestimmen.

#### 2.2.4.6 Transformation von *Solanum tuberosum* mittels *A. tumefaciens*

**2.2.4.6.1 Transformationsprotokoll I** Dieses Transformationsprotokoll entspricht der Methode nach Dietze et al. (1995). Demnach enthalten grundsätzlich alle dafür notwendigen Medien MS-Salze inklusive Vitamine und Glucose als Kohlenhydratquelle. Entsprechend des Protokolls erfolgte zunächst eine Inkubation von Blatt- und Sprosstücken in einer Lösung aus 15 ml 2MS-Flüssigmedium und 50 µl Agrobakterien, die das zu transformierende Konstrukt enthielten. Danach wurde das Pflanzenmaterial erst mit MS-Flüssigmedium, welches Cefotaxim (Antibiotikum gegen das weitere Wachstum der Agrobakterien) enthielt, und dann mit sterilem Wasser abgespült, um sie daraufhin für sieben Tage auf Callusinduktionsmedium (CIM) zu inkubieren. Dieses Medium beinhaltete die Phytohormone Benzylaminopurin und  $\alpha$ -Naphthylessigsäure. Benzylaminopurin ist ein synthetisch hergestelltes Cytokinin, welches in Anwesenheit des synthetischen Auxins  $\alpha$ -Naphthylessigsäure die Zellteilung im pflanzlichen Gewebe anregt. Je nach transformiertem Konstrukt wurde dem Medium neben Cefotaxim das Antibiotikum Kanamycin oder Hygromycin zugesetzt, um die transgenen Calli zu selektieren. Nach sieben Tagen folgte das Umsetzen der Calli auf Sprossinduktionsmedium (SIM), das dem CIM ähnlich ist, statt des Benzylaminopurins jedoch Zeatinribosid als natürliches Cytokinin und Gibberellinsäure zur Sprossinduktion und Förderung des Streckungswachstums des Sprosses enthielt. Die Calli wurden dann im Abstand von sieben bis zehn Tagen auf neues SIM umgesetzt und die entstandenen Sprosse geschnitten, um sie anschließend auf Wurzelinduktionsmedium (RIM) zu kultivieren. Dieses Medium bestand ausschließlich aus MS-Medium mit Glukose und den genannten Antibiotika ohne weitere Phytohormone und wurde ebenso für die Erhaltung der transgenen Pflänzchen genutzt.

**2.2.4.6.2 Optimiertes Transformationsprotokoll II** Diesem Protokoll liegt das Transformationsprotokoll I zugrunde, dass u.a. nach der Methode von Beaujean et al. (1998) verschiedene Modifikationen enthielt. Zum einen wurden hauptsächlich Sprosstücke von steril angezogenen Kartoffelpflänzchen für die Transformation verwendet, da aus diesen Explantaten in wiederholten

Versuchen mehr Sprosse regeneriert werden konnten als aus Blattstücken. Zum anderen wurde der Agrobakteriensuspension Acetosyringon zugesetzt. Acetosyringon ist eine Substanz, die von verwundetem Pflanzengewebe abgegeben wird und die Synthese von Virulenzgenen des Agrobakteriums induziert (Bundock et al., 1995). Außerdem wurde dem Wurzelinduktionsmedium Indol-3-Essigsäure beigelegt, welches als natürliches Auxin das Wurzelwachstum stimuliert.

### 2.2.4.7 Entfernen von Mikroorganismen aus *in vitro*-Pflanzenmaterial

Die Durchführung dieser Maßnahme wurde von der Firma NORIKA (Nordring-Kartoffelzucht- und Vermehrungs-GmbH, Groß Lüsewitz) übernommen. Sprosssegmente, die mindestens eine Blattachsel besitzen, wurden für maximal 8 Minuten in einer 50 %-igen PPM<sup>TM</sup> (Plant Preservative Mixture, Politakis)-Lösung inkubiert und danach auf MS-Medium mit Phytigel (Agar-Ersatz) inklusive 45 mg/l Gentamycin gesetzt. Nach etwa 20 Tagen erfolgte das Umsetzen der Sprosse auf MS-Medium mit Agar ohne Antibiotikum. Außerdem wurde zum gleichen Zeitpunkt ein Bakterientest durchgeführt, bei dem ein Blattstück je Spross 1 Woche in Nährbouillon (Fluka) inkubierte, um die Abwesenheit von Bakterien zu überprüfen, die ansonsten zu Kontaminationen in der Sterilkultur führen könnten.

### 2.2.4.8 X-Gluc-Färbung

Mit Hilfe dieser Färbemethode ist es möglich, die Enzymaktivität und damit auch Expression des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens nachzuweisen. Dieses Enzym nutzt X-Gluc (Cyclohexylammoniumsalz) als Substrat und spaltet dieses, sodass u.a. das blaue 4-Chlor-3-Brom-Indigo entsteht. Solche Reportergene wie das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen werden z.B. für Promotoranalysen genutzt. Um eine Blaufärbung in transgenen Kartoffelpflanzen nachzuweisen, wurden zu untersuchende Blatt- und Knollenstücke in X-Gluc-Puffer über Nacht inkubiert, der über Vakuuminfiltration in einem Exikator gleichmäßig in das Pflanzenmaterial aufgenommen wurde. Die Proben wurden anschließend so lange mit 70 %-igem Ethanol bei 70° C entfärbt bis keine Grünfärbung der Blätter mehr zu erkennen war. Die Proben konnten dann bei Bedarf in 70 %-igem Ethanol im Kühlschrank gelagert werden.

### 2.2.4.9 Extraktion niedermolekularer Substanzen

Für die GG-Extraktion wurden etwa 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Hilfe der Schwingmühle MM400 (Retsch) homogenisiert. Das Pulver wurde anschließend in 1 ml Ethanol-Standard-Gemisch aufgenommen, dass in 80 %-igem Ethanol 50  $\mu$ g Sorbitol als Standard für die spätere gaschromatografische Auswertung enthielt. Es folgte die Inkubation des Gemisches für 2 Stunden bei 68° C, um die niedermolekularen Substanzen zu extrahieren. Nach dem Abkühlen der Proben wurden diese 10 Minuten bei 20000 U/min und 4° C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Sediment in 500  $\mu$ l 80 %-igem Ethanol aufgenommen und wiederum bei 68° C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Proben ein weiteres Mal zentrifugiert und der Überstand mit dem aus der ersten Extraktion vereinigt. Nach dem Entfernen des Ethanols mit Hilfe der Vakuumzentrifuge (Speed Vac Con-1000) erfolgte das Lösen des Sedimentes in 500  $\mu$ l Aqua dest. mittels Ultraschallbad (5 x 30 Sekunden) oder Schüttler (30 Minuten) und eine Zentrifugation bei 20000 U/min für 10 Minuten, um den Überstand danach wieder in der Vakuumzentrifuge einzuengen. Das trockene Sediment konnte so bis zur Derivatisierung bei 4° C gelagert werden.

#### 2.2.4.10 Derivatisierung der Proben für die Gaschromatografie

Bei der Gaschromatografie wird ein Substanzgemisch nach seinen einzelnen Komponenten aufgetrennt, indem es durch eine Säule mit Hilfe eines Trägergases über eine stationäre Phase geleitet wird. Die einzelnen Komponenten treten mit dieser in Wechselwirkung, wodurch ihr Transport und somit der Austritt aus der Säule abhängig von der Substanz um einen bestimmten Zeitraum (Retentionszeit) verzögert wird. Anhand der Retentionszeiten können anschließend die Substanzen des Gemisches und deren Anteil bestimmt werden. Für die Gaschromatografie ist es notwendig, dass die zu untersuchenden Substanzen flüchtig sind. Da die in dieser Arbeit zuvor extrahierten niedermolekularen Substanzen (Kohlenhydrate und deren Derivate) das nicht sind, mussten diese zunächst derivatisiert werden. Die Derivatisierung bedeutete für unsere Untersuchungen den Austausch von Wasserstoffatomen aus Hydroxygruppen gegen eine Trimethylsilyl (TMS)-Gruppe, wobei ein sogenanntes TMS-Derivat entsteht, welches flüchtig ist und über das Trägergas transportiert werden kann. Die Silylierung erfolgte im Lösungsmittel Pyridin, welches zunächst in einem 65  $\mu$ l-Gemisch mit Methoxylamin (20 mg Methoxylamin/ ml Pyridin) zum getrockneten Sediment aus niedermolekularen Substanzen gegeben wurde, um diese darin aufzunehmen. Dafür wurden die Proben 90 Minuten bei 30° C schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 35  $\mu$ l MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid), dem Silylierungsmittel. Die Proben wurde gemischt und 1 Stunde bei 60° C inkubiert. Danach wurden diese bei 20000 U/min zentrifugiert und 70  $\mu$ l des Überstandes für die GC-Analyse genutzt. Die gaschromatografischen Untersuchungen wurden an dem GC Focus der Firma Thermo Scientific mit FID-Detektor und Auto Sampler AS 3000 durchgeführt. Als Trägergas wurde Stickstoff und als Säulenmaterial 5 % Phenyl-Polysilphenylen-Siloxan (Thermo Scientific) verwendet.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung von Plasmid-Konstrukten

In Vorbereitung auf die vorliegende Arbeit wurden Konstrukte entwickelt, die zum einen das *gppPS*-Gen aus *A. vinelandii* (pLH-AF) (Klähn et al., 2009), zum anderen aus *S. rhizophila* mit (pG0029-SF) bzw. ohne (pG0029-TP-SF) fusionierter chloroplastidärer Transitpeptidsequenz tragen (siehe Abschnitt 2.1). Mit diesen Plasmiden ist es möglich, transgene Pflanzen zu erzeugen, in denen die GG-Synthese entweder im Chloroplasten oder im Cytosol der pflanzlichen Zelle stattfindet. Die Expression des *gppPS*-Gens wird dabei vom 35S-Promotor kontrolliert. Nach der Transformation dieser Konstrukte in die Kartoffelsorten Albatros und Terrana standen zu Beginn der Untersuchungen 675 Albatros- und Terrana-Regenerate zur Verfügung, die durch Anzucht auf Kanamycin-haltigem Medium vorselektiert wurden. In keinem der überprüften Terrana-Regenerate konnte mittels GC-Analyse GG bzw. das *gppPS*-Transgen mittels PCR nachgewiesen werden. Dagegen wurden 15 Albatros-Regenerate anhand dieser beiden Nachweismethoden selektiert werden, die das pLH-AF-Konstrukt enthielten (siehe Abschnitt 3.3).

Da bekannt ist, dass es eine sortenspezifische Abhängigkeit der Transformierbarkeit von Kartoffelpflanzen gibt (Dale u. Hampson, 1995), wurde zusätzlich zu Albatros und Terrana die Sorte Pelikan in eine zweite Transformation einbezogen. Auch in diesem Fall konnten während der Vorselektion auf Kanamycin für alle Sorten und Konstrukte Pflanzen regeneriert werden, die, mit Ausnahme von Albatros-Regeneraten, kein GG nach der GC-Analyse aufwiesen.

#### 3.1.1 35S-Promotor-Konstrukte mit alternativem Markergen

Um die Vorselektion der Pflanzen zu optimieren und das Auftreten von falschpositiven Regeneraten zu verringern, wurden neue Konstrukte mit einem weiteren Vektor aus der pGreen-Serie hergestellt, der ein alternatives Markergen zum *nptII*-Gen beinhaltet. So besitzt pGreenII0229 ein BASTA<sup>®</sup>-Resistenzgen, welches in Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana* erfolgreich zur Selektion transgener Pflanzen verwendet wird. Die *gppPS*-Gene aus pLH-AF, pG0029-SF und pG0029-TP-SF wurden inklusive der pflanzlichen Regulationssequenzen über das Restriktionsenzym *KpnI* aus den ursprünglichen Vektoren in pGreenII0229 umkloniert und mit pGII0229-AF, -SF bzw. -TP-SF bezeichnet (Abb. 3.1).

Außerdem konnte ein optimiertes Transformationsprotokoll entwickelt werden, welches unter Abschnitt 3.2 ausführlich beschrieben wird. Trotz des alternativen Vektors und des neuen Protokolls war es mit keinem der neuen Konstrukte möglich, transgene Linien der Sorten Terrana und Pelikan zu erzeugen, wogegen sich die Sorte Albatros wiederum erfolgreich transformieren lies. Eine Zusammenfassung der Transformationsergebnisse aller 35S-Promotor-Konstrukte mit Kanamycin- bzw. BASTA<sup>®</sup>-Resistenzgen in die drei Kartoffelsorten Albatros, Terrana und Pelikan, die anhand des Transformationsprotokolls I (2.2) erzielt wurden, ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.

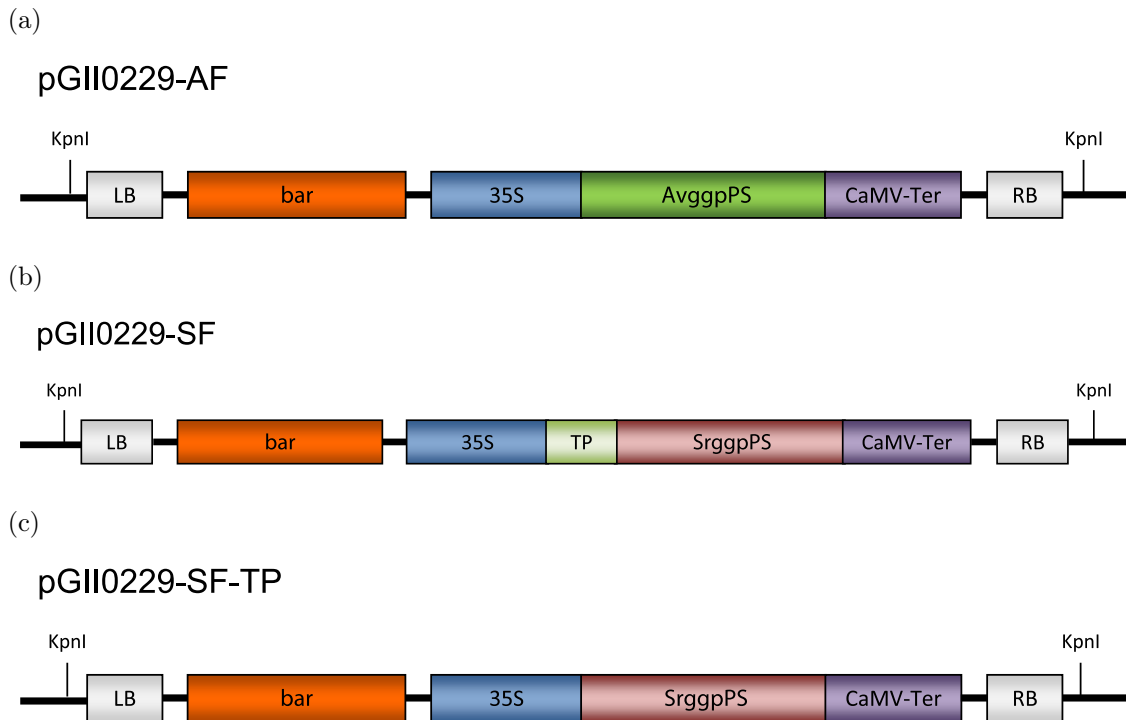


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der T-DNA-Region der 35S-Konstrukte. Das *ggpPS*-Gen aus (a) *A. vinelandii* und (b) *S. rhizophila* mit und (c) ohne chloroplastidäres Transitpeptid unterliegt der Kontrolle des 35S-Promotors im Vektor pGreenII0229. LB und RB: left und right border der T-DNA; bar: BASTA<sup>®</sup>-Resistenzgen; 35S: 35S-Promotor aus CaMV; TP: chloroplastidäres Transitpeptid; AvggpPS: *ggpPS* aus *A. vinelandii*; SrggpPS: *ggpPS* aus *S. rhizophila*; CaMV-Ter: 35S-Terminator aus CaMV; KpnI: Restriktionsschnittstelle des Enzyms *KpnI* für die Umklonierung.

### 3.1.2 B33-Promotor-Konstrukte

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Erzeugung transgener Kartoffellinien, die eine hohe GG-Akkumulation in den Knollen aufweisen, um den Naturstoff GG kostengünstig für die Industrie herzustellen. Da die mit dem pLH-AF-Konstrukt erzeugten Linien kein GG in den Knollen akkumulierten, wurden Konstrukte hergestellt, in denen das *ggpPS*-Gen unter der Kontrolle des knollenspezifischen B33-Promotors aus *S. tuberosum* vorliegt (Abb. 3.2).

Mittels PCR wurden über die Primerkombination AFggpPS-HpaI-3'/5' *HpaI*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende der *ggpPS*-Gensequenz aus *A. vinelandii* angefügt und das PCR-Produkt in den pGEM-T-Vektor kloniert. Mit *HpaI* konnte das *ggpPS*-Gen dann aus dem Vektor herausgeschnitten werden und zwischen den 35S-Promotor und -Terminator der 35S-CaMV cassette aus der pGreen-Serie (pG35S, siehe Abschnitt 2.1), über die *SmaI*-Schnittstelle kloniert werden. Dieses Konstrukt wurde anschließend mit *HindIII* und *BamHI* behandelt, um die Fusion mit dem B33-Promotor zu ermöglichen. Zuvor erfolgte das Umklonieren des B33-Promotors aus dem pB33-Hyg 2-Plasmid (siehe Abschnitt 2.1) über *EcoRI* und *SmaI* in den pGreenII0229-Vektor, aus dem er durch anschließende Restriktion mit *HindIII* und *BamHI* erhalten wurde. Letztlich wurde die Sequenz aus B33-Promotor, *ggpPS*-Gen und dem 35S-Terminator über *EcoRV* in die Vektoren pGreen0029 und pGreenII0229 eingefügt.

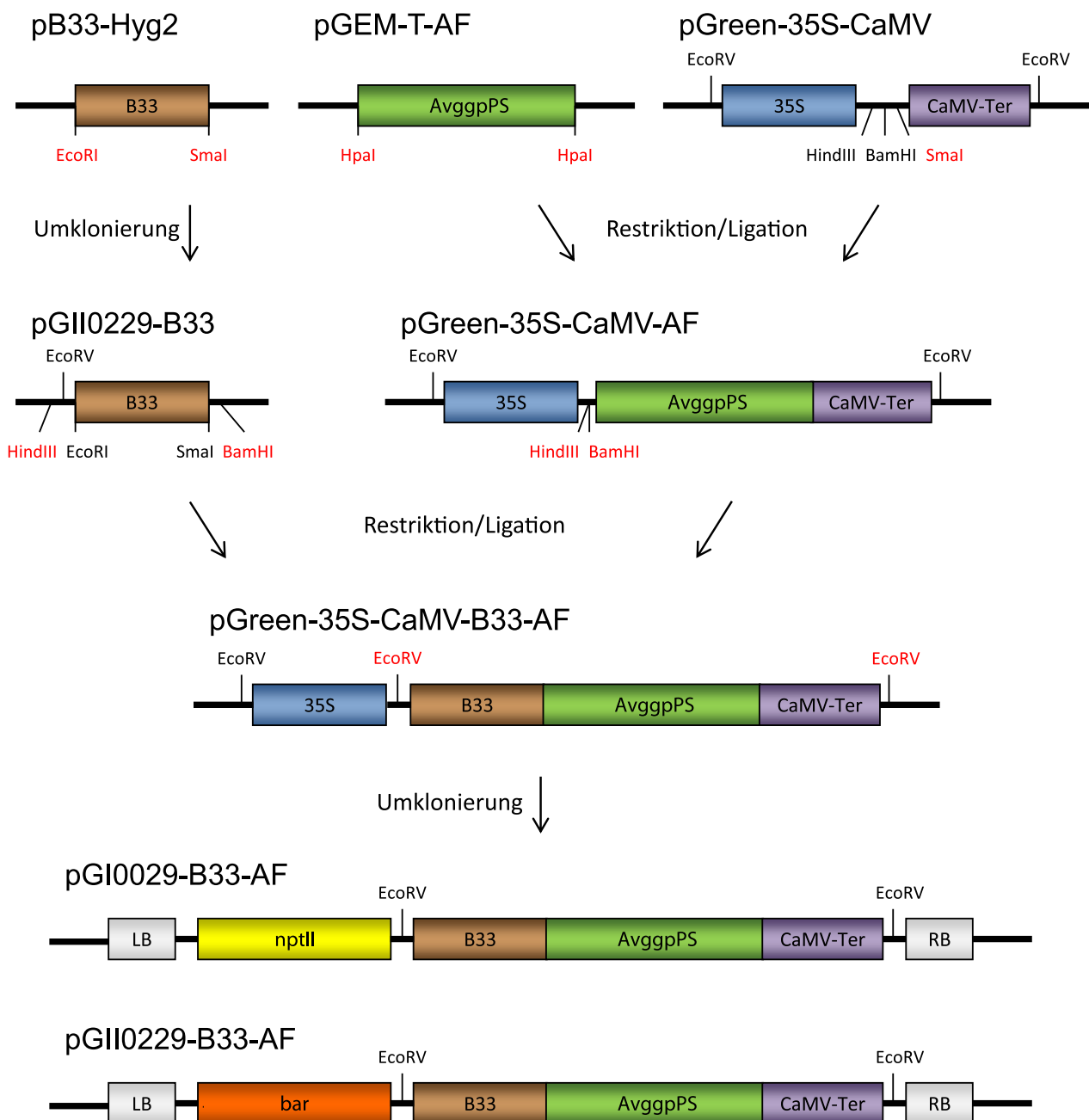


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die T-DNA-Region der B33-Konstrukte. Das *ggpPS*-Gen unterliegt der Kontrolle des B33-Promotors in den Vektoren pGreen0029 bzw. pGreenII0229. B33: B33-Promotor; *AvggpPS*: *ggpPS* aus *A. vinelandii*; 35S: 35S-Promotor aus CaMV; CaMV-Ter: 35S-Terminator aus CaMV; *nptII*: *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen; *bar*: BASTA®-Resistenzgen; LB und RB: left und right border der T-DNA; *EcoRI*, *SmaI*, *HpaI*, *HindIII*, *BamHI*, *EcoRV*: Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme.

Kartoffelsorte	Konstrukt	Anzahl der Transformationen	Anzahl der untersuchten Sprosse	Anzahl der GG-bildenden Pflanzen
Albatros	pLH-AF	1	138	15
	pG0029-SF	1	0	0
	pG0029-SF-TP	1	0	0
Terrana	pLH-AF	2	154	0
	pG0029-SF	2	243	0
	pG0029-SF-TP	2	174	0
	pGII0229-SF	1	1	0
	pGII0229-SF-TP	1	12	0
	pGII0229-AF	1	1	0
Pelikan	pLH-AF	2	37	0
	pG0029-SF	1	59	0
	pG0029-SF-TP	2	41	0
	pGII0229-SF	1	19	0
	pGII0229-SF-TP	1	80	0
	pGII0229-AF	1	36	0

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Transformationsereignisse der Konstrukte pLH-AF, pG0029-SF und pG0029-SF-TP in die Kartoffelsorten Albatros, Terrana und Pelikan, die anhand des Transformationsprotokolls I (siehe Abschnitt 2.2) erreicht wurden.

### 3.1.3 rd29A-Promotor-Konstrukte

Um neben der konstitutiven (35S-Promotor) und der knollenspezifischen (B33-Promotor) Expression eine stressinduzierbare Expression des *gppPS*-Gens in transgenen Kartoffelpflanzen zu erreichen, wurde *gppPS* unter die Kontrolle des rd29A-Promotors aus *A. thaliana* kloniert.

Für die Amplifikation des rd29A-Promotors mittels PCR wurden die in Zhang et al. (2005) beschriebenen Primer verwendet und so modifiziert, dass ein PCR-Fragment mit einer 5'-*Hind*III- und einer 3'-*Bam*HI-Schnittstelle entstand. Dieses rd29A-Fragment wurde gegen den B33-Promotor in der 35S-CaMV-cassette ausgetauscht, so dass nun der rd29A-Promotor vor dem *gppPS*-Gen und dem 35S-Terminator vorliegt. Es folgte eine Restriktion mit *Hind*III und *Eco*RV, um das Fragment aus rd29A-Promotor, *gppPS*-Gen und Terminator zu erhalten, welches anschließend über diese beiden Schnittstellen zum einen mit dem pGreenII0229-Vektor ligiert wurde. Mittels *Kpn*I und *Xba*I wurde dieses Fragment zum anderen in den Vektor pCambia1305.1 eingefügt, um eine Vergleichbarkeit mit dem folgenden Konstrukt zu gewährleisten (Abb. 3.3).

Um zusätzlich die Funktionalität des Promotors in den Kartoffelknollen überprüfen zu können, wurde außerdem ein rd29A-GUS-Konstrukt erzeugt, indem das rd29A-Fragment mit Hilfe der oben genannten Primer ohne Modifikation amplifiziert und zunächst mit dem pGEM-T-Vektor ligiert wurde. Es folgte eine Kontrolle der Orientierung des Fragmentes im Vektor, um den rd29A-Promotor zum Schluss über *Sac*I am 3'-Ende und *Nco*I am 5'-Ende in den Vektor pCambia1305.1 vor das  $\beta$ -*Glucoronidase*-Gen zu klonieren (Abb. 3.4).



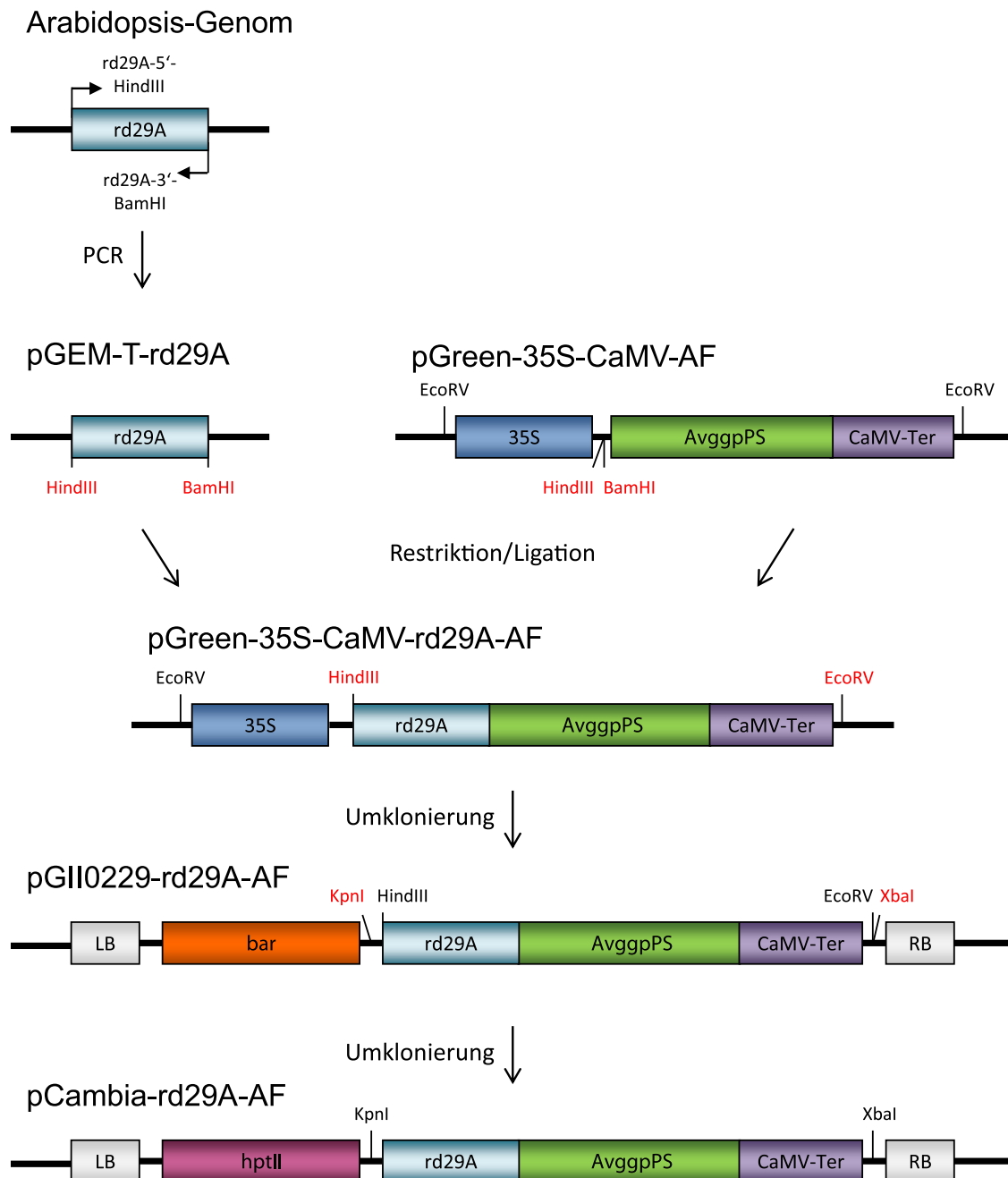


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die T-DNA-Regionen der rd29A-AF-Konstrukte. Das *ggpPS*-Gen unterliegt der Kontrolle des rd29A-Promotors im Vektor pCambia1305.1. rd29A: rd29A-Promotor; ggpPS: *ggpPS*-Gen aus *A. vinelandii*; 35S: 35SPromotor aus CaMV; CaMV-Ter: 35S-Terminator aus CaMV; LB und RB: left und right border der T-DNA; bar: BASTA®-Resistenzgen; hptII: *Hygromycin-Phosphotransferase*-Gen; rd29A-5'-HindIII, rd29A-3'-BamHI: Primerkombination zur Amplifikation des rd29A-Promotors inklusive zusätzlicher Schnittstellen; HindIII, BamHI, EcoRV, KpnI, XbaI: Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme.

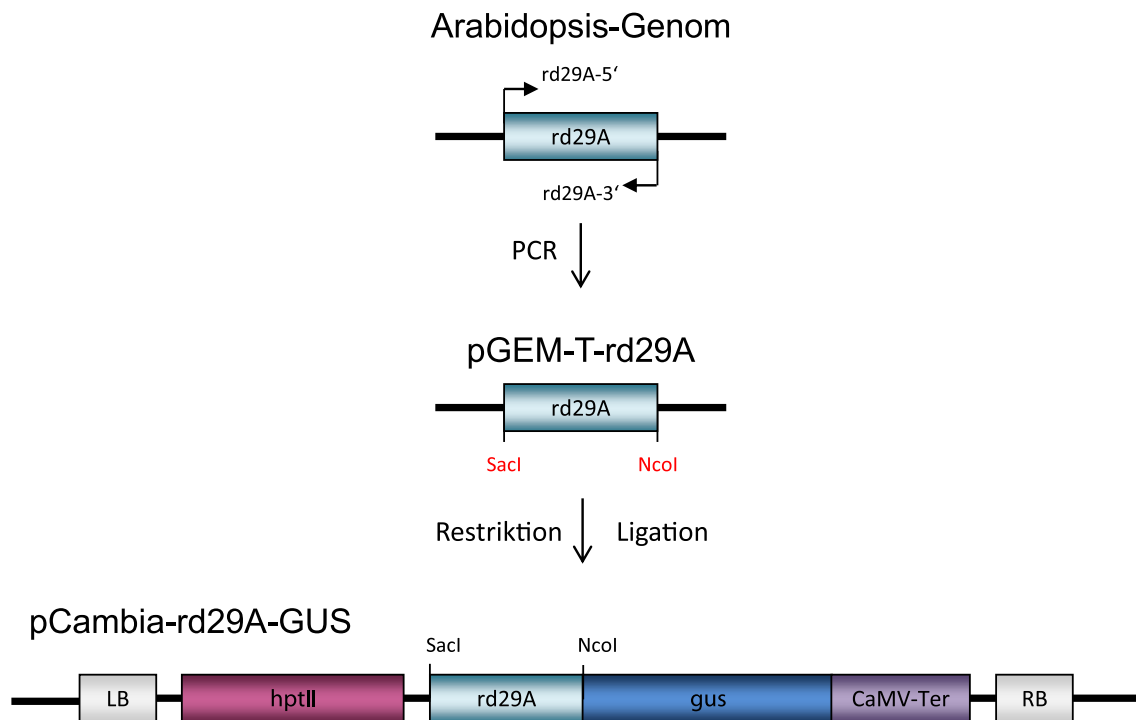


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die T-DNA-Region des rd29A-GUS-Konstruktes. Das  $\beta$ -Glucoronidase-Gen unterliegt der Kontrolle des rd29A-Promotors im Vektor pCambia1305.1. rd29A: rd29A-Promotor; gus:  $\beta$ -Glucoronidase-Gen; 35S: 35S-Promotor aus CaMV; CaMV-Ter: 35S-Terminator aus CaMV; LB und RB: left und right border der T-DNA; hptII: Hygromycin-Phosphotransferase-Gen; rd29A-5', rd29A-3': Primerkombination zur Amplifikation des rd29A-Promotors; SacI, NcoI: Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme.

### 3.2 Optimierung des Transformationsprotokolls für die Kartoffelsorte Albatros

Zusätzlich zur Erzeugung alternativer Konstrukte wurde an der Optimierung des Transformationsprotokolls für die Kartoffelsorte Albatros gearbeitet. Anfangs wurden Transformationen der 35S-Konstrukte (siehe Tabelle 3.1) nach dem Protokoll von Dietze et al. (1995) durchgeführt.

Da die ersten beiden Transformationen nur eine geringe Effizienz zeigten, wurden verschiedene Modifikationen des Transformationsprotokolls nach Beaujean et al. (1998) bezüglich der verwendeten Pflanzenexplantate und der Medienzusätze getestet. Diese Untersuchungen resultierten in einem optimierten Protokoll (Abb. 3.5), nach dem zunächst statt der Blattstücke hauptsächlich Sprossstücke verwendet wurden, da sich in mehreren Transformationsversuchen nach dem Transformationsprotokoll I zeigte, dass sich aus Sprossstücken eine größere Anzahl an Sprossen regenerieren ließ als aus Blattstücken. Diese hatten durch die Flexibilität oftmals nicht über die gesamte Oberfläche Kontakt mit dem Induktionsmedium, wodurch sich die Callusbildung auf kleine Bereiche des Explantates beschränkte und der Rest des Blattstückes abstarb. Bei den Sprossstücken war dagegen über die gesamte Oberfläche die Bildung von Callusgewebe zu beobachten. Die Inkubation der Sprossstücke erfolgte in MS-Flüssigmedium und Agrobakterien mit

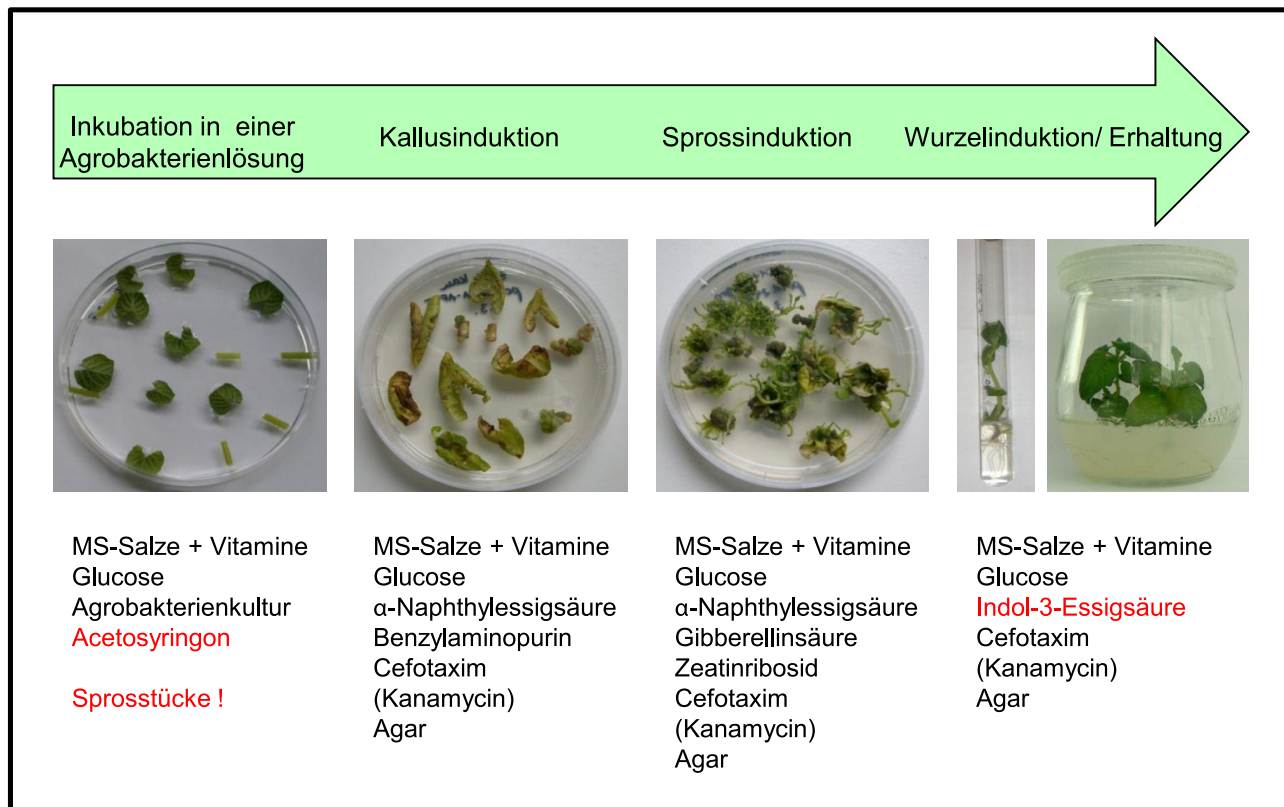


Abbildung 3.5: Darstellung des optimierten Transformationsprotokolls; modifiziert nach Beaulieu et al. (1998).

Acetosyringonzusatz. Acetosyringon ist ein Phenolderivat, das von verwundeten Pflanzenzellen produziert wird und als Signalsubstanz die Expression der *vir*-Gene auf dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens* induziert. Außerdem wurde dem Wurzelinduktionsmedium nun zusätzlich das Phytohormon Indol-3-essigsäure beigelegt, welches als natürliches Auxin das Wurzelwachstum stimuliert. Die Anwendung des optimierten Protokolls (siehe Abschnitt 2.2) führte zu deutlich mehr transgenen Regeneraten als die ursprüngliche Methode und war damit sehr erfolgreich.

Ein Beispiel dafür ist die Transformation der Sorte Albatros mit dem Konstrukt pGII0229-B33-AF. Nach der Transformation wurden alle regenerierten Pflänzchen ohne Vorselektion auf Erde umgesetzt und zwei Wochen unter Kontrollbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Pflänzchen mit einer 0,1 %-igen BASTA®-Lösung besprüht. Drei bis vier Tage nach der Behandlung zeigten zunächst alle Pflanzen Welkesymptome, wobei sich die vermutlich transgenen Pflanzen anschließend wieder erholten und die Wildtypen abstarben (Abb. 3.6). Auf diese Weise wurden aus 225 angezogenen Regeneraten 45 Pflanzen selektiert. In 35 dieser Linien war mittels PCR das *gppPS*-Gen aus *A. vinelandii* nachweisbar. Das entspricht einer Transformationsrate von 15,6 % und einer Selektionsrate von 80 %. Dabei ist die Transformationsrate das Verhältnis von der Anzahl der transgenen zur Anzahl aller getesteten regenerierten Pflanzen. Dagegen ist die Selektionsrate das Verhältnis von transgenen Pflanzen zu den BASTA®-selektierten Regeneraten.



Abbildung 3.6: Selektion von regenerierten Pflänzchen nach der Transformation des pGII0229-B33-AF-Konstruktes in Albatros. Drei Wochen nach der Behandlung mit BASTA® sind die sensitiven Regenerate abgestorben, die resistenten Pflanzen zeigen keine Beeinträchtigung des Wachstums. Rote Pfeile markieren Wildtyp-Pflanzen, die als Negativ-Kontrolle mitgeführt wurden.

Kartoffelsorte	Konstrukt	Anzahl der Transformationen	Anzahl der untersuchten Sprosse	Anzahl der GG-bildenden Pflanzen
Albatros	pLH-AF	1	40	21
	pG0029-B33-AF	1	22	8
	pGII0229-B33-AF	1	225	35
	pGII0179-B33-AF	0	0	0
	pGII0229-rd29A-AF	1	0	0
	pCambia-rd29A-AF	1	23	17
	pCambia-rd29A-GUS	1	12	6

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Transformationsereignisse des pLH-AF-Konstruktes und der B33- sowie rd29A-Promotor-Konstrukte in die Kartoffelsorte Albatros, die anhand des optimierten Transformationsprotokolls II (Abschnitt 2.2) erreicht wurden.

In Tabelle 3.2 sind alle nach dem optimierten Transformationsprotokoll II durchgeführten durchgeführten Transformationen zusammengefasst. Nach der Transformation der einzelnen Konstrukte in die verschiedenen Kartoffelsorten wurden die daraus entstandenen Regenerate zunächst bezüglich ihrer GG-Akkumulation analysiert. Erst danach wurde in GG-akkumulierenden Pflanzen mittels PCR das Vorhandensein des *gppPS*-Gens bestätigt. Pflanzen mit einer eventuellen GG-Akkumulation unterhalb der Nachweisgrenze wurden sofort verworfen, da sie für diese Arbeit nicht von Nutzen gewesen wären. Trotz wiederholter Transformationsversuche konnte in keinem der untersuchten Regenerate der Kartoffelsorten Terrana und Pelikan GG nachgewiesen werden. Mit sehr hoher Effizienz wurden ausschließlich transgene Linien der Sorte Albatros (Alba) mit pLH-AF, allen B33- und rd29A-Konstrukten selektiert. In einem Gewächshausversuch (Daten nicht gezeigt) konnte in keiner der Alba-B33-Linien GG nachgewiesen werden, so dass diese Linien von weiteren Versuchen ausgeschlossen wurden und der Fokus der Untersuchungen auf den Alba-AF- (pLH-AF) und Alba-rd29A-AF- (pCambia-rd29A-AF) Linien lag.

### 3.3 Expression des *gppPS*-Gens unter der Kontrolle des 35S-Promotors

Ausgehend von den Voruntersuchungen am Modellorganismus *A. thaliana* (Klähn et al., 2009) wurde für diese Untersuchungen ebenfalls das pLH-AF-Konstrukt verwendet, welches das *gppPS*-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors beinhaltet (siehe Abschnitt 2.1). Vor den eigenen Arbeiten wurde bereits eine erste Transformation dieses Konstruktes in die Kartoffelsorten Albatros und Terrana durch Dr. Stephan Klähn nach dem Transformationsprotokoll I (siehe Abschnitt 2.2) vorgenommen.

#### 3.3.1 Selektion der transgenen Linien

Vermutlich transgene Linien wurden durch Anzucht der regenerierten Pflanzen auf Kanamycin-haltigem Medium vorselektiert. Die weitere Selektion der transgenen Linien erfolgte zum einen mit Hilfe der Gaschromatografie und zum anderen über den Nachweis des *gppPS*-Gens durch PCR.

Für die gaschromatografische Analyse wurden Blattproben der *in vitro*-Pflänzchen untersucht. Das Chromatogramm in Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis einer gaschromatografischen Analyse am Beispiel einer transgenen Linie im Vergleich zum Wildtyp und einer reinen GG-Probe, die einen deutlichen Peak bei einer Retentionszeit von 10,3 min zeigt.

Auf diese Weise konnten 15 transgene Kartoffellinien der Sorte Albatros mit durch PCR nachweisbarem pLH-AF-Konstrukt und detektierbarer GG-Akkumulation von 0,016 - 0,79  $\mu\text{mol/g}$  Frischmasse (FM) selektiert werden, die die Bezeichnungen Alba-AF1 bis Alba-AF15 erhielten (Abb. 3.8a).

Diese GG-Mengen in den Alba-AF-Linien lagen bereits deutlich über den Werten, die mittels Transformation des *gppS*-Gens aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* in die Kartoffelsorte Désirée in den Vorversuchen erzielt wurden (siehe Abschnitt 1.4).

Die Kultivierung der Albatros-Regenrate erfolgte auf Saccharose-haltigem MS-Medium. Die Vorversuche mit *A. thaliana* hatten jedoch gezeigt, dass die GG-Akkumulation durch Saccharose im MS-Medium vermindert wird. Dieser Zusammenhang könnte auch bei Kartoffelpflanzen gegeben sein. Aus diesem Grund wurden jeweils drei Pflanzen aller transgenen Alba-AF-Linien auf Erde umgesetzt, um zu einem späteren Entwicklungsstadium eine weitere gaschromatografische Analyse eines jungen und eines alten Blattes jeder Pflanze durchzuführen. Die Änderung der Anzuchtbedingungen führte mit bis zu 5,5  $\mu\text{mol GG/g FM}$  im jungen Blatt von Einzelpflanzen zu einer etwa siebenfachen Steigerung der GG-Gehalte im Vergleich zur *in vitro*-Kultivierung (Abb. 3.8b). Dabei fiel auf, dass in den hier untersuchten Albatros-Linien eine höhere GG-Akkumulation in den jungen Blättern im Vergleich zu den alten Blättern nachweisbar war. Diese stark schwankenden GG-Gehalte in verschiedenen alten Blättern einer Linie erklären die Standardabweichungen der Mittelwerte.

Um die Auswirkung der GG-Akkumulation auf das Wachstum und die Stresstoleranz von Kartoffeln untersuchen zu können, wurden vier transgene Linien für weitere Versuche ausgewählt. Es wurden drei Linien selektiert, die in den Vorversuchen eine hohe GG-Akkumulation aufwiesen (Alba-AF1, -8 bzw. -9) und eine Linie mit schwacher (Alba-AF11) GG-Synthese. In diesen vier Linien konnten im Mittelwert GG-Mengen von 0,5 - 2,71  $\mu\text{mol/g FM}$  detektiert werden. Der Transgennachweis wurde mittels PCR mit den Primerkombinationen AF-PCR S/A für das *gppPS*-Gen und Kan S/A für das *nptII*-Gen geführt (Abb. 3.9).

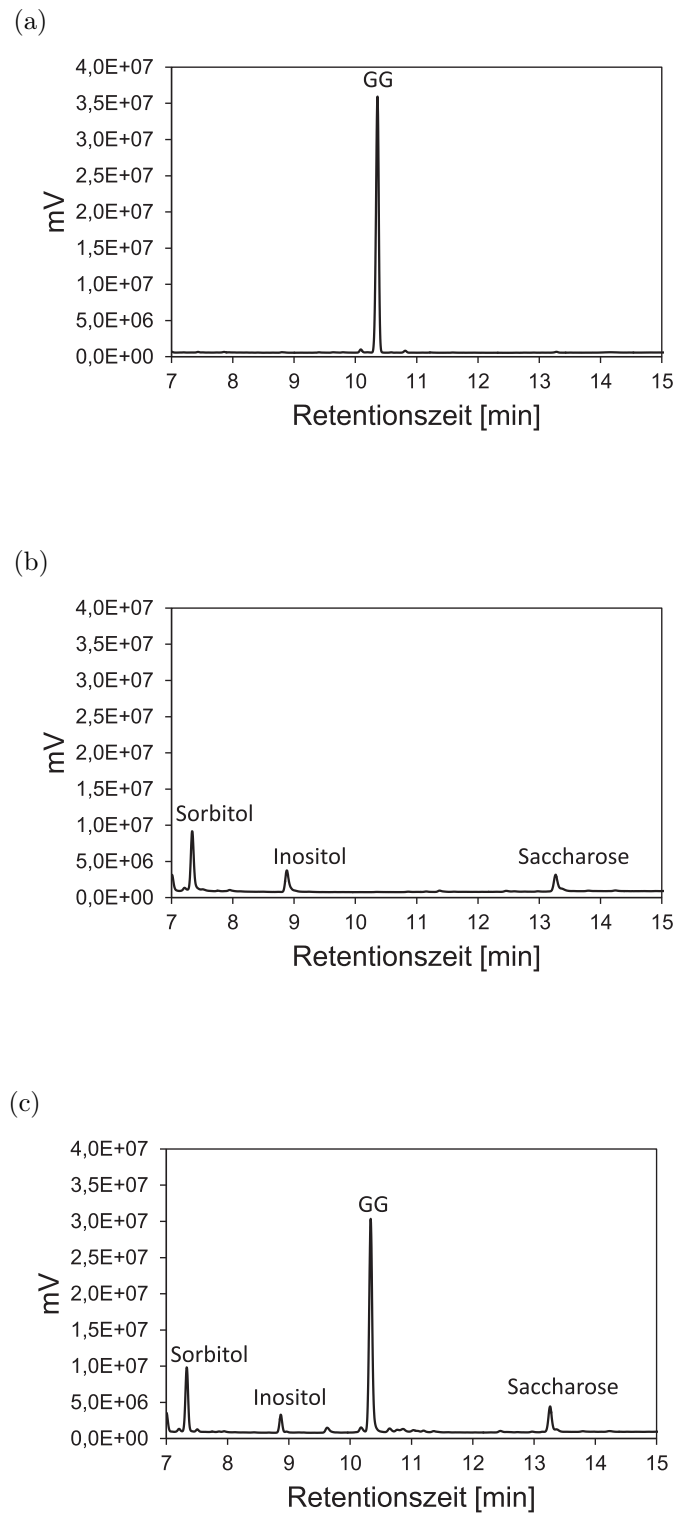


Abbildung 3.7: Gaschromatografie als Methode zum Nachweis von GG in transgenen Pflanzenextrakten. Ausschnitt aus dem Chromatogramm (a) einer reinen GG-Probe; des Blattextraktes einer (b) Albatros-Wildtyppflanze und (c) transgenen Pflanze der Linie Alba-AF1. Die Retentionszeit von GG liegt bei 10,3 min. Sorbitol wurde als interner Standard zugesetzt.

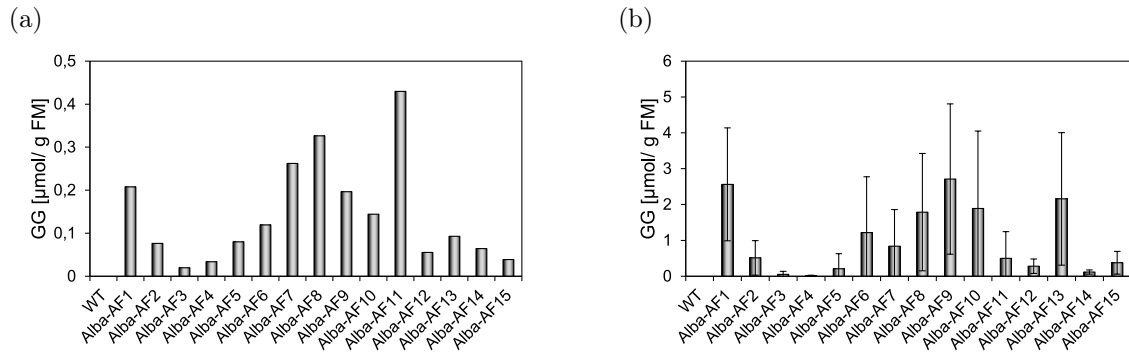


Abbildung 3.8: GG-Gehalte in Blättern der 15 transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die Proben stammten von (a) steril angezogenen Pflanzen auf Saccharose-haltigem MS-Medium bzw. (b) auf Erde angezogenen Pflanzen.

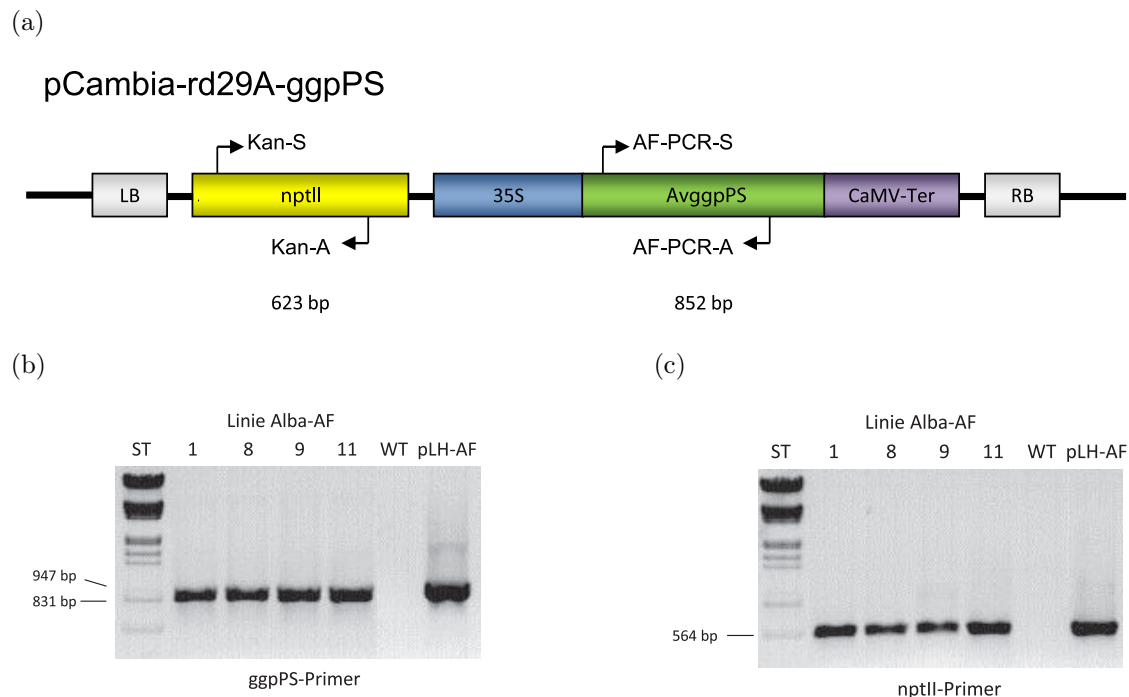


Abbildung 3.9: Untersuchung des Genotyps der transgenen Alba-AF-Linien durch Transgen-nachweis mittels PCR. (a) Schematische Darstellung der Primerbindestellen innerhalb des pLH-AF-Konstruktes; (c) Nachweis des *gppPS*-Gens mit der Primerkombination AF-PCR S/A und (b) des *nptII*-Gens mit der Primerkombination Kan S/A in den Linien Alba-AF1, 8, 9 und 11. Die Albatros Wildtyplinie und das transformierte Plasmid pLH-AF dienen als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle.

### 3.3.2 Stressversuche im Gewächshaus

In vier unabhängigen Gewächshausversuchen wurden Pflanzen der transgenen Linien Alba-AF1, Alba-AF8, Alba-AF9 und Alba-AF11 im Vergleich zum Albatros-Wildtyp unter Kontroll-, Salz- und Trockenstressbedingungen kultiviert und bezüglich des Sprosswachstums, Knollenertrages und der GG-Akkumulation untersucht. Für jede der Kultivierungsbedingungen wurden 5 bzw. 10 Einzelpflanzen pro transgener Linie auf Erde umgesetzt, nachdem sie *in vitro* bis zu einer Größe von etwa 10 cm angezogen wurden. Danach wurden sie bei 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit im Gewächshaus kultiviert. Die Anordnung der Pflanzen erfolgte nach einem zuvor aufgestellten Randomisierungsplan, um Positionseffekte auszuschließen.

#### 3.3.2.1 Ablauf der Stressversuche

In Abbildung 3.10 ist der Verlauf eines der durchgeführten Gewächshausversuche beispielhaft dargestellt. Zunächst wurden alle Pflanzen vier Wochen lang im Abstand von zwei Tagen automatisch 10 bis 15 Minuten bewässert, um ihnen die Anpassung an die Gewächshausbedingungen zu ermöglichen. Am Ende dieser Phase erfolgte die erste Probennahme. Von jeder Einzelpflanze der fünf Linien wurde jeweils ein junges und ein altes Blatt (Blatt 3 und Blatt 7 von der Sprossspitze abwärts) beprobt. Aus diesen Blattstücken wurden niedermolekulare Substanzen extrahiert, um mittels Gaschromatografie den GG-Gehalt in den Blättern verschiedener Entwicklungsstadien vor der Stressphase zu bestimmen.

Anschließend wurden die Pflanzen bis zum Abreifen unter Kontroll-, Salz- bzw. Trockenstressbedingungen weiter kultiviert. Das bedeutete, dass die Kontrollpflanzen nach Bedarf mit einer bestimmten Wassermenge gegossen wurden, wogegen die Pflanzen unter Trockenstress etwa 50 % dieser Menge erhielten. Die Pflanzen des Salzstressversuches wurden mit NaCl-haltigem Giesswasser gegossen, sodass jeder Topf am Ende des Versuches 26 g NaCl enthielt. Nach sieben Wochen der Stressphase erfolgte die zweite Probennahme eines neuen und eines alten Blattes, um die GG-Akkumulation unter Stressbedingungen untersuchen zu können.

Nach dem Abreifen wurden die Knollen geerntet und der Ertrag jeder einzelnen Pflanze ermittelt. Auch die Knollen wurden für eine GC-Analyse beprobt, um den GG-Gehalt zu bestimmen. Außerdem sollte im Rahmen der Versuche der Einfluss von Stress und GG-Akkumulation auf den Qualitätsparameter *Lagerungsschwund* untersucht werden. Darunter versteht man den Masseverlust der Knolle durch Wasserabgabe aufgrund von Respirations- und Transpirationsvorgängen während der Lagerung. Um die Lagerungseigenschaften der transgenen Knollen untersuchen zu können, wurden diese nach der Ernte bei 4° C im Dunkeln aufbewahrt und nach sieben Monaten der Gewichtsverlust bestimmt.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wurde einmal pro Woche die Sprosslänge der Pflanzen gemessen, um mögliche Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Linien bei unterschiedlichen Kulturbedingungen über den gesamten Versuchszeitraum und im Besonderen während der Stressphase zu erfassen.

#### 3.3.2.2 Ergebnisse der Stressversuche

##### 3.3.2.2.1 Sprosslängenwachstum

**Kontrolle** Bei den Kontrollpflanzen war ein kontinuierliches Wachstum zu beobachten, wobei sie ihr Sprosslängenmaximum zwischen 56 und 67 cm etwa zehn Wochen nach Versuchsbeginn erreichten. Schon unter Kontrollbedingungen zeigten die transgenen Linien, mit Ausnahme von



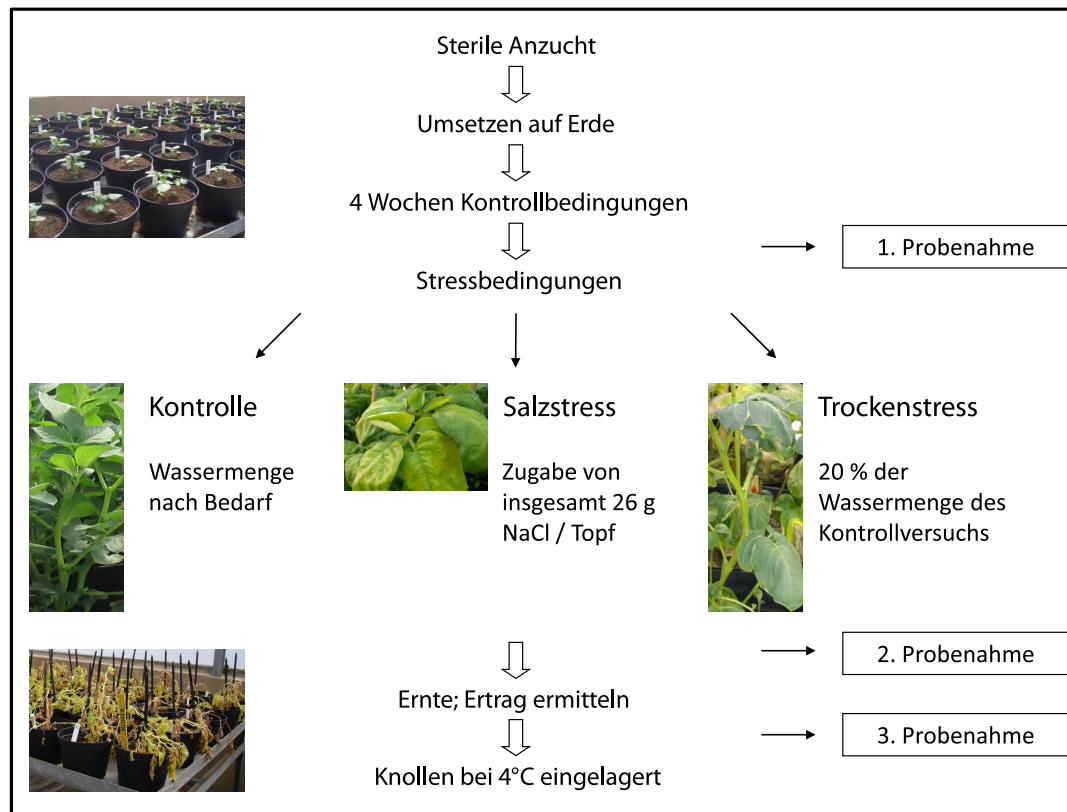


Abbildung 3.10: Verlauf der Gewächshausversuche; jeweils fünf bzw. zehn Pflanzen von vier transgenen Linien wurden unter Kontroll- oder Stressbedingungen im Vergleich zum Wildtyp kultiviert und bzgl. des Wachstums, der GG-Akkumulation und des Knollenertrages untersucht.

Alba-AF11, die unter den transgenen Pflanzen mit durchschnittlich  $0,5 \mu\text{mol/g}$  FM die geringsten GG-Mengen akkumulierte, ein größeres Sprosswachstum als der Wildtyp (Abb. 3.11a). Der Sprosslängenzuwachs der Pflanzen dieser Linien während der Stressphase unterschied sich bis auf Linie Alba-AF1 jedoch nicht signifikant vom Wildtyp (Abb. 3.11d).

**Salzstress** Grundsätzlich war das Wachstum der Pflanzen aller untersuchten Linien unter Salzstressbedingungen geringer als unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.11b). Die Pflanzen erreichten das Maximum ihrer Sprosslänge schon nach etwa sieben bis acht Wochen. Nach vier Wochen im Gewächshaus, mit dem Beginn der Stressphase, zeichnete sich auch unter Salzstressbedingungen ab, dass die transgenen Pflanzen ein größeres Sprosswachstum aufweisen als die Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.11e). In allen vier Gewächshausversuchen bestätigte sich, dass Pflanzen der Linien Alba-AF1, 8 und 9 ein zum Teil signifikant erhöhtes Sprosslängenwachstum im Vergleich zum Wildtyp und der Linie Alba-AF11 besaßen.

**Trockenstress** Trockenstress wirkte sich generell ebenfalls hemmend auf das Wachstum aller untersuchten Linien im Vergleich zu den unter Kontrollbedingungen gewachsenen Pflanzen aus (Abb. 3.11c). Bis auf Linie Alba-AF11, die sich diesbezüglich nicht vom Wildtyp unterschied, wiesen die transgenen Linien Alba-AF1, 8 und 9 einen signifikant erhöhten Sprosslängenzuwachs, insbesondere während der Trockenstressphase, auf (Abb. 3.11f).

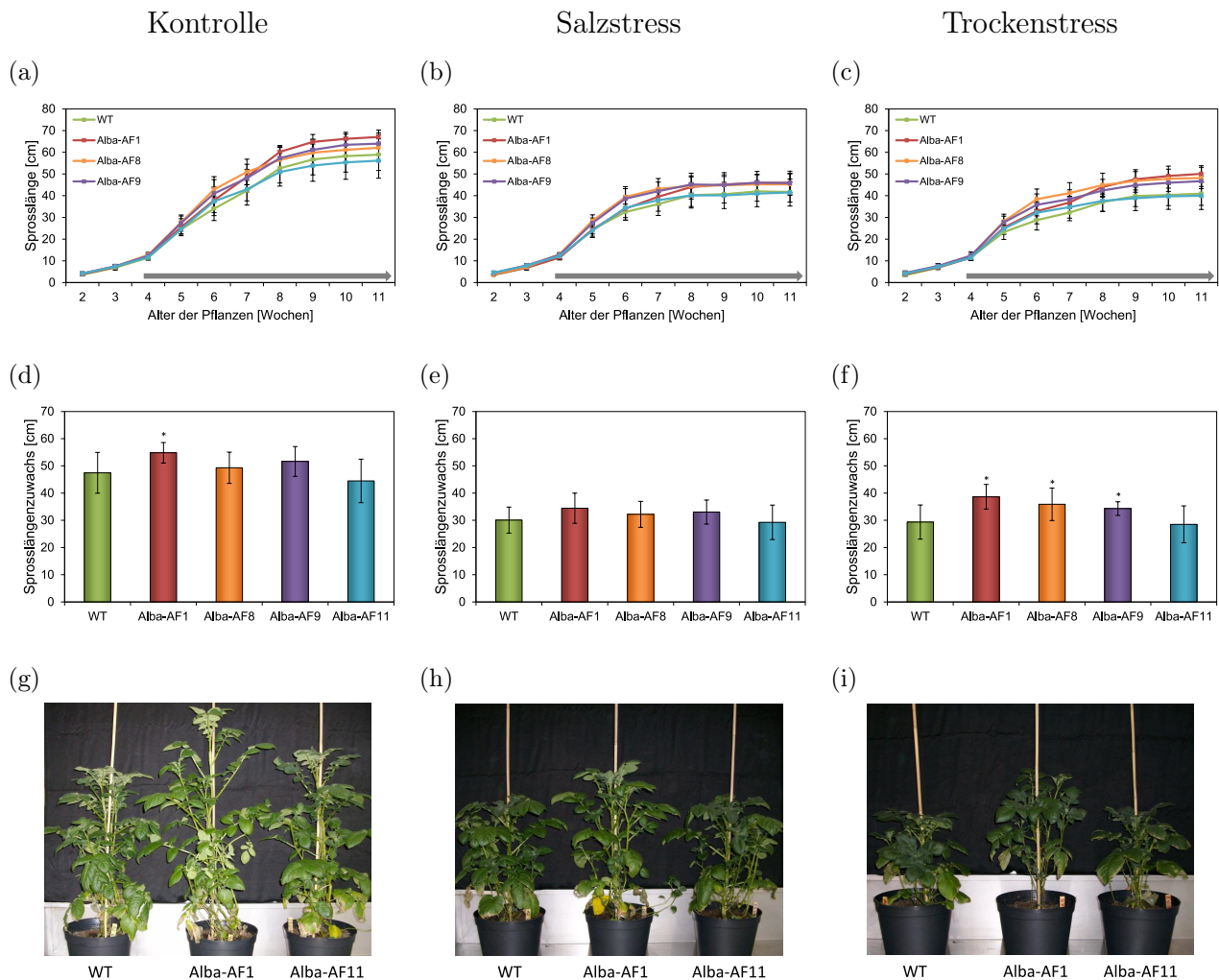


Abbildung 3.11: Untersuchung zum Wachstum von Wildtyp- und transgenen Pflanzen im Gewächshaus unter Kontroll- (links), Salzstress- (Mitte) und Trockenstressbedingungen (rechts). (a)-(c): Sprosslängenwachstum über den Verlauf des gesamten Versuches; (d)-(f): Sprosslängenzuwachs während der Stressphase; (g)-(i): Abbildung von Einzelpflanzen zweier transgener Linien im Vergleich zur Wildtyp-Linie.

### 3.3.2.2.2 Ertrag und Lagerfähigkeit der Knollen

**Kontrolle** Das gesteigerte Sprosswachstum der transgenen Linien wirkte sich nicht auf den Ertrag der Pflanzen aus (Abb. 3.12). Der Ertrag setzt sich hier aus der Knollenanzahl (Abb. 3.12a-c) und der Knollenmasse (Abb. 3.12d-f) pro Pflanze zusammen. Wie schon beim Sprosswachstum, wurde auch beim Ertrag kein Unterschied zwischen der Linie Alba-AF11 und dem Wildtyp nachgewiesen. Trotz des erhöhten Sprosswachstums der anderen transgenen Pflanzen, z.B. Linie Alba-AF1, konnte keine Zunahme der Knollenanzahl oder -masse im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden. In dem hier dargestellten Gewächshausversuch wiesen lediglich die Pflanzen der Linie Alba-AF8 bei Anzucht unter Kontrollbedingungen einen leicht verbesserten Knollenansatz auf, der auch zu einer etwas erhöhten Knollenmasse bezogen auf den Wildtyp

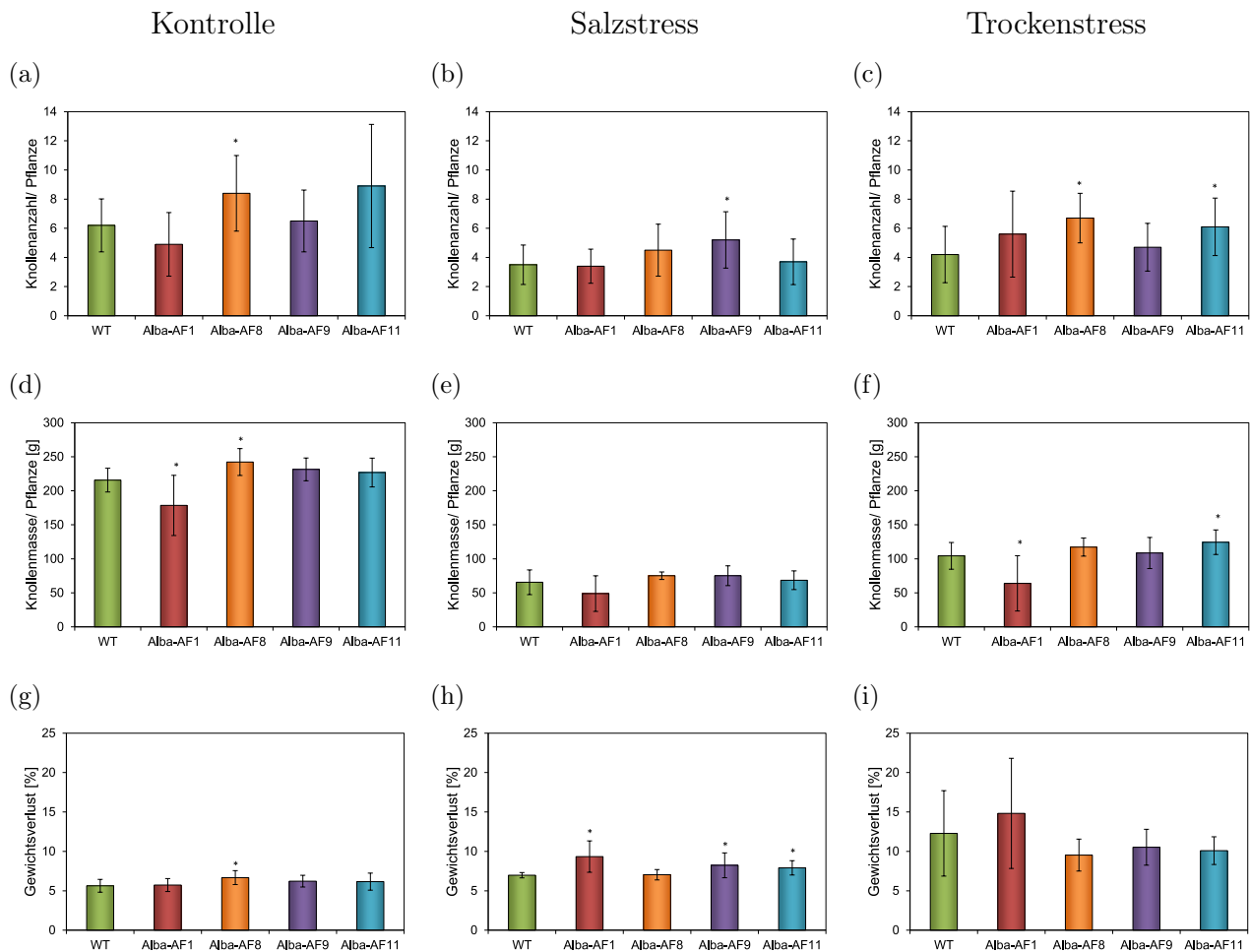


Abbildung 3.12: Untersuchungen zum Ertrag und Lagerungsschwund von Wildtyp- und transgenen Pflanzen aus dem Kontroll- (links), Salzstress- (Mitte) und Trockenstressversuch (rechts). (a–c): Knollenanzahl pro Pflanze; (d–f): Knollenmasse pro Pflanze; (g–i): Prozentualer Gewichtsverlust der Knollen nach sieben Monaten Lagerung bei 4° C im Dunkeln.

führte. In allen vier Gewächshausversuchen wiesen Pflanzen der transgenen Linien Alba-AF1, 8 und 9 einen erhöhten Knollenansatz auf, wogegen sich die Knollenmasse nicht von der der Wildtyp-Pflanzen unterschied bzw. sogar geringer war.

Neben der Knollenanzahl und -masse war auch der prozentuale Gewichtsverlust nach einer Lagerungszeit von sieben Monaten bei 4° C bei Linie Alba-AF8 im Vergleich zu allen anderen Linien leicht erhöht (Abb. 3.12g). Darüber hinaus waren zwischen den Linien keine signifikanten Differenzen feststellbar.

**Salzstress** Generell zeigte sich, dass sowohl die Knollenanzahl als auch die Knollenmasse pro Pflanze um 50 bis 75 % unter Salzstressbedingungen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen verringert war. Die Linie Alba-AF9 besaß einen signifikant erhöhten Knollenansatz, unterschied sich bezüglich der Knollenmasse jedoch nicht von den anderen untersuchten Linien. Ansonsten ließen sich die Ergebnisse des Kontrollversuches auf den Salzstressversuch übertragen.

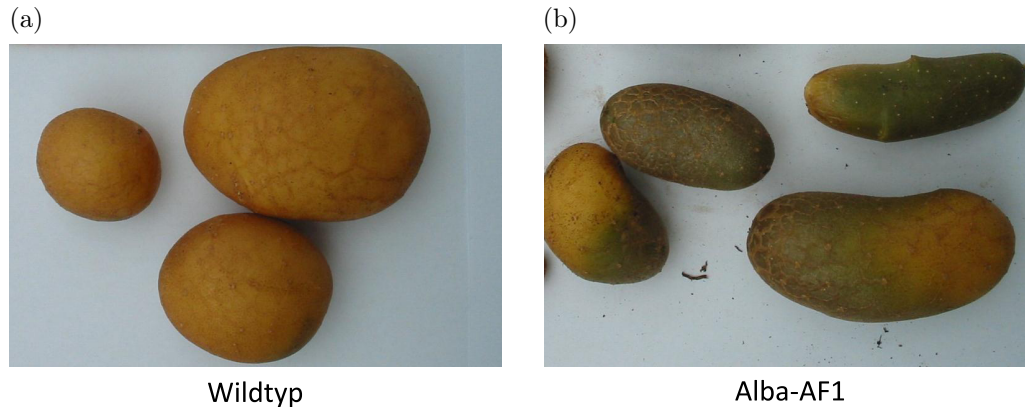


Abbildung 3.13: Vergleich der Knollenform der transgenen Linie Alba-AF1 (b) mit dem Albatros-Wildtyp (a).

Nach siebenmonatiger Lagerung bei 4° C wiesen die Knollen aller salzgestressten Linien Gewichtsverluste auf, die um 0,3 bis 5,7 % größer waren als bei Knollen des Kontrollversuches (Abb. 3.12h). Die Gewichtsverluste der Knollen transgener Linien waren verglichen mit den Knollen der Wildtyp-Pflanzen signifikant erhöht.

**Trockenstress** Die Ertragsermittlungen resultierten in einem ähnlichen Ergebnis wie nach Salzstress. Trockengestresste Pflanzen zeigten generell sowohl bei Knollenanzahl als auch Knollenmasse geringere Werte als unter Kontrollbedingungen. Die transgenen Linien wiesen einen tendenziell erhöhten Knollenansatz auf, der sich wiederum nicht positiv auf die Knollenmasse auswirkte (Abb. 3.12c, f).

Wie bei den Untersuchungen zum Salzstress hatten auch die Knollen trockengestresster Pflanzen einen deutlich höheren Masseverlust als die Knollen aus dem Kontrollversuch. (Abb. 3.12i). Kartoffelknollen aus dem Trockenstressversuch wiesen einen um 2,7 bis 13,1 % größeren Schwund auf, der auch höher als bei den Knollen von salzgestressten Pflanzen war. Einige der transgenen Linien besaßen zwar tendenziell niedrigere Masseverluste als der Wildtyp, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant.

Zusätzlich zu den quantitativen Beobachtungen fielen die Knollen der Linie Alba-AF1 durch ihre längliche Form auf. Diese von der typischen Knollenform der Sorte Albatros abweichende Form wurde sowohl unter Kontroll- als auch Stressbedingungen beobachtet (Abb. 3.13).

**3.3.2.2.3 Gaschromatografische Analyse** Vor Beginn der Stressphase wurde in allen Pflanzen durch gaschromatografische Analyse der Gehalt an GG und anderen niedermolekularen Verbindungen bestimmt (Abb. 3.14). Wie schon die vorhergehenden Versuche gezeigt haben, bestätigte sich auch in diesen Untersuchungen, dass in den jungen Blättern eine deutlich höhere GG-Akkumulation vorliegt als in den alten Blättern. Deshalb bezieht sich die Auswertung ausschließlich auf die Proben der jungen Blätter.

In diesen Proben wurden deutlich höhere GG-Mengen in den transgenen Linien im Vergleich zu den Voruntersuchungen gefunden. Teilweise betrug der Anstieg mehr als das Vierfache. In jungen Blättern einzelner Pflanzen konnten bis zu 19,2  $\mu\text{mol/g}$  FM detektiert werden. Die relative Akkumulation der transgenen Linien blieb jedoch unverändert. In den Linien Alba-AF1, 8 und

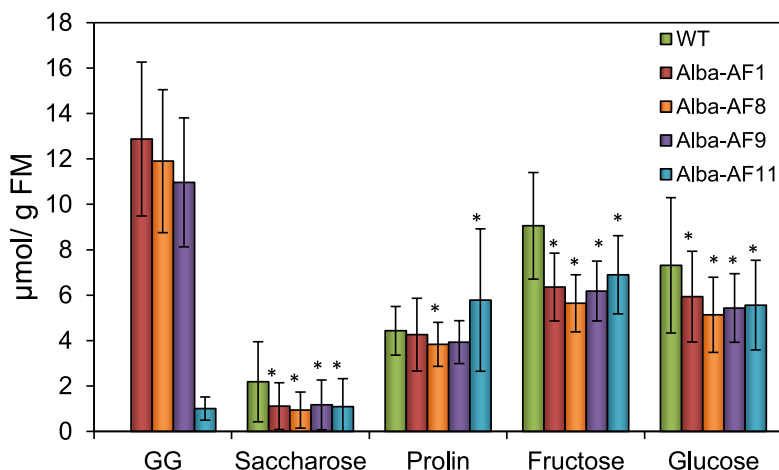


Abbildung 3.14: Akkumulation ausgewählter niedermolekularer Verbindungen in jungen Blättern verschiedener Kartoffellinien vor Stressbeginn.

9 war mit durchschnittlich  $12,9 \mu\text{mol/g FM}$ ,  $11,9 \mu\text{mol/g FM}$  und  $10,9 \mu\text{mol/g FM}$  sehr viel GG nachweisbar. Dagegen reicherten Blätter der Linie Alba-AF11 mit  $1 \mu\text{mol/g FM}$  kaum GG an.

Die Saccharose-Gehalte in jungen Blättern aller drei transgener Linien waren signifikant geringer als der Saccharose-Gehalt im Wildtyp. Auch die Fructose- und Glucose-Werte nahmen gegenüber dem Wildtyp ab. Prolin wurde als mögliches natürliches *compatible solute* von *S. tuberosum* ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen. Vor der Stressphase konnte kein Unterschied in der Prolinmenge zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp gefunden werden.

**Kontrolle** Die Auswertung der zweiten GC-Analyse von Extrakten aus jungen Blättern, die sieben Wochen nach Beginn der Stressphase durchgeführt wurde, zeigte einen deutlichen Abfall der GG-Werte in den transgenen Linien. In allen Proben war GG lediglich in Spuren nachweisbar (Abb. 3.15a). Gegenüber der ersten Probenahme blieb das Niveau des Saccharose-Gehaltes annähernd unverändert, wobei in den Pflanzen des Wildtyps ein leicht verminderter Saccharosegehalt unter Kontrollbedingungen gemessen wurde, während die Blätter aller transgenen Linien signifikant höhere Werte als der Wildtyp aufwiesen.

Prolin war ebenfalls nur noch in geringen Mengen detektierbar, wogegen die Fructose- und Glucose-Werte nahezu konstant blieben. Zwischen den verschiedenen Linien wurden kaum Unterschiede festgestellt.

**Salzstress** Die starke Abnahme im GG-Gehalt war auch unter Salzstressbedingungen zu beobachten. Dagegen stiegen die Saccharose-Werte verglichen mit den Werten der Analyse vor der Stressphase auf bis zu durchschnittlich  $7,6 \mu\text{mol/g FM}$  in den transgenen Linien an, die sich damit signifikant vom Wildtyp unterschieden, in dem die Werte nur etwa  $4 \mu\text{mol/g FM}$  erreichten (Abb. 3.15b).

Neben Saccharose stieg auch der Prolingehalt in salzgestressten Pflanzen an, während die löslichen Zucker Fructose und Glucose im Vergleich zu den Kontrollbedingungen abnahmen. Bei diesen Stoffen wurde, bis auf den Glucose-Gehalt der Linie Alba-AF1 und den Prolin-Gehalt der Linie Alba-AF8, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp detektiert.

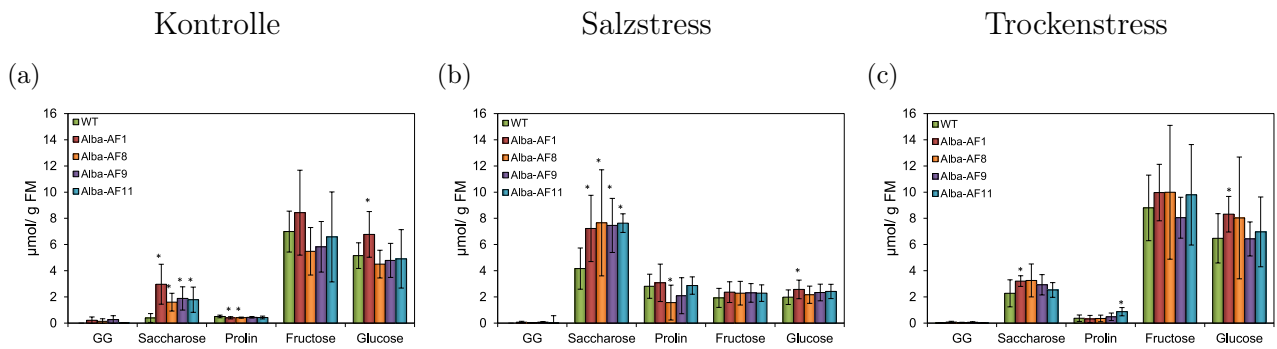


Abbildung 3.15: Akkumulation ausgewählter niedermolekularer Verbindungen in jungen Blättern verschiedener Kartoffellinien sieben Wochen nach Stressbeginn unter (a) Kontroll-, (b) Salzstress- und (c) Trockenstressbedingungen.

**Trockenstressversuch** Wie im Kontroll- und Salzstressversuch war die GG Akkumulation auch unter Trockenstressbedingungen extrem verringert. Dagegen zeigten alle transgenen Linien einen relativ geringen Anstieg der Saccharose-Mengen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Der Saccharose-Gehalt der Wildtyp-Pflanzen blieb unverändert. Zudem gab es bis auf Linie Alba-AF1, die einen etwas höheren Saccharose-Gehalt aufwies als der Wildtyp, zwischen den einzelnen Linien keine signifikanten Differenzen (Abb. 3.15c).

Auch für die weiteren untersuchten Kohlenhydrate Fructose und Glucose ergab sich in der Auswertung ein ähnliches Bild wie für Saccharose. Die Werte des Wildtyps sowie der meisten transgenen Linien blieben im Vergleich zu den Kontrollpflanzen nahezu unverändert. Nur die Linie Alba-AF1 zeigte nach der Trockenstressphase einen signifikant höheren Glucose-Gehalt. Der Gehalt an Prolin sank in allen Pflanzen auf unter  $1 \mu\text{mol/g FM}$  ab, wobei ausschließlich der Wert der Linie Alba-AF11 minimal gegenüber dem Wildtyp erhöht war.

In den Knollen der transgenen Pflanzen konnte weder unter Kontroll- noch unter Stressbedingungen GG nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Untersuchungen zur GG-Akkumulation in den transgenen Pflanzen

In allen bisherigen Versuchen war die Anreicherung in den jungen Blättern deutlich höher als in Blättern aus einem älteren Entwicklungsstadium. Weiterhin wurden unabhängig von den Kulturbedingungen auch in jungen Blättern mit steigendem Pflanzenalter abnehmende GG-Mengen bis nahe der Nachweisgrenze detektiert. Nicht nur in den Blättern ungleichen Alters auch in anderen Pflanzenteilen gab es variierende Ergebnisse. In Stolonen vieler Pflanzen traten unterschiedlich große Mengen an GG auf, während in den reifen Knollen kein GG nachgeweisbar war. Um die entwicklungs-, zeit- und organabhängige GG-Akkumulation genauer zu betrachten, wurden jeweils fünf Pflanzen der drei zuvor untersuchten transgenen Albatros-Linien Alba-AF1, 8 und 9 vergleichend über einen Zeitraum von vier Wochen untersucht.



### 3.3.3.1 GG-Akkumulation in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Blattes

Auch in diesem Versuch wurden nach vier Wochen Kultivierung unter Kontrollbedingungen mit durchschnittlich 8,6 bis 12,6  $\mu\text{mol/g}$  FM im jüngsten Blatt (Blatt a) der transgenen Linien die höchsten GG-Mengen nachgewiesen (Abb. 3.16a). In Blatt b konnten noch ähnlich hohe GG-Gehalte detektiert werden. Ab Blatt c jedoch sanken die GG-Werte kontinuierlich ab. Im ältesten Blatt mit dem höchsten Entwicklungsstadium (Blatt g) waren in allen drei transgenen Linien mit durchschnittlich 1 bis 2,8  $\mu\text{mol/g}$  FM nur noch GG-Spuren messbar.

Dagegen stieg der Saccharose-Gehalt von unter 1  $\mu\text{mol/g}$  FM im jüngsten Blatt in allen transgenen Linien leicht auf 1,5 bis 2,3  $\mu\text{mol/g}$  FM im Blatt g an, während die ältesten Blätter der Wildtyp-Pflanzen etwa 4  $\mu\text{mol/g}$  FM enthielten (Abb. 3.16b).

### 3.3.3.2 GG-Akkumulation in Abhängigkeit von der Zeit der Kultivierung

Neben der entwicklungsabhängigen GG-Akkumulation in den Blättern schien die Anreicherung von GG zusätzlich vom Alter der gesamten Pflanze bzw. von der Zeit der Kultivierung der Pflanze abhängig zu sein. Deshalb wurde zusätzlich im Abstand von einer Woche ausschließlich das jüngste Blatt beprobt. Zu Beginn dieses Versuches (nach vier Wochen Wachstum) war der GG-Gehalt im Blatt a relativ hoch. Eine Woche später erreichten der Werte in allen transgenen Linien ihr Maximum von durchschnittlich 12,2 bis 13,4  $\mu\text{mol/g}$  FM. Jedoch nahmen von diesem Zeitpunkt an auch in den jungen Blättern die GG-Gehalte extrem ab, sodass drei Wochen nach der ersten Probenahme lediglich 1,6 bis 5,8  $\mu\text{mol/g}$  FM detektiert wurden (Abb. 3.17a).

Parallel zur Abnahme der GG-Akkumulation kam es mit der Zeit zwar zu einer Zunahme des Saccharose-Gehaltes in den jungen Blättern aller Linien, die jedoch geringer ausfiel als in den Blättern mit zunehmendem Alter (Abb. 3.17b).

### 3.3.3.3 GG-Akkumulation in den Stolonen

Da in den reifen Knollen der transgenen Pflanzen bisher kein GG nachgewiesen werden konnte, wurden auch die Stolone mittels GC-Analyse untersucht (Abb. 3.18), die nach etwa sechs Wochen Kultivierung unter Kontrollbedingungen sichtbar wurden. So erfolgte eine Woche später die Beprobung der jungen Stolone an allen Pflanzen. Darin wurden durchschnittliche GG-Gehalte von 5 bis 8  $\mu\text{mol/g}$  FM detektiert. Eine Woche später konnten nahezu unverändert hohe Werte gemessen werden, wobei in Stolonen der Linie Alba-AF1 sogar noch eine Steigerung der GG-Menge auf bis zu 14,5  $\mu\text{mol/g}$  FM zu beobachten war. Die zu diesem Zeitpunkt ermittelten GG-Mengen entsprachen etwa dem Maximalwert im jungen Blatt nach fünf bis sechs Wochen Anzucht.

### 3.3.3.4 GG-Akkumulation in der M2-Generation der transgenen Linien

Bisher wurden die transgenen Pflanzen für die Versuche immer aus der Gewebekultur der M1-Generation angezogen. Um zu überprüfen, ob auch bei Anzucht aus Knollen in den untersuchten transgenen Linien GG nachweisbar ist, wurden je fünf Knollen, die von Pflanzen des Wildtyps und der transgenen Linie Alba-AF1 aus dem Kontrollversuch stammten, nach einer Lagerungszeit von sechs Monaten ausgepflanzt und sechs Wochen bis zur Probenahme der jungen Blätter unter Kontrollbedingungen kultiviert. Am Beispiel der Linien Alba-AF1 und 11 ist zu erkennen, dass die GG-Akkumulation in diesen Pflanzen unverändert bleibt (Abb. 3.19).

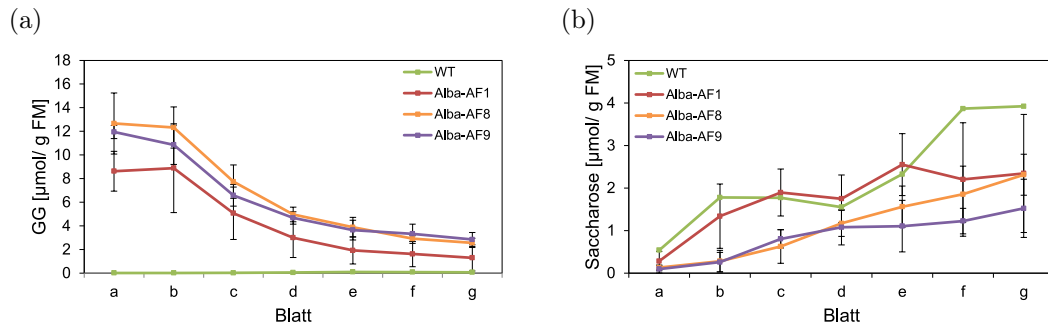


Abbildung 3.16: Akkumulation von (a) GG und (b) Saccharose in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Blattes.

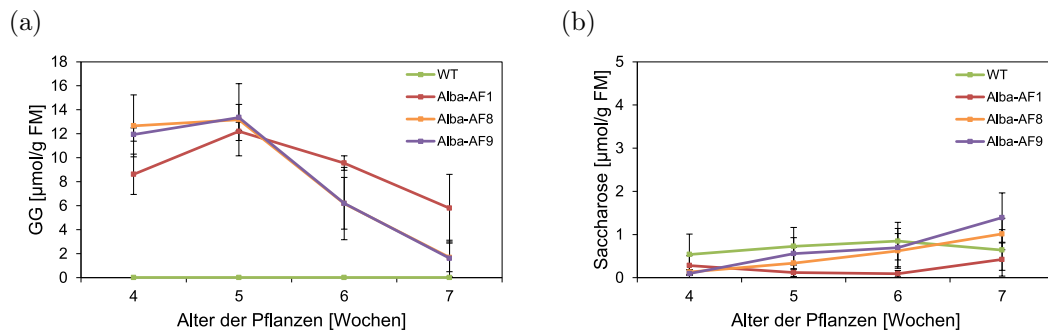


Abbildung 3.17: Akkumulation von (a) GG und (b) Saccharose in jungen Blättern in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

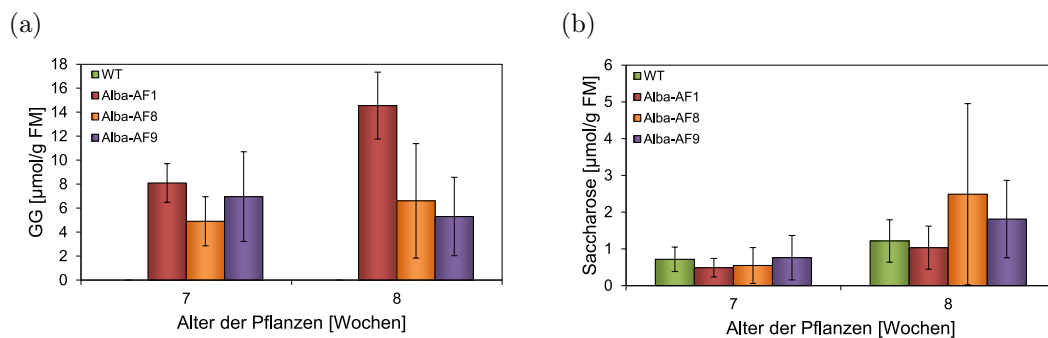


Abbildung 3.18: Akkumulation von (a) GG und (b) Saccharose in den Stolonen nach sieben Wochen Wachstum.



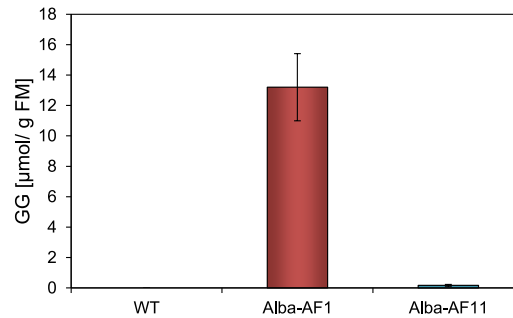


Abbildung 3.19: GG-Akkumulation in jungen Blättern der M2-Generation der transgenen Linien Alba-AF1 und 11 und dem Wildtyp.

### 3.4 Expression des *gppPS*-Gens unter der Kontrolle des *rd29A*-Promotors

Die unter Abschnitt 3.1 beschriebenen Konstrukte pCambia-*rd29A*-AF und pCambia-*rd29A*-GUS wurden mittels des optimierten Protokolls in die Kartoffelsorte Albatros transformiert. Anschließend sollten in einem Gewächshausversuch transgene Kartoffellinien mit konstitutiver und salzregulierter *gppPS*-Expression verglichen werden.

#### 3.4.1 Selektion der transgenen Linien

Die Selektion der transgenen Linien erfolgte auf Hygromycin-haltigem MS-Medium. Mit Hilfe des optimierten Transformationsprotokolls konnten aus der Transformation des pCambia-*rd29A*-GUS-Konstruktes 12 Pflanzen und aus der Transformation des pCambia-*rd29A*-AF-Konstruktes 23 Pflanzen regeneriert werden, die mittels PCR auf die Anwesenheit des *rd29A*-Promotors bzw. des *rd29A*-Promotors in Verbindung mit dem *gppPS*-Gen sowie des Hygromycin-Resistenzgens untersucht wurden. Dabei wurden 6 Transgen-positive pCambia-*rd29A*-GUS Linien und 17 Transgen-positive pCambia-*rd29A*-AF Linien selektiert, was einer Selektionsrate von 50 bzw. 73 % entspricht. Von diesen transgenen Pflanzen wurden daraufhin 2 pCambia-*rd29A*-GUS-Linien (Alba-*rd29A*-GUS1 und 2) und 3 pCambia-*rd29A*-AF-Linien (Alba-*rd29A*-AF5, 9 und 16) mit Hilfe des unter Abschnitt 2.2 beschriebenen Protokolls bei der Firma NORIKA von Bakterien befreit und vermehrt, um sie im Gewächshaus untersuchen zu können (Abb. 3.20).

#### 3.4.2 Stressversuch im Gewächshaus

In diesem Versuch wurden die drei transgenen Linien Alba-*rd29A*-AF5, 9 und 16, deren *gppPS*-Gen unter der Kontrolle des *rd29A*-Promotors steht mit der transgenen Alba-AF1-Linie mit dem *gppPS*-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors sowie dem Wildtyp verglichen. Zusätzlich wurde die Linie Alba-*rd29A*-GUS1 einbezogen. Da die Untersuchungsergebnisse zu den Stressversuchen mit den Alba-AF-Linien (siehe Abschnitt 3.3) im Gewächshaus keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kultivierung unter Trocken- und Salzstressbedingungen gezeigt haben, beschränkte sich dieser Versuch auf die Anzucht von jeweils 5 Pflanzen pro Linie bei 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit unter Kontroll- und Salzstressbedingungen. Auch in diesem Versuch wurden die Pflanzen anhand eines Randomisierungsplans angeordnet und bezüglich des Sprosswachstums, Knollenertrages und der GG-Akkumulation untersucht.

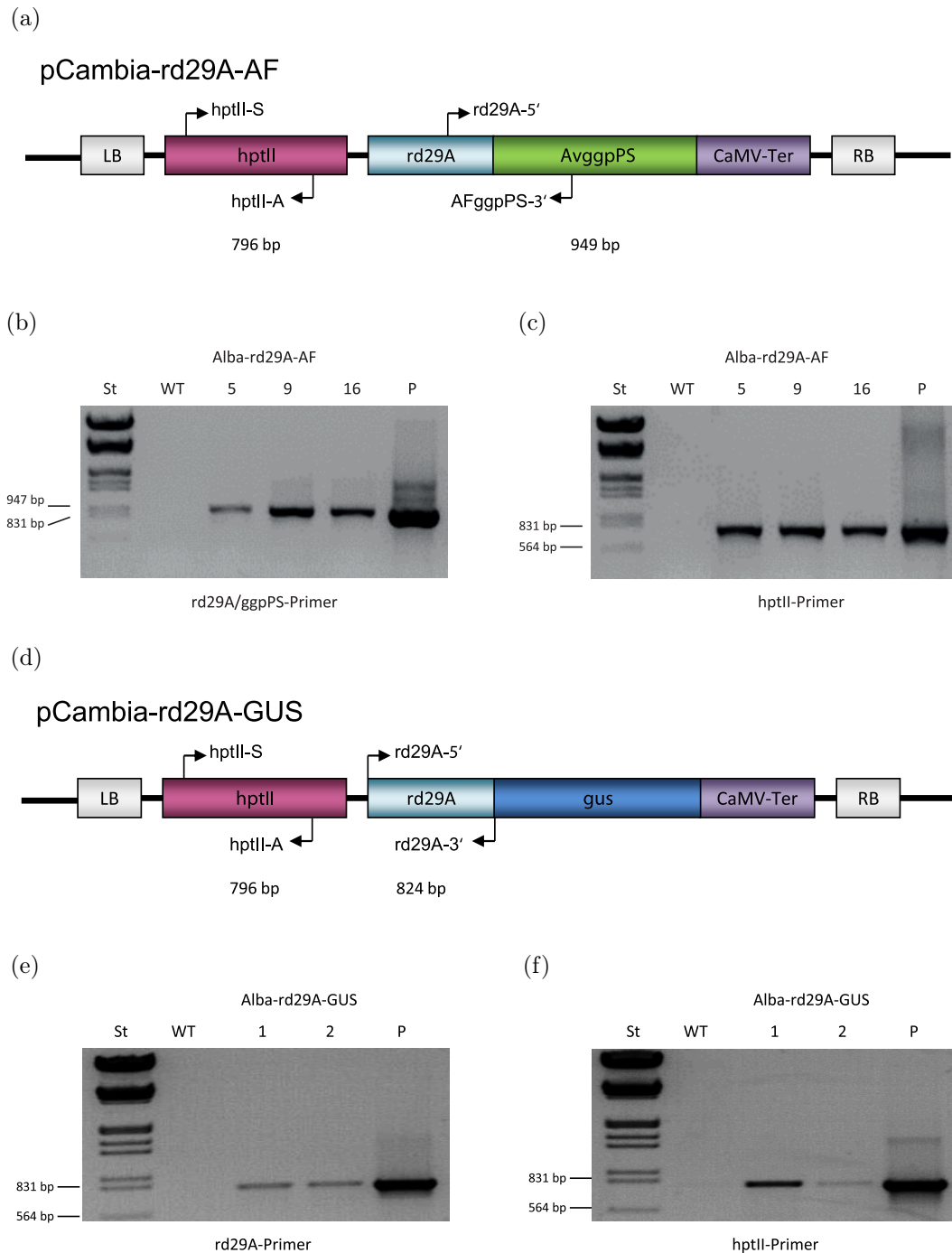


Abbildung 3.20: Untersuchung des Genotyps der transgenen Linien Alba-rd29A-AF (a-c) und Alba-rd29A-GUS (d-f) durch Transgennachweis mittels PCR. Schematische Darstellung der Primerbindestellen innerhalb des (a) pCambia-rd29A-AF-Konstruktes bzw. des (d) pCambia-rd29A-GUS-Konstruktes. Nachweis des *ggpPS*-Gens mit der Primerkombination rd29A-5'/AFggpPS-3' fig:Rd29A:Transgennachweis:ggpPS bzw. des rd29A-Promotors mit der Primerkombination rd29A-5'/rd29A-3' (e). Nachweis des *hptII*-Gens mit der Primerkombination hptII S/A in den Linien Alba AF1, 8, 9 und 11 bzw. Alba-rd29A-GUS1 (c, f). Die Albatros Wildtypelinie und die transformierten Plasmide pCambia-rd29A-AF bzw. pCambia-rd29A-GUS dienten als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle.

#### 3.4.2.1 Ablauf des Stressversuches

Dieser Versuch verlief mit geringen Änderungen analog zu den zuvor unter Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Gewächshausversuchen, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Alle Pflanzen wurden zunächst fünf Wochen lang im Abstand von zwei Tagen automatisch 10 bis 15 Minuten bewässert. Am Ende dieser Phase erfolgte die erste Probenahme, um die GG-Akkumulation mittels Gaschromatografie unter Kontrollbedingungen und zu einem Zeitpunkt zu ermitteln, zu dem in Alba-AF-Pflanzen hohe GG-Werte nachgewiesen werden konnten. Von jeder Einzelpflanze wurde zunächst lediglich ein junges (Blatt 3) beprobt, da aufgrund der Salzinduzierbarkeit des *rd29A*-Promotors zu diesem Zeitpunkt weder im jungen noch im alten Blatt GG nachweisbar sein sollte. Während der anschließenden Stressphase wurden die Pflanzen des Kontrollversuches weiter nach Bedarf mit Leitungswasser gegossen, die Pflanzen des Salzstressversuches dagegen mit NaCl-haltigem Giesswasser. Eine Woche nach Beginn dieser Phase erfolgte die zweite Probennahme für die gaschromatografische Analyse, die neben der Beprobung des jungen Blattes auch die des alten Blattes (7. Blatt) einbezog. Im Abstand von jeweils zwei Wochen wurden zwei weitere Probennahmen durchgeführt, bei denen sowohl Blattproben (3. und 7. Blatt) als auch Proben von den Stolonen genommen wurden. Die Pflanzen des Salzstressversuches wurden bis zum Abreifen mit 100 mM NaCl-Lösung gegossen, sodass zum Zeitpunkt der Ernte jeder Topf etwa 31 g NaCl enthielt.

Nach insgesamt zwölf Wochen der Kultivierung erfolgte zunächst die Ernte der Kontrollpflanzen. Die Knollenernte der salzgestressten Pflanzen fand aufgrund des längeren Abreifens eine Woche später statt. Dabei wurden wiederum die Anzahl der Knollen sowie die Knollenmasse jeder einzelnen Pflanze ermittelt und Knollenproben für die GC-Analyse genommen, um den GG-Gehalt zu bestimmen und die Knollen danach bei 4° C im Dunkeln zu lagern.

Auch in diesem Versuch wurde einmal wöchentlich die Sprosslänge der Pflanzen gemessen, um eventuelle Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Linien und den Kulturbedingungen zu erfassen.

#### 3.4.2.2 Ergebnisse des Stressversuches

**3.4.2.2.1 Sprosslängenwachstum** Verglichen mit den Pflanzen, die unter Kontrollbedingungen kultiviert worden sind, war das Wachstum aller Pflanzen unter Salzstressbedingungen wiederum reduziert (Abb. 3.21a, b). Während die Kontrollpflanzen nach etwa zehn Wochen zwischen 58 und 70 cm groß waren, erreichten die salzgestressten Pflanzen mit einer Länge von 40 - 50 cm ihr Sprosslängenmaximum bereits nach etwa acht Wochen. Dabei zeigten die transgenen Linien sowohl unter Kontroll- als auch unter Stressbedingungen einen teilweise signifikant höheren Sprosslängenzuwachs innerhalb der Stressphase als der Wildtyp und die Linie Alba-AF1 (Abb. 3.21c, d). Am Beispiel der gezeigten Einzelpflanzen der transgenen Linien Alba-*rd29A*-AF5 und 9 ist der Größenunterschied zum Wildtyp deutlich zu erkennen (Abb. 3.21e, f).

**3.4.2.2.2 Ertrag und Lagerfähigkeit der Knollen** Bezüglich des Knollenansatzes waren unter Kontrollbedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp zu beobachten (Abb. 3.22a). Obwohl die Linien Alba-AF1 und Alba-*rd29A*-AF5 und 9 eine tendenziell leicht erhöhte Anzahl der Knollen aufwiesen, erzeugten alle transgenen Pflanzen eine signifikant geringere Knollenmasse als der Wildtyp (Abb. 3.22c).

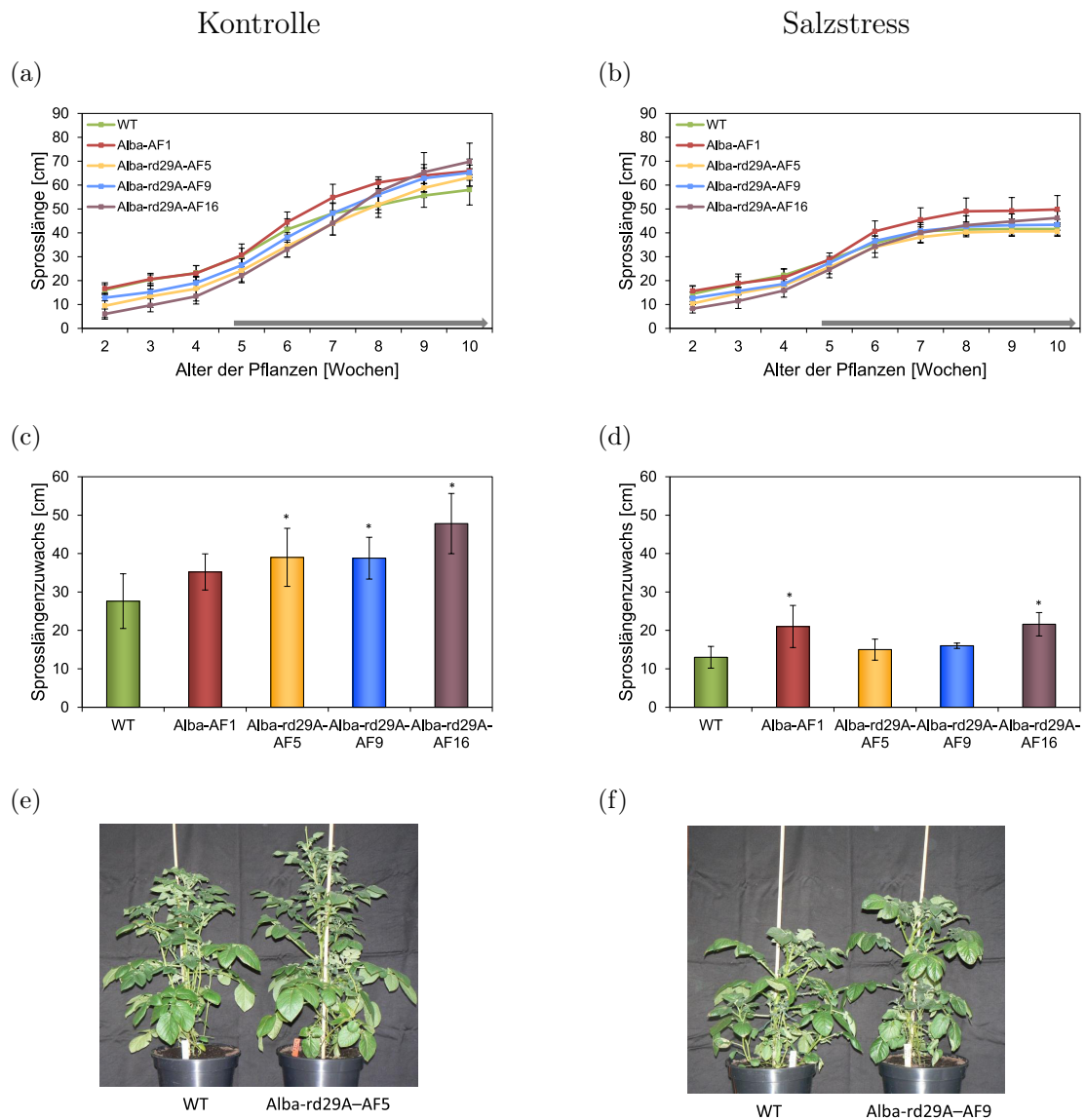


Abbildung 3.21: Analyse des Wachstums von Wildtyp- und transgenen Pflanzen im Gewächshaus unter Kontroll- (links) und Salzstressbedingungen (rechts). (a), (b): Sprosslängenwachstum über den Verlauf des gesamten Versuches; (c), (d): Sprosslängenzuwachs während der Stressphase; (e), (f): Abbildung von Einzelpflanzen der transgenen Linie Alba-rd29A-AF5 bzw. 9 im Vergleich zur Wildtyp-Linie.

Grundsätzlich war der Ertrag von salzgestressten Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen verringert. Durchschnittlich betrug die Knollenanzahl der salzgestressten Pflanzen nur 52 - 62 % der Knollenanzahl der Kontrollpflanzen, wobei die Knollenmasse um 18 - 30 % reduziert war. Der Vergleich zwischen den Linien innerhalb des Salzstressversuches wies ein ähnliches Bild wie im Kontrollversuch auf. Bis auf die Linie Alba-rd29A-AF16, deren Knollenmasse signifikant kleiner als die des Wildtyps war, konnten sowohl bezüglich der Knollenanzahl als auch der Knollenmasse keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Linien nachgewiesen werden.

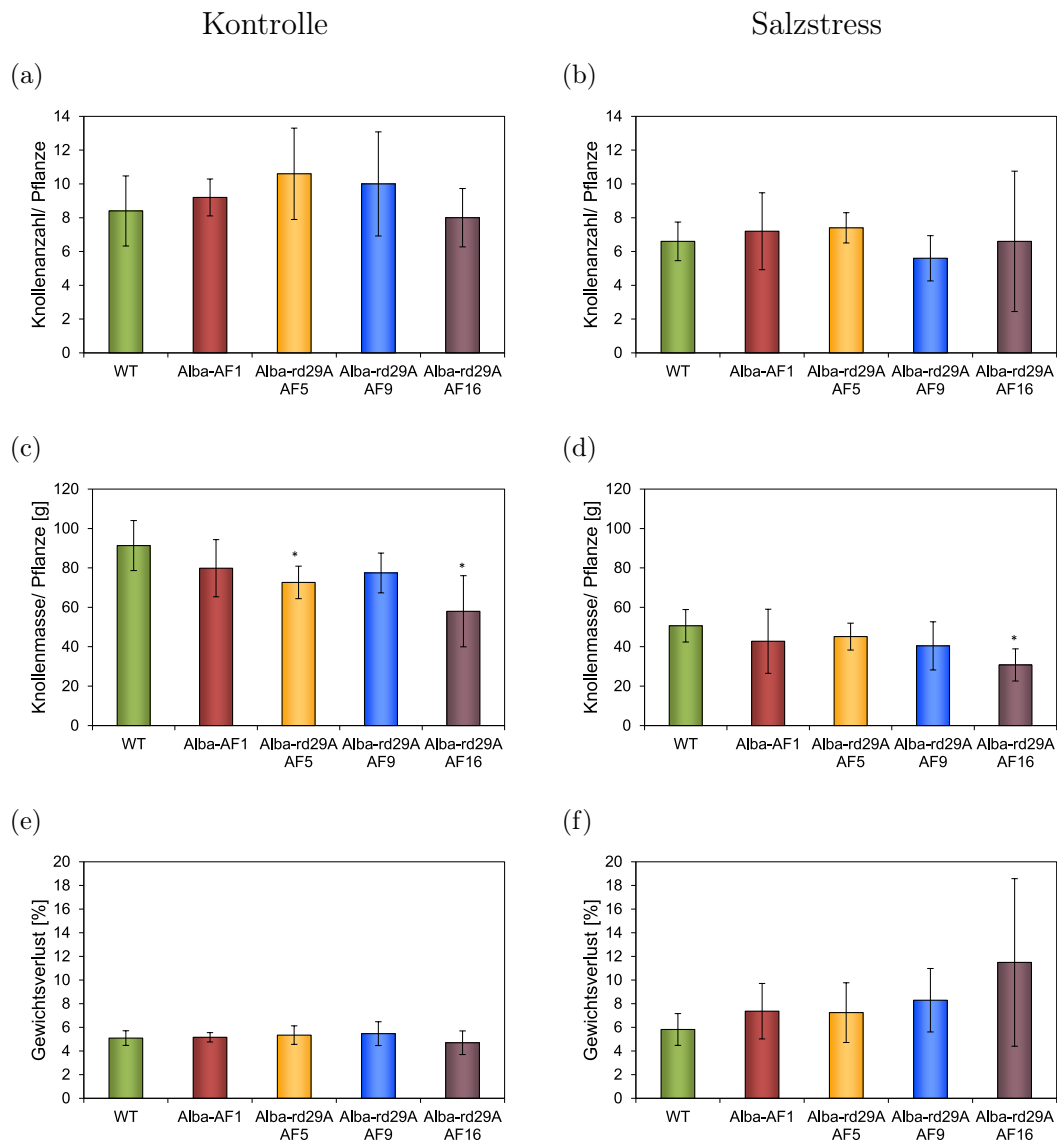


Abbildung 3.22: Ertrag und Lagerungsschwund der transgenen Linien im Vergleich zur Wildtyp-Linie unter Kontroll- (links) bzw. Salzstressbedingungen (rechts). (a), (b): Knollenanzahl pro Pflanze; (c), (d): Knollenmasse pro Pflanze; (e), (f): Prozentualer Gewichtsverlust der Knollen nach drei Monaten Lagerung bei 4° C im Dunkeln.

Nach drei Monaten Lagerung bei 4° C zeigten sowohl die Knollen der salzgestressten transgenen Linien als auch des Wildtyps geringfügig größere Frischmasseverluste als Knollen der Kontrollpflanzen. Zwischen dem Wildtyp und den transgenen Linien wurden unabhängig von der Kulturbedingung jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gewichtsverlustes ermittelt (Abb. 3.22e, f).

Ein Vergleich der Knollenmorphologie aller Linien beider Kulturbedingungen lässt ebenfalls keine Differenzen erkennen (Abb. 3.23).





Abbildung 3.23: Vergleich der Knollenmorphologie der transgenen Linien Alba-rd29A-AF5, 9 und 16 mit dem Wildtyp unter (a) Kontroll- bzw. (b) Salzstressbedingungen.

**3.4.2.2.3 Gaschromatografische Analyse** Für die Bestimmung der GG-Akkumulation wurde bei der ersten Probenahme, das heißt vor Beginn der Stressphase nur das drittjüngste Blatt jeder Pflanze untersucht.

Mit durchschnittlich 10  $\mu\text{mol}$  GG/g FM akkumulierte Alba-AF1 zu diesem Zeitpunkt die erwartete Menge an GG. Trotz der Expressionskontrolle durch den salzinduzierbaren Promotor *rd29A* konnte auch in den transgenen Linien Alba-*rd29A*-AF5, 9 und 16 schon unter Kontrollbedingungen eine deutliche GG-Akkumulation nachgewiesen werden, die jedoch mit 4 bis 5,5  $\mu\text{mol}$ /g FM im Vergleich zu Alba-AF1 um etwa 50 % geringer war (Abb. 3.24). Die geringen Saccharose-Gehalte in den transgenen Linien unterschieden sich mit 0,5 bis 0,9  $\mu\text{mol}$ /g FM nicht vom Saccharose-Gehalt im Wildtyp. Auch die Fructose- und Glucose-Werte sowie die Prolin-Gehalte zeigten keine signifikanten Differenzen im Vergleich zu den Wildtyppflanzen.

Eine weitere Probe wurde nach drei Wochen der Stressphase analysiert. Die beprobten jungen Blätter von Alba-AF1 wiesen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Salzstressbedingungen wiederum eine deutliche Abnahme des GG-Wertes auf (Abb. 3.25). Dagegen blieb die GG-Menge mit 3,3 bis 4,4  $\mu\text{mol}$ /g FM in den transgenen Linien Alba-*rd29A*-AF5, 9 und 16 unter Kontrollbedingungen fast unverändert. Verglichen mit dem Kontrollversuch lagen die Werte der GG-Akkumulation unter Salzstressbedingungen dieser Linien signifikant um bis zu 5,2  $\mu\text{mol}$ /g FM erhöht vor.

Im Vergleich zur ersten Probenahme blieben die Saccharose-Gehalte unter Salzstressbedingungen in allen untersuchten Linien nahezu unverändert, wogegen signifikant erhöhte Mengen unter Kontrollbedingungen nachgewiesen wurden. Innerhalb der einzelnen Kulturbedingungen konnten diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp festgestellt werden.

Auch die Prolin- sowie Fructose- und Glucose-Gehalte zeigten im Kontrollversuch keine Veränderung zur ersten Probenahme. In den salzgestressten Pflanzen dagegen stiegen nicht nur die Fructose- und Glucose-Gehalte aller Linien signifikant an. Insbesondere die Prolin-Werte nahmen um etwa das zehnfache zu.

Im Stressversuch wurden neben den Linien Alba-*rd29A*-AF5, 9 und 16 sowie Alba-AF1 und dem Wildtyp zwei Linien mitgeführt, bei denen das  $\beta$ -*Glucuronidase*-Gen unter der Kontrolle des *rd29A*-Promotors stand. Mittels der X-Gluc-Färbung (siehe Abschnitt 2.2) konnte eine Blaufärbung und damit die Expression des Gens in den Knollen von Pflanzen aus beiden Kulturbedingungen nachgewiesen werden (Abb. 3.26). Demzufolge sollte die Expression des *ggpPS*-Gens durch den *rd29A*-Promotor ebenso in Knollen möglich sein. In der GC-Analyse bestätigte sich diese Erwartung (Abb. 3.27). In den Knollen der transgenen Linien Alba-*rd29A*-AF5, 9 und 16 wurden GG-Gehalte von 0,6 bis 1,3  $\mu\text{mol}$ /g FM unter Kontrollbedingungen und sogar 2 bis 2,6  $\mu\text{mol}$ /g FM unter Salzstressbedingungen ermittelt. Die Knollen der Linie Alba-AF1 sowie des Wildtyps wiesen wie in den vorangegangenen Stressexperimenten dagegen kein GG auf.

In weiteren Probennahmen, die eine Woche bzw. fünf Wochen nach Beginn der Stressphase erfolgten, wurde wie in den Alba-AF-Linien auch in den Alba-*rd29A*-Linien eine Abhängigkeit der GG-Akkumulation vom Entwicklungsstadium des Blattes und der Zeit der Kultivierung untersucht. Auch in diesem Versuch wurden in den jungen Blättern der transgenen Pflanzen größere Mengen an GG detektiert als in den alten Blättern (Daten nicht dargestellt). Außerdem nahm die GG-Akkumulation auch in den jungen Blättern der Alba AF-*rd29A*-Linien mit steigender Kultivierungszeit ab, wobei diese Abnahme unter Kontrollbedingungen deutlich langsamer verlief als in der Linie Alba-AF1 (Abb. 3.28a). Im Salzstressversuch dagegen stiegen die GG-Werte in den Blättern der Alba-AF-*rd29A*-Linien innerhalb der folgenden zwei Wochen nach Beginn der Stressphase zunächst deutlich an und verringerten sich danach ebenfalls (Abb. 3.28b).

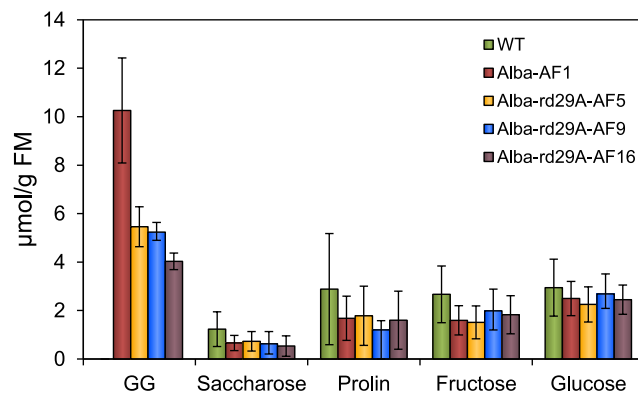


Abbildung 3.24: Akkumulation ausgewählter niedermolekularer Verbindungen in jungen Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp vor dem Beginn der Stressphase.

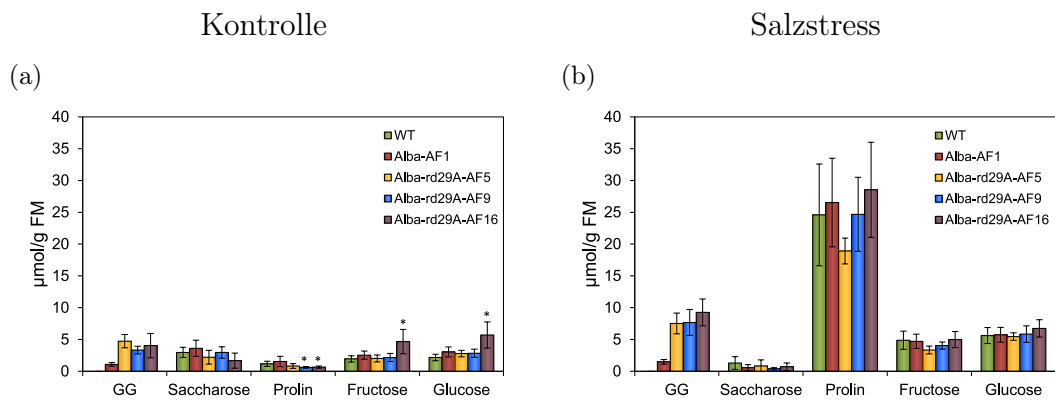


Abbildung 3.25: Akkumulation ausgewählter niedermolekularer Verbindungen in jungen Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp nach dreiwöchiger Stressphase; (a) Kontrolle; (b) Salzstress.

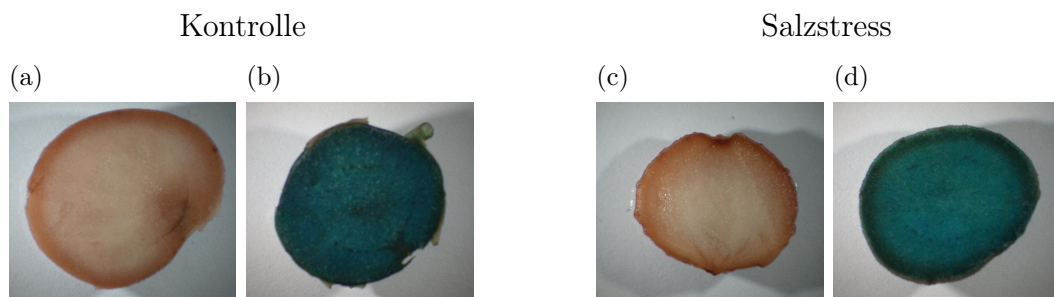


Abbildung 3.26: X-Gluc Färbung von Knollen des Wildtyps (a), (c) und der transgenen Linie Alba-rd29A-GUS1 (b), (d) aus dem Kontroll- (links) und dem Salzstressversuch (rechts).



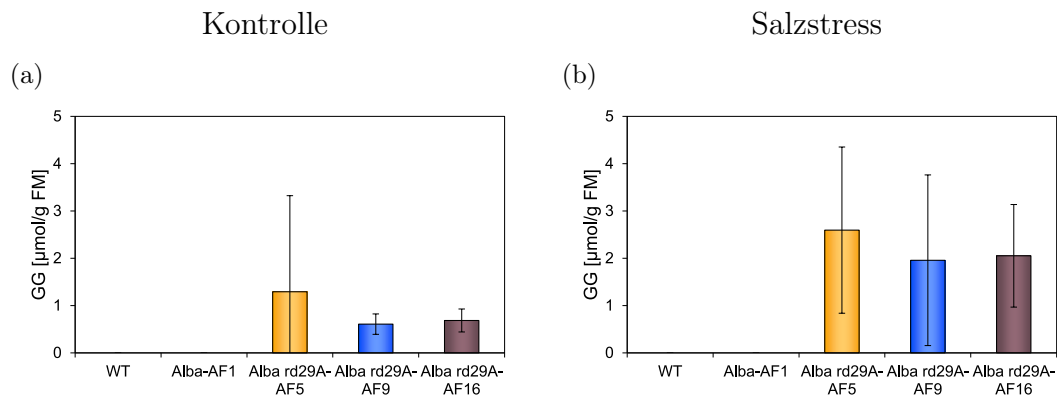


Abbildung 3.27: Akkumulation von GG in den Knollen aller untersuchten transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp aus dem (a) Kontroll- und (b) Salzstressversuch.

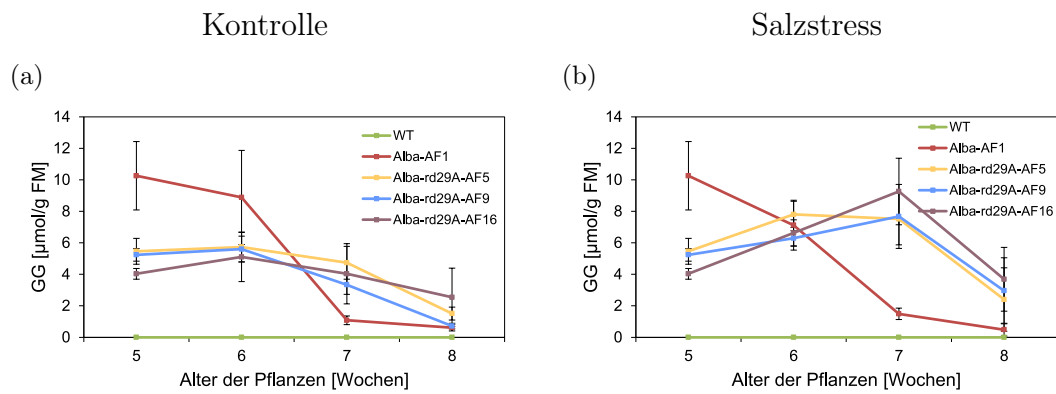


Abbildung 3.28: Akkumulation von GG in jungen Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit unter (a) Kontroll- und (b) Salzstressbedingungen.



## 4 Diskussion

Die abiotischen Faktoren Trockenheit und Salzstress rufen in Pflanzen zum Teil identische Reaktionen hervor. Trockenheit bedeutet für die Pflanze eine reduzierte Wasseraufnahme, die zu osmotischem Stress führt. Salz wirkt in zwei Phasen auf Pflanzen, wovon in der ersten Phase ebenfalls eine reduzierte Wasseraufnahme und somit osmotischer Stress zu Wachstumseinbußen, verspäteter Blütenbildung und reduzierter Samenproduktion führt. Die salzspezifischen Stressreaktionen treten als Antwort auf den zusätzlichen ionischen Stress erst in der zweiten Phase innerhalb von Tagen und Wochen bei Pflanzen auf und zeigen sich zunächst an Schädigungen der alten Blätter, die dann absterben. Anhaltender Stress wirkt sich in der Folge auch auf die jungen Blätter und letztendlich auf die gesamte Pflanze aus, die dann möglicherweise noch vor der Samenbildung abstirbt (Munns, 2002).

Wie einleitend erwähnt, sind Salz- und Trockenstressanpassung nicht nur von akademischem Interesse, sondern auch für die Züchtung von Nutzpflanzen von Bedeutung, da diese Umweltfaktoren wesentlich für Ertragslimitierungen verantwortlich sind. So wurden in den letzten Jahren schon vielfältige Bemühungen unternommen, die Trocken- und Salztoleranz verschiedener Nutzpflanzen durch Expression von Genen, z.B. für die Synthese diverser *compatible solutes* zu verbessern (siehe Abschnitt 1).

Zu Beginn meiner Arbeit lagen keine Untersuchungen vor, in denen *compatible solutes* aus der Gruppe der Heteroside auf ihre Wirkung in Nutzpflanzen getestet wurden. In Vorversuchen an der Universität Rostock wurde die Synthese des Heterosids Glucosylglycerol (GG) zuvor mit dem *ggs*-Gen aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* in der Kartoffelsorte Désirée etabliert. Diese Versuche führten aber nur zur Akkumulation sehr geringer GG-Mengen (Marquardt, 2001). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass die GG-Synthese auch mittels eines alternativen *ggs*-Gens aus *A. vinelandii* im Modellorganismus *A. thaliana* etabliert werden konnte, wobei sehr hohe GG-Gehalte und eine leicht verbesserte Stresstoleranz in transgenen Pflanzen erzielt wurden (Klähn et al., 2009). Diese Arbeiten dienten als Ausgangspunkt für meine erneuten Versuche, GG-akkumulierende Kartoffelpflanzen zu erzeugen und bezüglich ihrer Stresstoleranz zu untersuchen.

### 4.1 Optimierung des Transformationsprotokolls

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Kartoffel prinzipiell gut mit Agrobakterien-vermitteltem Gentransfer transformieren lässt. Allerdings soll bezüglich der Transformierbarkeit von Kartoffelpflanzen eine Sortenabhängigkeit bestehen (Dale u. Hampson, 1995). Das wurde auch in unseren Experimenten klar ersichtlich. Die Transformation des *ggs*-Gens mit Hilfe des pLH-AF-Konstruktes (siehe Abschnitt 3.1) blieb bei den Sorten Terrana und Pelikan trotz wiederholter Bemühungen erfolglos, wogegen die Transformation in die Sorte Albatros mit einer reproduzierbaren Selektionsrate von etwa 11% erfolgreich war. Zudem traten Probleme bei der Selektion transgener Calli bzw. regenerierter Sprosse auf, sodass nach der Transformation der pGreen-Konstrukte pG0029-SF und pG0029-TP-SF unter Anwendung der Kanamycin-Selektion fast ausschließlich *Falsch-positive* Regenerate vorlagen.

Deshalb wurden umfangreiche Versuche durchgeführt, um die Transformationsrate transgener Kartoffeln zu erhöhen. Dazu wurden zahlreiche Modifikationen im Transformationsprotokoll I (Abschnitt 2.2) vorgenommen, die letztendlich in der bevorzugten Verwendung von Sprossstücken und der Zugabe von Acetosyringon zur Agrobakterienkultur sowie von Indol-3-Essigsäure zum Wurzelinduktionsmedium resultierten. Diese Bemühungen führten zu einem optimierten Transformationsprotokoll II (Abschnitt 2.2). Mit Hilfe dieses Protokolls wurde die Transformierbarkeit der Sorte Albatros stark optimiert, so dass der Anteil transgener Pflanzen unter den regenerierten Sprossen bis auf 80 % gesteigert werden konnte. Diese hohe Transformationseffizienz würde sogar eine Markergen-freie Kartoffeltransformation erlauben, bei der transgene Pflanzen aufgrund des Phänotyps (hier GG-Akkumulation) bzw. des Genotyps (Transgennachweis mittels PCR) selektiert werden. Die Diskussion um die Gefahren durch transgene Pflanzen stützt sich immer wieder auf die Verwendung von Antibiotika-Markergenen, die der Selektion von Transgen-positiven Pflanzen dienen und für die menschliche Gesundheit mit Risiken behaftet ist ([www.biosicherheit.de](http://www.biosicherheit.de), [www.transgen.de](http://www.transgen.de)). Allerdings gelang es trotz mehrfacher Versuche auch mit dem optimierten Transformationsprotokoll nicht, die Sorten Terrana und Pelikan erfolgreich mit den hier erzeugten Vektoren zu transformieren.

## 4.2 Etablierung der GG-Synthese in *S. tuberosum*

Aufbauend auf den Versuchen mit *Arabidopsis* (Klähn et al., 2009) ist es auch mir gelungen, GG-akkumulierende transgene Kartoffelpflanzen zu erzeugen. Es konnten in etwa gleichgroße GG-Gehalte wie zuvor in *Arabidopsis* nachgewiesen werden. Die erzielten Werte von bis zu 19  $\mu\text{mol GG/g FM}$  in jungen Blättern (17  $\mu\text{mol/g FM}$  in *Arabidopsis*), die unter Verwendung des 35S-Promotors zur konstitutiven Expression des *gppPS*-Gens erreicht wurden, sind relativ hoch und machen etwa 0,5 % der Frischmasse (ca. 5 % der Trockenmasse) des Blattes aus. Gegenüber den Vorversuchen zur Erzeugung GG-synthetisierender Kartoffelpflanzen unter Verwendung des *gppS*-Gens aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* ist das eine bis zu 50fache Steigerung (0,3–0,7  $\mu\text{mol GG/g FM}$ , (Marquardt, 2001)). Auch im Vergleich mit anderen Arbeiten, in denen *compatible solute*-Synthesegene aus Mikroorganismen in Pflanzen exprimiert wurden (siehe Abschnitt 1), ist die erreichte Menge sehr hoch.

Die in den transgenen Kartoffellinien erreichten GG-Mengen gleichen den Glycinbetain-Gehalten in verschiedenen Pflanzenspezies wie Spinat, Sonnenblume, Weizen oder Gerste, die dieses *compatible solute* natürlicher Weise akkumulieren. Unter Trocken- und Salzstressbedingungen wurden zwischen 4 und 40  $\mu\text{mol Glycinbetain/g FM}$  (5–10  $\mu\text{mol/g FM}$  unter Kontrollbedingungen) detektiert (Rhodes u. Hanson, 1993). Somit kann man annehmen, dass die erzielten GG-Mengen im Blatt auch von osmotischer bzw. schützender Relevanz sind. Im Cyanobakterium *M. firma* wurden GG-Gehalte von bis zu 20 % der Trockenmasse nachgewiesen (Hagemann et al., 1987), die jedoch bei einer dem Meerwasser entsprechenden Salinität von rund 50–55 dS/m (684 mM NaCl) detektiert wurden. Die Akkumulation eines *compatible solutes* ist häufig von der Expression der entsprechenden Synthesegene, von der Spezies sowie der Stressintensität abhängig. So sank die GG-Menge in dem Cyanobakterium auch bei verringerter Salzbelastung. Bei einer Salzkonzentration von 55–66 mM, die der auf Kartoffeln applizierten Salinität von 5–6 dS/m entspricht, sind die GG-Gehalte in *M. firma* in etwa so hoch wie in jungen Blättern transgener Albatros-Pflanzen. Bei Kulturpflanzen wie der Kartoffel ist es wahrscheinlich nicht erforderlich, eine extrem hohe Akkumulation von *compatible solutes* zu erreichen und damit eine sehr hohe Salztoleranz zu entwickeln, da die landwirtschaftlichen Nutzflächen geringere Salinitäten

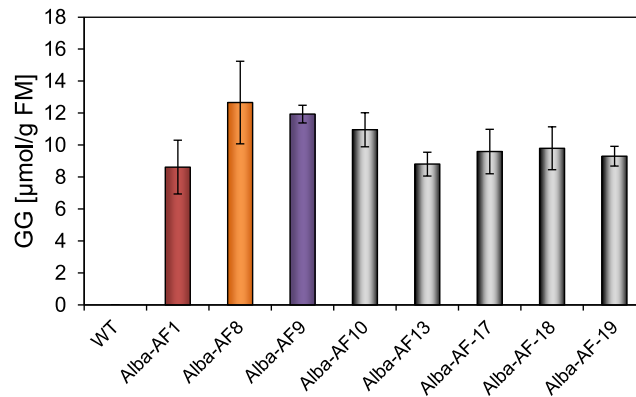


Abbildung 4.1: Mittelwerte der GG-Gehalte in jungen Blättern verschiedener transgener Alba-AF-Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die Probenahme erfolgte vierwöchiger Anzucht der Pflanzen unter Kontrollbedingungen im Gewächshaus. Nur die Pflanzen der Linien Alba-AF1, 8 und 9 wurden hier näher charakterisiert.

erreichen. Ab einer Salinität von mindestens 4 dS/m wird ein Boden als salzbelastet eingestuft. Somit sollten die hier erreichten GG-Mengen auf normal belasteten Flächen ausreichend für eine Toleranzverbesserung sein.

Inwieweit eine weitere Erhöhung des GG-Gehaltes in Kartoffelpflanzen überhaupt möglich ist, bleibt fraglich. Mit den verwendeten Genen und Promotoren ist dies eher nicht zu erwarten. Insgesamt wurden mehr als 37 GG-akkumulierende transgene Linien in wiederholten Transformationsversuchen regeneriert, die das *gppPS*-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors im pLH-Vektor enthielten. In keiner dieser Pflanzen wurde ein GG-Gehalt über die bisher genannten Werte hinaus erreicht. Die Abbildung 4.1 zeigt anhand einiger dieser zusätzlich erhaltenen Alba-AF-Linien die GG-Werte, die in den jungen Blättern nach vierwöchiger Anzucht von je fünf Pflanzen dieser Linien unter Kontrollbedingungen im Gewächshaus nachgewiesen wurden. Versuche an *Arabidopsis* haben zudem gezeigt, dass eine extreme GG-Akkumulation sich bereits negativ auf das Wachstum unter Kontrollbedingungen auswirken kann (Klähn et al., 2009). Solche Beobachtungen wurden bei den transgenen Kartoffeln nicht gemacht. Hier ergab sich eher eine Korrelation zwischen der GG-Menge und verbessertem Sprosswachstum unter Kontroll- sowie Stressbedingungen (Abb. 3.11).

Obwohl davon auszugehen ist, dass sich das GG im Cytoplasma anreichert, ist nicht ganz auszuschließen, dass in der Vakuole z.B. eine zusätzliche GG-Akkumulation stattfindet, wie das bei anderen Osmolyten wie Mannitol oder auch Prolin bereits gezeigt wurde (Yamaki, 1982; Keller u. Matile, 1989; Nadwodnik u. Lohaus, 2008; Martinoia et al., 2007).

### 4.3 GG-Akkumulation in den transgenen Linien

Die Ergebnisse zeigen, dass die Menge der GG-Akkumulation in der Pflanze offensichtlich vom Entwicklungsstadium des Blattes und der gesamten Pflanze abhängt. Unter Verwendung des 35S-Promotors sind in den jungen Blättern und Stolonen transgener Pflanzen größere GG-Mengen nachgewiesen worden als in älteren Blättern. In den Knollen dagegen wurde überhaupt kein GG detektiert. Diese Befunde waren sehr gut reproduzierbar, aber auch unerwartet. Unter der Kontrolle des 35S-Promotors sollte die Expression des *gppPS*-Gens in den Pflanzen konstitutiv

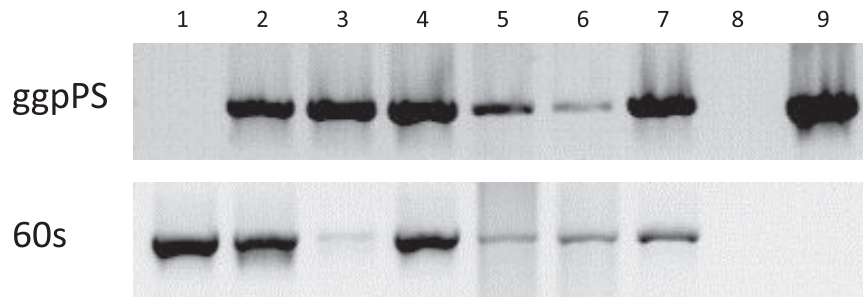


Abbildung 4.2: Nachweis der *ggpPS*-Expression mittels RT-PCR. Die Gesamt RNA wurde aus unterschiedlich alten Pflanzenorganen vor der Stressphase (5 Wochen alte Pflanzen) und während der Stressphase (8 Wochen alte Pflanzen) sowie aus Stolonen und Knollen der transgenen Linie Alba-AF1 isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die anschließende PCR wurden die Primer AF-PCR-S und -A zum Nachweis von *ggpPS* bzw. der ribosomalen 60s-Untereinheit. Bahn 1: WT-Kontrolle; Bahn 2-7: Alba-AF1; Bahn 2: Blatt 3 der ersten Probenahme; Bahn 3: Blatt 7 der ersten Probenahme; Bahn 4: Blatt 3 der zweiten Probenahme; Bahn 5: Blatt 7 der zweiten Probenahme; Bahn 6: Stolon; Bahn 7: Knolle; Bahn 8: mRNA des 3. Blattes aus der ersten Probenahme (Kontrolle auf DNA-Kontamination); Bahn 9: pLH-AF-Plasmid-DNA (*ggpPS*-Kontrolle)

erfolgen, so dass die einmal beobachtete GG-Akkumulation zumindest in der weiteren Entwicklung der Blätter unverändert bleiben sollte. Es kam nicht nur zur Abnahme in alternden Blättern, sondern auch junge Blätter an älteren Pflanzen enthielten GG-Mengen, die nahe der Nachweisgrenze lagen. Die unterschiedlich starke GG-Akkumulation in den verschiedenen Organen bzw. Altersstufen der transgenen Pflanzen könnte vermuten lassen, dass die Expression des *ggpPS*-Fremdgens unter der Kontrolle des 35S-Promotors variiert. Verschiedene Untersuchungen beschreiben eine Abhängigkeit der Expressionsstärke dieses Promotors von Pflanzenspezies, Organ und Entwicklungsstadium der Pflanze (Malik et al., 2002; Holtorf et al., 1995; Terada u. Shimamoto, 1990; Sunilkumar et al., 2002; Williamson et al., 1989). Daher wäre es auch hier möglich, dass in den GG-freien Organen eine Expression des *ggpPS*-Gens ausblieb. Mittels Expressionsuntersuchungen wurde nachgewiesen, dass diese Annahme nicht zutrifft. Das *ggpPS*-Gen wurde in allen untersuchten Geweben grundsätzlich exprimiert (Abb. 4.2). Die RT-PCR erlaubt zwar keine Quantifizierung der Expressionsstärke, es wird jedoch deutlich, dass auch in den Knollen ohne GG-Akkumulation und den alten Blättern mit sehr geringer GG-Akkumulation große Mengen an *ggpPS*-mRNA vorliegen, die sich nicht signifikant von denen in jungen Blättern mit hoher GG-Akkumulation unterscheiden.

Auch wenn die Expression des *ggpPS*-Gens unter der Kontrolle des 35S-Promotors nicht in allen Organen der Kartoffelpflanze gleich stark sein sollte, ist eine derart große Differenz in der GG-Menge zwischen verschieden alten gleichartigen Organen nicht zu erklären. Leider war es nicht möglich, das GgpPS-Protein mittels Western-Blot nachzuweisen. Im Gegensatz zu den Arabidopsis-Pflanzen, in denen der vorhandene Antikörper spezifisch das Fremdprotein nachwies, konnten auch in jungen GG-akkumulierenden Blättern keine spezifischen Signale nachgewiesen werden. Aufgrund der großen GG-Akkumulation und der Anwesenheit der mRNA kann man jedoch davon ausgehen, dass auch aktives GgpPS-Protein in den transgenen Kartoffelpflanzen hergestellt wird.

Somit stellt sich die Frage, warum die GG-Akkumulation in alternden Organen abnimmt oder sogar ausbleibt. Als mögliche Ursachen könnten eine posttranskriptionelle Kontrolle oder eine gestörte Proteinbiosynthese bzw. -abbau in Frage kommen. Beides erscheint unwahrscheinlich, da der Pflanze sowohl die mRNA des *gppPS*-Gen als auch das GgpPS-Protein unbekannt sind und eine gezielte und entwicklungsspezifische Regulation dieser Mechanismen nötig wäre. Für die Saccharosephosphat-Synthase (SPS) in Spinat ist gut belegt, dass die Enzymaktivität reversibel durch Proteinphosphorylierung in Abhängigkeit von der Menge an Vorstufen an- und abgeschaltet wird (Huber u. Huber, 1996). Vielleicht ist das auch bei der GgpPS möglich. Weder aus *Synechocystis* noch aus *A. vinelandii* ist bekannt, dass eine Regulation der GgpS bzw. GgpPS über Phosphorylierung stattfindet. Mit Hilfe des *NetPhos-Servers* des *center for biological sequence analysis* der Technischen Universität Dänemark ([www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) werden jedoch potentielle Phosphorylierungsstellen vorausgesagt, die eine Möglichkeit für eine Regulation der GgpPS-Aktivität über Phosphorylierung durch pflanzliche Kinasen bieten könnten.

Alternativ zur Regulation der Enzymmenge und -aktivität für die GG-Synthese, könnte GG auch durch eine Glucosidase in alternden Organen abgebaut werden. Eine Glucosidase in Kartoffelpflanzen muss prinzipiell angenommen werden, denn GG nimmt auch in alten Blättern ab, die zuvor große Mengen enthielten. Theoretisch wäre auch ein Transport von GG nach dem *source-sink-Prinzip* möglich. In diesem Fall dienen die alten Blätter als *source*-Organe, die in der vegetativen Entwicklung der Pflanze die jungen Blätter der Sprossspitze sowie die Wurzelspitze (*sink*-Organe) mit Assimilaten versorgen. Sollte GG auf diese Weise in der Pflanze transportiert werden, würde das die hohe GG-Akkumulation in den jungen Blättern im Vergleich zu den alten Blättern erklären. Mit der Ausbildung der Stolone geht die Pflanze in die Reproduktionsphase über, die dann zu *sink*-Organen werden und von den *source*-Organen, zu denen nun neben den alten Blättern auch die jungen Blätter zählen, versorgt werden. Damit sinkt der GG-Gehalt in den jungen Blättern im Verlauf der Entwicklung, wogegen in den Stolonen eine hohe GG-Akkumulation nachweisbar wird, die das Niveau von jungen Blättern nach etwa fünf Wochen Kultivierung erreicht.

Ein anderer Grund für die geringe GG-Akkumulation in alternden Blattorganen könnte ein Mangel an Ausgangsstoffen sein. GG konkurriert möglicherweise mit der Saccharose um UDP-Glucose. In Kartoffelpflanzen sind vier Isoenzyme der SPS bekannt, deren Verteilung u.a. vom Gewebe und dem Entwicklungsstadium der Blätter abhängt. Insgesamt ist in den alternden *source*-Organen ein größerer Gehalt an SPS nachweisbar als in den jungen Blättern (Reimholz et al., 1997), so dass dort vielleicht mehr UDP-Glucose durch die SPS verbraucht wird. Leider ist der  $K_m$ -Wert der GgpPS für UDP-Glucose nicht bekannt, so dass ein Vergleich mit dem  $K_m = 2.5$  mM ([www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)) der Saccharosephosphat-Synthase (SPS) für UDP-Glucose nicht anhand von Werten diskutiert werden kann. Andererseits kann das GgpPS-Protein neben UDP-Glucose zusätzlich ADP-Glucose als Ausgangsstoff verwenden, womit eine Limitierung durch einen UDP-Glucose-Mangel nicht unbedingt ursächlich für den GG-Rückgang in alten Blättern sein muss. Zudem ist ein Mangel an UDP-Glucose für eine GG-Synthese in den Knollen nicht zu erwarten, da in Kartoffelpflanzen Saccharose aus *source*-Blättern hauptsächlich in Knollen transportiert und dort abgebaut wird. Der Abbau erfolgt unter anderem durch die Saccharose-Synthase (SuSy), wobei UDP-Glucose entsteht. Zudem ist der UDP-Glucose-Gehalt in den Knollen von Kartoffelpflanzen mit etwa 98 nmol/g FM z.B. in der Sorte Désirée (Baroja-Fernández et al., 2009) sogar höher als in den Blättern, die etwa 52 nmol/g FM (Baroja-Fernández et al., 2004) enthalten.

## 4.4 Einfluss der GG-Synthese auf den Gehalt anderer Metabolite

Saccharose stellt in Pflanzen die wichtigste Speicher- und Transportform für Zucker von *source*- zu *sink*-Organen dar und ist selbst oder über ihre synthetisierenden bzw. abbauenden Enzyme in die Synthese anderer Metabolite und Zuckersignalwege involviert (Rosa et al., 2009). Zum Beispiel scheint die Saccharose auf Transkriptionsebene die Synthese von Aminosäuren (u.a. Prolin) in Speicherorganen wie den Kartoffelknollen zu beeinflussen, wobei der Aminosäuregehalt bei sinkendem Saccharosegehalt ansteigt und umgekehrt (Roessner-Tunali et al., 2003). Auch unter Stressbedingungen spielt Saccharose eine wichtige Rolle. Die Saccharose-Synthese wird in Knollen bei moderatem osmotischen Stress durch die SPS induziert, wodurch zusätzlich die Stärkesynthese inhibiert wird (Geigenberger et al., 1999). Auch in vielen anderen Pflanzen dient Saccharose als *compatible solute* zur Bewältigung moderater Stressbedingungen (Balibrea et al., 2000; Hu et al., 2000). Außerdem ist der Saccharosemetabolismus mit der Stärkesynthese in Blättern verbunden. Der Abbau von Saccharose mittels SuSy führt im Cytoplasma zur Synthese von UDP- und auch ADP-Glucose, das dann in die Chloroplasten transportiert wird und dort der Stärkesynthese zur Verfügung steht (Muñoz et al., 2005). Auch in Knollen ist die SuSy aktiv, wo sie die intrazellulären Gehalte an UDP- und ADP-Glucose sowie Stärke und somit auch den Ertrag beeinflusst (Baroja-Fernández et al., 2009). Diese Arbeiten zeigen, welche wichtige Rolle der Saccharosemetabolismus in der Pflanze einnimmt. Da wie bereits erwähnt, GG- und Saccharose-Synthese von UDP-Glucose abhängen, müssen auch die Auswirkung der GG-Akkumulation auf den Saccharose-Gehalt und umgekehrt sowie die damit verbundenen möglichen Einflüsse auf andere Metabolite der transgenen Pflanzen betrachtet werden.

Die Saccharose-Synthese scheint nach den Ergebnissen der Bestimmung der löslichen Zucker mittels GC-Analyse in den transgenen Kartoffellinien in Konkurrenz mit der GG-Synthese zu stehen, was möglicherweise die signifikant geringeren Saccharose- und ebenso Glucose- sowie Fructose-Gehalte im Vergleich zum Wildtyp nach vier bzw. fünf Wochen Kultivierung unter Kontrollbedingungen erklärt (Abb. 3.14). Nach der Kultivierung unter Stressbedingungen zeigten sich zu den parallel abnehmenden GG-Gehalten ansteigende Saccharose-Werte in Blättern der transgenen Pflanzen, die sogar die Saccharose-Mengen des Wildtyps unabhängig von den Kultivierungsbedingungen überstiegen. In diesen Pflanzen war dann auch kein Unterschied mehr im Glucose- und Fructose-Gehalt zwischen transgenen Pflanzen und dem Wildtyp festzustellen (Abb. 3.15). Zunächst könnte angenommen werden, dass sich diese Konkurrenz im Laufe der weiteren Entwicklung aufhebt und die Ursache im erhöhten Wachstum der transgenen Pflanzen verglichen mit dem Wildtyp liegt (Abb. 3.11). Sie besitzen damit eine größere fotosynthetische Aktivität, durch die auch ein größeres Angebot an Ausgangsstoffen sowohl für die Saccharose- als auch für die GG-Synthese bereitgestellt werden kann. Jedoch konnten auch für die Linie Alba-AF11 bezüglich der GG- und Saccharose-Gehalte die gleichen Beobachtungen gemacht werden wie für die Linien Alba-AF1, 8 und 9. Diese Linie zeigte aber kein signifikant erhöhtes Sprosslängenwachstum verglichen mit dem Wildtyp und nur geringe GG-Werte. Somit scheint der Saccharose-Gehalt in den transgenen Linien tatsächlich vom GG-Gehalt abzuhängen. Allerdings erklärt das nicht, dass die Saccharose-Werte dieser Pflanzen bei sehr geringen GG-Gehalten signifikant größer waren als der des Wildtyps.

Der Gewächshausversuch zur stressinduzierten Expression von *gppPS* zeigte außerdem eine starke Induktion der Prolin-Synthese unter Salzstress. Prolin spielt in Pflanzen innerhalb vieler Prozesse eine wichtige Rolle. Diese Aminosäure wird nicht nur für die Proteinsynthese benötigt,



sondern ist zudem wahrscheinlich in die Regulation des Zellwachstums und der Blühinduktion involviert (Mattioli et al., 2009). Die Prolin-Synthese wird jedoch auch unter Stressbedingungen von vielen Pflanzen induziert. Prolin ist aufgrund seiner Struktur auch ein mögliches *compatible solute* (Delauney u. Verma, 1993; Kishor et al., 1995; Lehmann et al., 2010, 2011). Daneben wird vermutet, dass Prolin ein Speicher für Kohlenstoff und Stickstoff darstellt, für die Proteinsynthese zur Verfügung gestellt wird und direkt Proteine stabilisiert oder wie auch in Kartoffelpflanzen als *compatible solute* fungiert (Verbruggen u. Hermans, 2008; Levy, 1983). Dass der Prolinanstieg unter Salzstressbedingungen in den Pflanzen mit dem 35S:gppPS-Konstrukt im Gewächshausversuch nicht zu beobachten war, lag vermutlich an der um 1 dS/m (10 mM NaCl) geringeren Salinität des Bodens im Vergleich zum Versuch mit stressinduzierter *gppPS*-Expression. Dass die Ursache für den Prolinanstieg mit der Expression des *gppPS*-Gens zusammenhängt, ist auszuschließen, da die Prolin-Gehalte keinen signifikanten Unterschied zwischen transgenen Pflanzen und dem Wildtyp aufwiesen.

## 4.5 Auswirkungen der GG-Akkumulation auf Wachstum und Ertrag

Die Akkumulation von GG wirkt sich offensichtlich nicht negativ auf die Morphologie der transgenen Kartoffelpflanzen aus, wie es bei Trehalose- oder Sorbitol-akkumulierenden Tabakpflanzen beobachtet wurde (Zhao et al., 2000; Yeo et al., 2000; Sheveleva et al., 1998), sondern scheint das Wachstum der Pflanzen positiv zu beeinflussen. Bei allen durchgeführten Gewächshausversuchen zur Expression des *gppPS*-Gens war unabhängig vom Promotor und der Kultivierungsbedingung bei allen untersuchten transgenen Linien ein größeres Sprosslängenwachstum als beim Wildtyp zu beobachten. Diese Wachstumssteigerung der vegetativen Organe führte jedoch nicht zu einem verbesserten Ertrag dieser Pflanzen. Obwohl die transgenen Linien verglichen mit den Wildtyppflanzen einen zum Teil signifikant erhöhten Knollenansatz besaßen, unterschieden sich die Werte der Knollenmasse oft nicht vom Wildtyp oder waren geringer. Dieser Befund wurde sowohl unter Kontroll- als auch Stressbedingungen gemacht.

Wie im Abschnitt 1 erwähnt, besitzt die Kartoffel als salzsensitive Nutzpflanze einen Salinitätsindex von 6,56, der eine Ertragsminderung um 50 % bei einer Salinität von etwa 5,5 dS/m beinhaltet. Auch in meinen Versuchen konnten derartige Ergebnisse erzielt werden. Unabhängig von der Pflanzenlinie nahm der Ertrag salzgestresster Pflanzen in allen durchgeführten Gewächshausversuchen gegenüber den Kontrollen um etwa 59 % ab. Der Ertrag von Kartoffelpflanzen ist vorwiegend von der fotosynthetischen Aktivität des Krautes und der Dauer der Wachstumsphase der Knollen abhängig. Je länger das Kraut hohe Fotosyntheseraten aufrechterhalten kann und das Größenwachstum der Knollen anhält desto höher ist der Ertrag (Dwelle, 2003). Doch trotz der größeren oberirdischen Biomasseproduktion der transgenen Pflanzen, die mit einer größeren fotosynthetisch aktiven Blattoberfläche einhergeht, und der unter Stressbedingungen um eine Woche längeren Wachstumsphase sowie eines teilweise verbesserten Knollenansatzes im Vergleich zum Wildtyp waren die Erträge nicht erhöht.

Bis zur Blüte besteht eine Konkurrenz zwischen der Entwicklung des oberirdischen und des unterirdischen Teils der Pflanze. In dieser Zeit werden die Knollenanlagen ausgebildet, was durch das verbesserte Wachstum der transgenen Pflanzen scheinbar nicht negativ beeinflusst wurde. Im Anschluss erfolgen die weitere Entwicklung der Knollen und die dortige Einlagerung der Assimilate. Diese Prozesse schienen in den transgenen Pflanzen nicht mehr verbessert, sondern eher



Abbildung 4.3: In vielen Fällen entwickelten sich die Knollen entlang der Topfwand. Hier sind die Knollen einer Pflanze der Linie Alba-rd29A-AF5 aus dem Kontrollversuch abgebildet.

limitiert zu sein, was sich in einer größeren Anzahl, aber geringeren Größe der Knollen zeigte. Hier wirkte sich die Topfanzucht im Gewächshaus möglicher Weise nachteilig aus. Auch die Wildtyppflanzen erreichten unter diesen Bedingungen lediglich etwa ein Sechstel des Ertrages, der unter natürlichen Bedingungen von der Sorte Albatros erwartet werden kann (Marktwarenwert: circa 1,4 kg pro Pflanze; mündliche Auskunft: NORIKA). Außerdem war bei der Ernte zu beobachten, dass sich die Knollen in vielen Fällen an der Topfwand entwickelten (Abb. 4.3), wodurch möglicherweise die Knollenentwicklung mechanisch behindert wurde. Die kleinere Knollengröße der transgenen Pflanzen erklärt möglicher Weise außerdem den erhöhten Gewichtsverlust im Vergleich zum Wildtyp der bei 4°C eingelagerten Knollen, da sie im Vergleich zu den Knollen des Wildtyps eine größere Oberfläche besitzen, über die sie Feuchtigkeit verlieren können.

Ein Vergleich der Knollenmorphologie der transgenen Linien mit dem Wildtyp zeigt keine Unterschiede, bis auf eine Ausnahme (Abb. 3.13). Pflanzen der Linie Alba-AF1 produzierten in allen Versuchen Knollen, die sich durch ihre längliche Form von der des Wildtyps unterschieden. Da sich dieses Phänomen jedoch auf diese Linie beschränkte und Linien mit ähnlich großen GG-Gehalten diesbezüglich keine Auffälligkeiten aufwiesen, ist davon auszugehen, dass es nicht auf die Akkumulation von GG zurückführbar ist. Viel näher liegt die Annahme, dass die Knollenmorphologie durch den Insertionsort des Transgens beeinflusst wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass Untersuchungen bezüglich einer Ertragssteigerung unter Stressbedingungen aufgrund der GG-Akkumulation in einem Gewächshausversuch mittels Topfanzucht schwierig durchzuführen sind und im Feldversuch erfolgen müssen, um aussagekräftige Resultate zu erzielen.

## 4.6 Stressinduzierte *gppPS*-Expression

Die meisten Versuche wurden mit Pflanzen durchgeführt, in denen das *gppPS*-Gen konstitutiv durch den 35S-Promotor exprimiert wurde. Das erklärt auch das bessere Wachstum unter Kontrollbedingungen. Unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Expression von *compatible solutes* unter Stressbedingungen und bedeutet für die Pflanze einen zusätzlichen Energieaufwand, so dass eine konstitutive heterologe Expression solcher Substanzen die Pflanze zusätzlich belasten und sich somit limitierend auf die Produktivität auswirken könnte. Beispielsweise wird in Prolinakkumulierenden Pflanzen wie Weizen, Tabak, Spinat, aber auch Kartoffel die Prolinsynthese unter Kontrollbedingungen über eine *feedback*-Hemmung reguliert, um eine unnötig hohe Prolinsynthese zu verhindern. Unter Stressbedingungen dagegen kann Prolin durch den erhöhten

Bedarf der Pflanze in einer bis zu 200fach gesteigerten Menge nachgewiesen werden, da dann die *feedback*-Hemmung aufgehoben ist (Binzel et al., 1987; Delauney u. Verma, 1993). So lässt die geringe Stresstoleranz der transgenen 35S:GppPS Kartoffellinien vermuten, dass möglicher Weise entweder die Menge an akkumuliertem GG nicht ausreichte oder eine Regulierbarkeit der Expression notwendig ist, um eine gesteigerte Toleranz zu erreichen. Bisher durchgeführte Untersuchungen zur heterologen Expression von Osmolytsynthesegenen bezogen sich in den meisten Fällen auf eine konstitutive Expression mittels des 35S-Promotors. Mir ist keine Arbeit bekannt, die sich mit einer stressinduzierten Expression von Osmolytsynthesegenen mit Hilfe eines salzregulierten Promotors, wie z.B. des rd29A-Promotors, beschäftigt hat. Die induzierte GG-Synthese mit Hilfe dieses Promotors ist somit für die Erzeugung von stresstoleranten Kartoffelpflanzen vorzuziehen, da dann die Menge an *compatible solute* bei Bedarf ansteigt.

Die Untersuchungen mit der rd29A-regulierten Expression des *gppPS*-Gens zeigten ähnliche Ergebnisse wie die Versuche zur konstitutiven Expression. Auch hier wurde bereits unter Kontrollbedingungen in den transgenen Pflanzen der Linien Alba-rd29-AF5, 9 und 16 eine GG-Akkumulation gemessen, die mit dem Alter der Blätter und der gesamten Pflanze abnahm. Das Wachstum der transgenen Pflanzen war im Vergleich zum Wildtyp teilweise erhöht, was aber auch in diesem Fall nicht zu einem gesteigerten Ertrag im Vergleich zum Wildtyp führte. Allerdings konnte eine stressinduzierte Zunahme des GG-Gehaltes nachgewiesen werden. Letztendlich wurde nicht nur in den Blättern und den Stolonen der untersuchten transgenen Alba-rd29A-Linien, sondern erstmalig auch in den Knollen GG detektiert.

Die gewebeunspezifische Aktivität des rd29A-Promotors in Kartoffelpflanzen wurde bereits gezeigt (Zhang et al., 2005). Auch in meinen Versuchen konnte durch GUS-Färbung nachgewiesen werden, dass der Promotor in Knollen und anderen Geweben aktiv ist (Abb. 3.26). Eventuell ist die Expression des *gppPS*-Gens in Knollen mit dem rd29A-Promotor sogar höher als mit dem 35S-Promotor. Die durchgeführten Versuche zeigten außerdem, dass der rd29A-Promotor bereits unter den gewählten Kontrollbedingungen aktiv ist, da in Reporterpflanzen auch hier klare GUS-Färbungen auftraten und in den transgenen Pflanzen GG synthetisiert wurde (Abb. 3.24). Das bestätigen auch Zhang et al. (2005), die in transgenen Pflanzen ebenfalls unter Kontrollbedingungen schon eine rd29A-Aktivität mittels GUS-Färbung beobachten konnten. Die konstitutive Aktivität beruht vermutlich darauf, dass der rd29A-Promotor nicht nur über das *dehydration-responsive element* (DRE) sondern ebenso über ein *ABA responsive element* (ABRE) aktiviert werden kann. Möglicherweise spielt auch der Salzgehalt des Gießwassers (Trinkwasser) eine Rolle. Laut Eurawasser ([www.eurawasser.de](http://www.eurawasser.de)) beträgt die Salinität des Trinkwassers in Rostock 634  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , was einer mittleren Versalzung entspricht (Withers et al., 1978), auf Pflanzen mit moderater Salzsensitivität bei genügender Auswaschung des Bodens jedoch keinen Einfluss hat (Richards, 1954). Vielleicht reicht diese Salinität bereits aus, um den rd29A-Promotor zu aktivieren und somit schon unter Kontrollbedingungen eine *gppPS*-Expression in den Linien Alba-rd29A-AF5, 9 und 16 zu verursachen, die jedoch nicht den maximalen GG-Gehalt der Linie Alba-AF1 (35S-Promotor) erreichte und somit offenbar keiner vollständigen Expressionsinduktion entspricht. Der Rückgang der GG-Akkumulation fiel mit der weiteren Entwicklung der Pflanze wesentlich geringer aus als unter konstitutiver *gppPS*-Expression. Daher waren trotz der geringeren GG-Werte der Alba-rd29A-Linien im Vergleich zur Linie Alba-AF1 zum Zeitpunkt der ersten Probenahme (fünf Wochen Wachstum) in älteren Pflanzen (nach acht Wochen der Kultivierung) sowohl unter Kontroll- als auch unter Salzstressbedingungen höhere GG-Gehalte in den Alba-rd29A-Linien nachweisbar (Abb. 3.28). Zudem war es möglich, eine salzabhängige Expression zu induzieren, die sich in einem vorübergehenden Anstieg der GG-Werte innerhalb der Stressphase widerspiegelte, die etwa das Niveau der Linie Alba-AF1 vor der Stressphase erreichten.

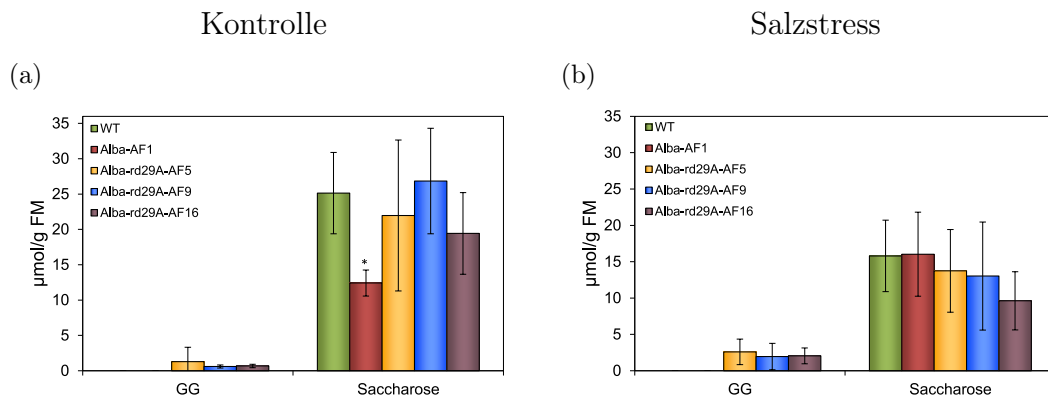


Abbildung 4.4: Mittelwerte der GG- und Saccharose-Gehalte in den Knollen der transgenen Linien Alba-rd29A AF5, 9 und 16 im Vergleich zum Wildtyp; (a) Kontrolle; (b) Salzstress.

Der Nachweis von GG in den Knollen (Abb. 3.27) war ein wichtiger Punkt, der zeigt, dass eine Akkumulation von GG in den Knollen, die vorher nicht beobachtet werden konnte, grundsätzlich möglich ist. Möglicherweise ist die Expression des *gppPS*-Gens mit Hilfe des rd29A-Promotors in den Knollen stärker verglichen mit der konstitutiven Expression anhand des 35S-Promotors. Die GG-Gehalte sind im Vergleich zu den GG-Mengen in den jungen Blättern sehr gering, wiesen aber ebenso einen salzinduzierten Anstieg wie die Werte der jungen Blätter auf. Auch hier scheint sich eine Konkurrenz zwischen der Saccharose- und der GG-Synthese zu zeigen (Abb. 4.4) Unter Kontrollbedingungen waren die GG-Werte so gering, dass bezüglich der Saccharose-Werte kein Unterschied zwischen Wildtyp und den transgenen rd29A-Linien zu beobachten war. Unter Salzstressbedingungen bewirkt ein Anstieg der GG-Akkumulation zwar keinen signifikanten jedoch tendenziell verringerten Saccharose-Gehalt verglichen mit dem Wildtyp und der Linie Alba-AF1 (ohne GG in der Knolle).

Allerdings ist nicht zu erklären, warum die Linie Alba-AF1 unter Kontrollbedingungen einen signifikant kleineren Saccharose-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Zunächst könnte ein Zusammenhang von der fehlenden GG-Akkumulation in den Knollen der Alba-AF-Linien (35S-Promotor) mit der Konkurrenz zwischen Saccharose- und GG-Synthese vermutet werden. Dies bestätigte sich jedoch nicht. In den Knollen der Linien Alba-AF1, 8 und 9 konnte nicht mehr Saccharose nachgewiesen werden als in den Linien Alba-rd29A-AF5, 9 und 16 (Daten nicht gezeigt), dass heißt die fehlende GG-Akkumulation ist nicht auf eine besonders große Saccharose-Synthese und einer damit limitierten Menge an UDP-Glucose in den Knollen zurückzuführen. Zudem wird, wie schon erwähnt, die Saccharose hauptsächlich in die Knollen transportiert und dort abgebaut und weniger synthetisiert.

## 4.7 Ausblick

Im Vergleich zu publizierten Daten zur heterologen Expression anderer *compatible solutes* wurden in dieser Arbeit relativ hohe Gehalte an GG in transgenen Kartoffelpflanzen erreicht. Trotz dieser hohen Menge an Schutzsubstanz und eines verbesserten Wachstums führte die GG-Akkumulation unter den gegebenen Bedingungen nicht zu einer Ertragssteigerung. Bisher ist es prinzipiell noch nicht gelungen, den Ertrag von Nutzpflanzen auf dem Feld in transgenen

Ansätzen mit Fremd-Osmolytsynthesegenen zu verbessern, obwohl die ersten Publikationen von Laborversuchen schon fast 20 Jahre zurückliegen und eine große Perspektive andeuteten. Auch unsere Untersuchungen im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen können nur Vorversuche sein, die jedoch keinen Aufschluss über die eigentliche Anwendung der erzeugten Pflanzen unter Feldbedingungen geben. Vor allem in Bezug auf den Ertrag, der letztendlich der wichtigste Zielparameter der Untersuchungen ist, kann anhand der Topfanzucht keine zuverlässige Aussage getroffen werden. Zudem können nur auf dem Feld Auswirkungen weiterer Umwelteinflüsse (z.B. Pathogenbefall) untersucht werden. Somit sind Feldversuche unverzichtbar, um das Anwendungspotential transgener Ansätze realistisch einzuschätzen.

Die an transgenen Kartoffelpflanzen erzielten Daten sind nicht zwangsläufig auf andere Systeme übertragbar. *A. thaliana* stellt innerhalb der Pflanzenforschung das Modell für alle höheren Pflanzen, insbesondere C3-Pflanzen dar. Doch gibt es auch eine Reihe von Arbeiten, die zeigen, dass sich nicht jegliche Untersuchungsergebnisse, die an einem Modell erzielt wurden, auf alle anderen Pflanzen übertragen lassen. Ein Beispiel ist die Transformation des *cox*-Gens aus *Arthrobacter pascens*, welches in Arabidopsis zu einer hohen, in Tabak jedoch zu einer niedrigen Expression und in beiden Pflanzenspezies letztendlich zu einer relativ geringen Akkumulation an Glycinbetain führte (Huang et al., 2000). Tabak gilt als Modell für Nutzpflanzen und ist bezüglich Untersuchungen zum Salzstress jedoch weniger geeignet, da Tabak unter Salzstressbedingungen hauptsächlich auf den damit zusammenhängenden Abfall des Wasserpotentials reagiert (Murthy u. Tester, 1996). Genauso kann die Synthese und Akkumulation eines *compatible solutes* zwischen verschiedenen Pflanzenarten variieren. Zum Beispiel führte die Überexpression des *p5cr*-Gens aus Sojabohne in Tabak zu keiner Erhöhung der osmotischen Toleranz mittels Prolin (Szoke et al., 1992). Zudem bewirkte auch die heterologe Expression des *cmo*-Gens aus Spinat in Tabak eine geringere als die in Spinat nachweisbare Glycinbetain-Anreicherung (Nuccio et al., 1998). Weiterhin ist die Menge an akkumulierten *compatible solute* nicht nur von der Pflanzenspezies sondern ebenso vom Ort der Expression abhängig, wie eine Untersuchung zur Prolinsynthese in Arabidopsis zeigte. Demnach führte die Expression eines Prolintransporters aus Gerste unter Kontrolle des 35S-Promotors zu einer Verringerung der Prolinakkumulation im oberirdischen Gewebe, auf die wahrscheinlich die beobachtete Reduktion der Biomasse zurückzuführen war. Dagegen resultierte die Expression dieses Transporters unter der Kontrolle des *root cap*-Promotors in einem gesteigerten Prolingehalt in der Wurzelspitze und erhöhtem Wurzelwachstum (Ueda et al., 2008). An diesen Beispielen ist zu erkennen, wie komplex eine heterologe Synthese von *compatible solutes* in verschiedenen Pflanzen ist, die von vielen Parametern abhängt.

Bezüglich GG ist zu erwarten, dass sich die Synthese mittels *gppPS*-Gen grundsätzlich auch auf andere Arten höherer Pflanzen übertragen lässt, wie der Vergleich mit Arabidopsis zeigt. Die Auswirkung bezüglich der Stresstoleranz in anderen Pflanzen bleibt zu überprüfen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen begründen sich auf die besonders anwendungsbezogenen Zielstellungen. Im Folgenden ergeben sich jedoch weitere Fragestellung für anschließende Untersuchungen, die in diesem Rahmen nicht geklärt werden konnten. Die Frage nach der Ursache für die Alters-, Entwicklungs- und auch Organ-abhängigen GG-Akkumulation stellt sich weiterhin. Außerdem ist nicht geklärt, ob GG möglicherweise auch in anderen Zellkompartimenten wie der Vakuole nachweisbar ist. Weiterhin ist zu klären, inwieweit in den Kohlenhydrathaushalt der transgenen Pflanzen eingegriffen wird. Zudem ist nicht bekannt, ob es überhaupt möglich ist, eine Steigerung des Ertrages zu erreichen.

Ein großes Problem der Erzeugung stresstoleranter Nutzpflanzen ist die Komplexität und Vielseitigkeit der Mechanismen, die als Reaktion auf abiotischen Stress in der Pflanze ablaufen. Somit sollten in einem Ansatz verschiedene die Stressantwort betreffende Gene einbezogen werden. Zum Beispiel wäre eine Kombination aus osmotischem Ansatz, der die GG-Akkumulation beinhaltet, und ionischem Ansatz, der einen Na-Ionen-Transporter aus dem *SOS-Pathway* einbezieht denkbar. Möglichkeiten für die Transformation verschiedener Gene in eine Pflanze existieren bereits (Dafny-Yelin u. Tzfira, 2007). Zum Beispiel ist es möglich, mit Hilfe des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers transgene Pflanzen zu erzeugen, die entweder durch eine sequenzielle Transformation oder durch Kreuzung zweier transgener Pflanzen mit unterschiedlichem Transgen entstanden sind. Auch eine Cotransformation, d.h. die gleichzeitige Transformation verschiedener Transgene ist möglich, indem eine Gemisch aus mehreren transgenen Agrobakterien-Stämmen für die Transformation verwendet wird (Li et al., 2003). Zudem können die Sequenzen zweier Gene in einem Plasmid so miteinander fusioniert werden, dass nur ein Transkript entsteht. Nach der folgenden Translation spaltet eine Protease das Produkt in zwei Proteine (Dasgupta et al., 1998). Auch die Verwendung mehrerer Expressions-Kassetten innerhalb eines Vektors kann eine multiple Gentransformation ermöglichen (Bohmert et al., 2002). So ist auch die gleichzeitige Transformation verschiedener Gene in Pflanzen realisierbar, wodurch die pflanzliche Stressantwort auf mehr als nur einer Ebene beeinflusst und die Komplexität der Toleranzmechanismen von Pflanzen gegenüber abiotischen Stressfaktoren berücksichtigt werden kann.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Erzeugung transgener Kartoffelpflanzen, die das *compatible solute* Glucosylglycerol (GG) akkumulieren. Dazu wurde das *ggpPS*-Gen aus *Azotobacter vinelandii* exprimiert, mit dessen Hilfe zuvor in Arabidopsis eine GG-Synthese erreicht werden konnte (Klähn et al., 2009). In Gewächshausversuchen erfolgte die Untersuchung der transgenen Kartoffelpflanzen bezüglich der Auswirkung der GG-Synthese auf Wachstum und Ertrag unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen bei konstitutiver, stressinduzierter sowie knollenspezifischer *ggpPS*-Expression.

In der Arbeit wurden 8 Plasmidkonstrukte hergestellt, die das *ggpPS*-Gen unter der Kontrolle des 35S-, des rd29A- bzw. des B33-Promotors besitzen und die Selektion der transgenen Regenerate anhand verschiedener Markergene ermöglichen. Mit Hilfe eines optimierten, sehr effizienten Transformationsprotokolls konnten die erzeugten Konstrukte erfolgreich in die Kartoffelsorte Albatros transformiert werden. In den letzten Versuchen wurde eine Selektionsrate von bis zu 80 % GG-bildender Kartoffelpflanzen erreicht. Diese hohen Selektionsraten bieten die Möglichkeit, bei folgenden Transformationen auf die Verwendung von Markergenen zu verzichten und somit einem großen Kritikpunkt an der Gentechnik zu begegnen.

Die Transformationen führten zu einer Reihe von transgenen Regeneraten, die sehr hohe GG-Mengen von durchschnittlich bis zu 19  $\mu\text{mol/g}$  FM in jungen Blättern akkumulierten. Diese GG-Menge entspricht dem Niveau der GG-Gehalte in transgenen Arabidopsis-Pflanzen. Im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen an Kartoffelpflanzen, die das *ggpS*-Gen aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* für die GG-Synthese exprimierten, konnte eine 50fache Steigerung der GG-Akkumulation erzielt werden.

Mit ausgewählten Linien, die verschiedene GG-Gehalte aufwiesen, wurden im Gewächshaus Versuche unter Kontroll-, Salz- und Trockenstressbedingungen durchgeführt. Während dieser Gewächshausversuche konnte eine Alters- bzw. Entwicklungs-abhängige GG-Akkumulation beobachtet werden, d.h. die hohen GG-Gehalte in jungen Blättern nahmen mit zunehmendem Alter des Blattes und der gesamten Pflanze stark ab. Auch in den untersuchten Stolonen waren wiederum größere GG-Werte nachweisbar, während reife Knollen kein GG enthielten. Dieses Phänomen ist möglicherweise auf eine posttranskriptionelle Regulation, den Abbau des GgpPS-Proteins oder den Transport des GGs nach dem *source-sink*-Prinzip zurückzuführen.

Prinzipiell zeigten die transgenen GG-akkumulierenden Pflanzen sowohl unter Kontroll- als auch Stressbedingungen ein deutlich verbessertes Wachstum des Sprosses im Vergleich zum Wildtyp. Auch der Knollenansatz war erhöht. Jedoch war es nicht möglich, unter Gewächshausbedingungen einen erhöhten Knollenertrag nachzuweisen. Die Topfanzucht und der damit verbundene Platzmangel scheint hier der limitierende Faktor zu sein. Inwieweit das verbesserte Wachstum und der erhöhte Knollenansatz zu einem höheren Ertrag führen, kann somit nur mit Hilfe eines Feldversuches geprüft werden.

Zusätzlich zur konstitutiven *ggpPS*-Expression wurde eine salzinduzierte *ggpPS*-Expression durch die Kopplung an den rd29A-Promotor in transgenen Pflanzen erzeugt. Auch diese Pflanzen zeigten eine starke GG-Akkumulation. Unter Salzstress war eine deutliche GG-Zunahme zu beobachten. Zusätzlich konnte in den rd29A-Pflanzen auch in den Knollen GG nachgewiesen

werden, in denen zuvor weder mittels konstitutiver noch knollenspezifischer *ggpPS*-Expression eine Akkumulation von GG detektiert wurde. Somit führt regulierte Expression möglicherweise zu einer verbesserten Stresstoleranz.



# Literaturverzeichnis

## **Andrews et al. 1988**

ANDREWS, D.L. ; BEAMES, B. ; SUMMERS, M.D. ; PARK, W.D.: Charakterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. In: *Biochemical Journal* 252 (1988), S. 199–206

## **Apse et al. 1999**

APSE, M.P. ; AHARON, G.S. ; SNEDDEN, W.A. ; BLUMWALD, E.: Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. In: *Science* 285 (1999), Nr. 5431, S. 1256–1258

## **Ashraf u. Foolad 2007**

ASHRAF, M. ; FOOLAD, M.R.: Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. In: *Environmental and Experimental Botany* 59 (2007), Nr. 2, S. 206–216

## **Balibrea et al. 2000**

BALIBREA, M.E. ; AMICO, J.D. ; BOLARÍN, M.C. ; PÉREZ-ALFOCEA, F.: Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity. In: *Physiologia Plantarum* 110 (2000), S. 503–511

## **Baroja-Fernández et al. 2009**

BAROJA-FERNÁNDEZ, E. ; MUÑOZ, F.J. ; MONTERO, M. ; ETXEBERRIA, E. ; SESMA, M.T. ; OVECKA, M. ; A.-BAHAJI ; EZQUER, I. ; LI, J. ; PRAT, S. ; POZUETA-ROMERO, J.: Enhancing Sucrose Synthase Activity in Transgenic Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers Results in Increased Levels of Starch, ADPglucose and UDPglucose and Total Yield. In: *Plant & Cell Physiology* 50 (2009), Nr. 9, S. 1651–1662

## **Baroja-Fernández et al. 2004**

BAROJA-FERNÁNDEZ, E. ; MUÑOZ, F.J. ; ZANDUETA-CRIADO, A. ; MORÁN-ZORZANO, M.T. ; VIALE, A.M. ; ALONSO-CASAJÚS, N. ; POZUETA-ROMERO, J.: Most of the ADP-glucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101 (2004), Nr. 35, S. 13080–13085

## **Beaujean et al. 1998**

BEAUJEAN, A. ; SANGWAN, R.S. ; LECARDONNEL, A. ; SANGWAN-NORREEL, B.S.: Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. In: *Journal of Experimental Botany* 49 (1998), Nr. 326, S. 1589–1595

## **Bhandal u. Malik 1988**

BHANDAL, I.S. ; MALIK, C.P.: Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology

and metabolism of flowering plants. In: *International Review of Cytology* 110 (1988), S. 205–254

**Bianchi et al. 1993**

BIANCHI, G. ; GAMBA, A. ; LIMIROLI, R. ; POZZI, N. ; ELSTER, R. ; SALAMINI, F. ; BARTELS, D.: The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. In: *Physiologia Plantarum* 87 (1993), S. 223–226

**Binzel et al. 1987**

BINZEL, M.L. ; HASEGAWA, P.M. ; RHODES, D. ; HANDA, S. ; HANDA, A.K. ; BRESSAN, R.A.: Solute Accumulation in Tobacco Cells Adapted to NaCl. In: *Plant Physiology* 84 (1987), S. 1408–1415

**Birnboim u. Doly 1979**

BIRNBOIM, H.C. ; DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Research* 7 (1979), S. 1513–1523

**Blaha et al. 2000**

BLAHA, G. ; STELZL, U. ; SPAHN, C.M.T. ; AGRAWAL, R.K. ; FRANK, J. ; NIERHAUS, K.H.: Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. In: *Methods in Enzymology* 317 (2000), S. 292–309

**Blumwald et al. 2000**

BLUMWALD, E. ; AHARON, G.S. ; APSE, M.P.: Sodium transport in plant cells. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 (2000), S. 140–151

**Bohmert et al. 2002**

BOHMERT, K. ; BALBO, I. ; STEINBÜCHEL, A. ; TISCHENDORF, G. ; WILLMITZER, L.: Constitutive Expression of the  $\beta$ -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants. A Major Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants. In: *Plant Physiology* 128 (2002), S. 1282–1290

**Borges et al. 2002**

BORGES, N. ; RAMOS, A. ; RAVEN, N.D. ; SHARP, R.J. ; SANTOS, H.: Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. In: *Extremophiles* 6 (2002), S. 209–216

**Borowitzka et al. 1980**

BOROWITZKA, L.J. ; DEMMERLE, S. ; MACKAY, M.A. ; NORTON, R.S.: Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of osmoregulation in a blue-green alga. In: *Science* 210 (1980), Nr. 4470, S. 650–651

**Boudsocq u. Luarière 2005**

BOUDSOCQ, M. ; LUARIÈRE, C.: Osmotic Signaling in Plants. Multiple Pathways Mediated by Emerging Kinase Families. In: *Plant Physiology* 138 (2005), S. 1185–1194

**Bradford 1976**

BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254

**Brown u. Simpson 1972**

BROWN, A.D. ; SIMPSON, J.R.: Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. In: *Journal of General Microbiology* 72 (1972), S. 589–591

**Bundock et al. 1995**

BUNDOCK, P. ; DULK-RAS, A. den ; BEIJERSBERGEN, A. ; HOOYKAAS, P.J.J.: Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The EMBO Journal* 14 (1995), Nr. 13, S. 3206–3214

**Burg et al. 2007**

BURG, M.B. ; FERRARIS, J.D. ; DMITRIEVA, N.I.: Cellular response to hyperosmotic stresses. In: *Physiological Review* 87 (2007), Nr. 4, S. 1441–1474

**Carden et al. 2003**

CARDEN, D.E. ; WALKER, D.J. ; FLOWERS, T.J. ; MILLER, A.J.: Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> to salt tolerance. In: *Plant Physiology* 131 (2003), S. 676–683

**Cheeseman 1982**

CHEESEMAN, J.M.: Pump-leak sodium fluxes in low salt corn roots. In: *Journal of Membrane Biology* 70 (1982), S. 157–164

**Dafny-Yelin u. Tzfira 2007**

DAFNY-YELIN, M. ; TZFIRA, T.: Delivery of Multiple Transgenes to Plant Cells. In: *Plant Physiology* 145 (2007), Nr. 4, S. 1118–1128

**Dale u. Hampson 1995**

DALE, P.J. ; HAMPSON, K.K.: An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.). In: *Euphytica* 85 (1995), S. 101–108

**Dasgupta et al. 1998**

DASGUPTA, S. ; COLLINS, G.B. ; HUNT, A.G.: Co-ordinated expression of multiple enzymes in different subcellular compartments in plants. In: *The Plant Journal* 16 (1998), Nr. 1, S. 107–116

**Delauney u. Verma 1993**

DELAUNEY, A.J. ; VERMA, D.P.S.: Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. In: *The Plant Journal* 4 (1993), Nr. 2, S. 215–223G

**Dietze et al. 1995**

DIETZE, J. ; BLAU, A. ; WILLMITZER, L.: Agrobacterium-Mediated Transformation of Potato (*Solanum tuberosum*). In: POTRYKUS, I. (Hrsg.) ; SPANGENBERG, G. (Hrsg.): *Gene Transfer to Plants*. Springer, Berlin, 1995, Kapitel 4, S. 24–29

**Dwelle 2003**

DWELLE, R.B.: Potato Growth and Development. In: STARK, J.C. (Hrsg.) ; LOVE, S.L. (Hrsg.): *Potato Production Systems*. Agricultural communications, University of Idaho, 2003

**Flowers et al. 1990**

FLOWERS, T.J. ; FLOWERS, S.A. ; HAJIBAGHERI, M.A. ; YEO, A.R.: Salt tolerance in

the halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Tateoka. In: *New Phytologist* 114 (1990), S. 675–684

**Flowers u. Yeo 1995**

FLOWERS, T.J. ; YEO, A.R.: Breeding for Salinity Resistance in Crop Plants. In: *Australian Journal of Plant Physiology* 22 (1995), Nr. 6, S. 875–884

**Garg et al. 2002**

GARG, A.K. ; KIM, J-K. ; OWENS, T.G. ; RANWALA, A.P. ; CHOI, Y.D. ; KOCHIAN, L.V. ; WU, R.J.: Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99 (2002), Nr. 25, S. 15898–15903

**Geigenberger et al. 1999**

GEIGENBERGER, P. ; REIMHOLZ, R. ; DEITING, U. ; SONNEWALD, U. ; STITT, M.: Decreased expression of sucrose phosphate synthase strongly inhibits the water stress-induced synthesis of sucrose in growing potato tubers. In: *The Plant Journal* 19 (1999), Nr. 2, S. 119–129

**Greenway u. Osmond 1972**

GREENWAY, H. ; OSMOND, C.B.: Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. In: *Plant Physiology* 49 (1972), S. 256–259

**Hagemann u. Erdmann 1994**

HAGEMANN, M. ; ERDMANN, N.: Activation and pathway of glucosylglycerol synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. In: *Microbiology* 140 (1994), S. 1427–1431

**Hagemann et al. 1987**

HAGEMANN, M. ; ERDMANN, N. ; WITTENBURG, E.: Synthesis of glucosylglycerol in salt-stressed cells of the cyanobacterium *Microcystis firma*. In: *Archives of Microbiology* 148 (1987), S. 275–279

**Hagemann et al. 1989**

HAGEMANN, M. ; ERDMANN, N. ; WITTENBURG, E.: Studies concerning enzyme activities in salt-loaded cells of the cyanobacterium *Microcystis firma*. In: *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 184 (1989), S. 87–94

**Hagemann et al. 2008**

HAGEMANN, M. ; RIBBECK-BUSCH, K. ; KLÄHN, S. ; HASSE, D. ; STEINBRUCH, R. ; BERG, G.: The plant-associated bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* expresses a new enzyme for the synthesis of the compatible solute glucosylglycerol. In: *Journal of Bacteriology* 190 (2008), S. 5898–5906

**Hagemann et al. 1997**

HAGEMANN, M. ; SCHOOR, A. ; JEANJEAN, R. ; ZUTHER, E. ; JOSET, F.: The *stpA* Gene from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Encodes the Glucosylglycerol-Phosphate Phosphatase Involved in Cyanobacterial Osmotic Response to Salt Shock. In: *Journal of Bacteriology* 179 (1997), Nr. 5, S. 1727–1733

**Hanahan et al. 1985**

HANAHAN, D. ; JESSEE, J. ; BLOOM, F.R.: Techniques for transformation of *E. coli*. In:

GLOVER, D.M. (Hrsg.) ; HAMES, B.D. (Hrsg.): *DNA Cloning: A Practical Approach Volume 1*. Oxford University Press, 1985

**Hühns et al. 2009**

HÜHNS, M. ; NEUMANN, K. ; HAUSMANN, T. ; KLEMKE, F. ; LOCKAU, W. ; KAHMANN, U. ; KOPERTHEK, L. ; STAIGER, D. ; PISTORIUS, E.K. ; REUTHER, J. ; WALDVOGEL, E. ; WOHLLEBEN, W. ; EFFMERT, M. ; JUNGHANS, H. ; NEUBAUER, K. ; KRAGL, U. ; SCHMIDT, K. ; SCHMIDTKE, J. ; BROER, I.: Tuber specific *cphA* expression to enhance cyanophycin production in potatoes. In: *Plant Biotechnology Journal* 7 (2009), Nr. 9, S. 883–898

**Hincha u. Hagemann 2004**

HINCHA, D.K. ; HAGEMANN, M.: Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. In: *Biochemical Journal* 383 (2004), S. 277–283

**Hmida-Sayari et al. 2005**

HMIDA-SAYARI, A. ; GARGOURI-BOUZID, R. ; BIDANI, A. ; JAOUA, L. ; SAVOURE, A. ; JAOUA, S.: Overexpression of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. In: *Plant Science* 169 (2005), Nr. 4, S. 746–752

**Holmström et al. 1996**

HOLMSTRÖM, K.O. ; MÄNTYLÄ, E. ; WELLIN, B. ; MANFAL, A. ; PALVA, E.T. ; TUNNELA, O.E. ; LONDESBOROUGH, J.: Drought tolerance in tobacco. In: *Nature* 379 (1996), S. 683–684

**Holsters et al. 1980**

HOLSTERS, M. ; SILVA, B. ; VLIET, F. van ; GENETELLO, C. ; BLOCK, M. de ; DHAESE, P. ; DEPICKER, A. ; INZÉ, D. ; ENGLER, G. ; VILLARROEL, R. ; MONTAGU, M. van ; SCHELL, J.: The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. In: *Plasmid* 3 (1980), S. 212–230

**Holtorf et al. 1995**

HOLTORF, S. ; APEL, K. ; BOHLMANN, H.: Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Molecular Biology* 29 (1995), S. 637–646

**Hong et al. 2000**

HONG, Z. ; LAKKINENI, K. ; ZHANG, Z. ; VERMA, D.P.S.: Removal of feedback inhibition of 1 pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. In: *Plant Physiology* 122 (2000), S. 1129–1136

**Hu et al. 2000**

HU, Y. ; SCHNYDER, H. ; SCHMIDHALTER, U.: Carbohydrate deposition and partitioning in elongating leaves of wheat under saline soil conditions. In: *Australian Journal of Plant Physiology* 27 (2000), S. 363–370

**Huang et al. 2000**

HUANG, J. ; HIRJI, R. ; ADAM, L. ; ROZWADOWSKI, K.L. ; HAMMERLINDL, J.K. ; KELLER, W.A. ; SELVARAJ, G.: Genetic Engineering of Glucinebetaine Production toward Enhancing

Stress Tolerance in Plants: Metabolic Limitations. In: *Plant Physiology* 122 (2000), Nr. 3, S. 747–756

**Huber u. Huber 1996**

HUBER, S.C. ; HUBER, J.L.: Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47 (1996), S. 431–444

**Iturriaga et al. 2009**

ITURRIAGA, G. ; SUÁREZ, R. ; NOVA-FRANCO, B.: Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. In: *International Journal of Molecular Sciences* 10 (2009), S. 3793–3810

**Kaneda et al. 1984**

KANEDA, M. ; KOBAYASHI, K. ; NISHIDA, K. ; KATSUTA, S.: Lilioides D and F, two glycerol glucosides from *Lilium japonicum*. In: *Phytochemistry* 23 (1984), S. 795–798

**Kathuria et al. 2009**

KATHURIA, H. ; GIRI, J. ; NATARAJA, K.N. ; MURATA, N. ; UDAYAKUMAR, M. ; TYAGI, A.K.: Glycinebetaine- induced water-stress tolerance in *codA*-expressing transgenic *indica* rice is associated with up-regulation of several stress responsive genes. In: *Plant Biotechnology Journal* 7 (2009), S. 512–526

**Keller u. Matile 1989**

KELLER, F. ; MATILE, P.: Storage of sugars and mannitol in petioles of celery leaves. In: *New Phytologist* 113 (1989), Nr. 3, S. 291–299

**Kietwietdejonge et al. 2006**

KIETWIETDEJONGE, A. ; PITTS, M. ; CABUHAT, L. ; SHERMAN, C. ; KLADWANG, W. ; MIRAMONTES, G. ; FLORESVILLAR, J. ; CHAN, J. ; RAMIREZ, R.M.: Hypersaline stress induces the turnover of phosphatidylcholine and results in the synthesis of the renal osmoprotectant glycerophosphocholine in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEMS Yeast Research* 6 (2006), Nr. 2, S. 205–217

**Kishor et al. 1995**

KISHOR, P.B.K. ; HONG, Z. ; MIAO, G.-H. ; HU, C.-A. ; VERMA, D. P. S.: Overexpression of  $\Delta$ -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. In: *Plant Physiology* 108 (1995), S. 1387–1394

**Klähn et al. 2009**

KLÄHN, S. ; MARQUARDT, D.M. ; ROLLWITZ, I. ; HAGEMANN, M.: Expression of the *ggpPS* gene for glucosylglycerol biosynthesis from *Azotobacter vinelandii* improves the salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*. In: *Journal of Experimental Botany* 60 (2009), Nr. 6, S. 1679–1689

**Klingler et al. 2010**

KLINGLER, J.P. ; BATELLI, G. ; ZHU, J.-K.: ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signaling. In: *Journal of Experimental Botany* 61 (2010), Nr. 12, S. 3199–3210

**Knight et al. 1997**

KNIGHT, H. ; TREWAVAS, A.J. ; KNIGHT, M.R.: Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. In: *The Plant Journal* 12 (1997), S. 1067–1078

**Kollman et al. 1979**

KOLLMAN, V.H. ; HANNERS, J.L. ; LONDON, R.E. ; ADAME, E.G. ; WALKER, T.E.: Photo-synthetic preparation and charakterization of <sup>13</sup>-labeled carbohydrates in *Agmenellum quadripilicatum*. In: *Carbohydrate Research* 73 (1979), Nr. 1, S. 193–202

**Koncz u. Schell 1986**

KONCZ, C. ; SCHELL, J.: The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. In: *Molecular and General Genetics* 204 (1986), S. 383–396

**Kumar et al. 2007**

KUMAR, G.N.M. ; IYER, S. ; KNOWLES, N.R.: Extraction of RNA from Fresh, Frozen, and Lyophilized Tuber and Root Tissues. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007), Nr. 5, S. 1674–1678

**Lehmann et al. 2010**

LEHMANN, S. ; FUNCK, D. ; SZABADOS, L. ; RENTSCH, D.: Proline metabolism and transport in plant development. In: *Amino Acids* 39 (2010), S. 949–962

**Lehmann et al. 2011**

LEHMANN, S. ; GUMY, C. ; BLATTER, E. ; BOEFFEL, S. ; FRICKE, W. ; RENTSCH, D.: In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. In: *Journal of Experimental Botany* 62 (2011), Nr. 2, S. 787–796

**Levy 1983**

LEVY, D.: Water deifcit enhancement of proline and  $\alpha$ -amino nitrogen accumulation in potato plants and its association with susceptibility to drought. In: *Physiologia Plantarum* 57 (1983), S. 169–173

**Li et al. 2003**

LI, L. ; ZHOU, Y. ; CHENG, X. ; SUN, J. ; MARITA, J.M. ; RALPH, J. ; CHIANG, V.L.: Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003), Nr. 8, S. 4939–4944

**Lohaus et al. 2000**

LOHAUS, G. ; HUSSMANN, M. ; PENNEWISS, K. ; SCHNEIDER, H. ; ZHU, J-J. ; SATTELMACHER, B.: Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. In: *Journal of Experimental Botany* 51 (2000), S. 1721–1732

**Luzardo et al. 2000**

LUZARDO, M.C. ; AMALFA, F. ; NUNEZ, A.M. ; DIAZ, S. ; LOPEZ, A.C. B. ; DISALVO, E.A.: Effect of trehalose and sucrose on the huydration and dipole potential of lipid bilayers. In: *Biophysical Journal* 78 (2000), S. 2452–2458

**Malik et al. 2002**

MALIK, K. ; WU, K. ; LI, X-Q. ; MARTIN-HELLER, T. ; HU, M. ; AL., E. F.: A constitutive gene expression system derived from the *tCUP* cryptic promotor elements. In: *Theoretical and Applied Genetics* 105 (2002), S. 505–514

**Marin et al. 1998**

MARIN, K. ; ZUTHER, E. ; KERSTAN, T. ; KUNERT, A. ; HAGEMANN, M.: The *ggpS* Gene from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Encoding Glucosyl-Glycerol-Phosphate Synthase is involved in Osmolyte Synthesis. In: *Journal of Bacteriology* 180 (1998), Nr. 18, S. 4843–4849

**Marquardt 2001**

MARQUARDT, D.: Transformation und Charakterisierung von Kartoffeln (*S. tuberosum* var. Désirée) mit den Glucosylglycerol-Synthesegenen aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. 2001

**Martinoia et al. 2007**

MARTINOIA, E. ; MAESHIMA, M. ; NEUHAUS, H.E.: Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. In: *Journal of Experimental Botany* 58 (2007), Nr. 1, S. 83–102

**Mattioli et al. 2009**

MATTIOLI, R. ; CONSTANTINO, P. ; TROVATO, M.: Proline accumulation in plants: Not only stress. In: *Plant Signaling and Behavior* 4 (2009), Nr. 11, S. 1016–1018

**McWorther et al. 1995**

MCWORTHER, C.G. ; PAUL, R.N. ; OUZTS, J.C.: Bicellular trichomes of johnsongrass (*Sorghum halepense*) leaves – morphology, histochemistry, and function. In: *Weed Science* 43 (1995), S. 201–208

**Møller et al. 2009**

MØLLER, I.S. ; GILLIHAM, M. ; JHA, D. ; MAYO, G.M. ; ROY, S.J. ; COATES, J.C. ; HASELOFF, J. ; TESTER, M.: Shoot Na<sup>+</sup> Exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na<sup>+</sup> transport in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 21 (2009), S. 2163–2178

**Munns 2002**

MUNNS, R.: Comparative physiology of salt and water stress. In: *Plant, Cell and Environment* 25 (2002), S. 239–250

**Munns u. Tester 2008**

MUNNS, R. ; TESTER, M.: Mechanisms of Salinity Tolerance. In: *Annual Review of Plant Biology* 59 (2008), S. 651–681

**Munns et al. 1988**

MUNNS, R. ; TONNET, L. ; SHENNAN, C. ; GARDNER, P.A.: Effect of high external NaCl concentration on ion transport within the shoot of *lupinus albus*. In: *Plant, Cell and Environment* 11 (1988), S. 291–300

**Muñoz et al. 2005**

MUÑOZ, F.J. ; BAROJA-FERNÁNDEZ, E. ; MORÁN-ZORZANO, M. T. ; VIALE, A.M. ; ETXEBERRIA, E. ; ALONSO-CASAJÚS, N. ; POZUETA-ROMERO, J.: Sucrose Synthase Controls Both Intracellular ADP Glucose Levels and Transitory Starch Biosynthesis in Source Leaves. In: *Plant Cell Physiology* 46 (2005), Nr. 8, S. 1366–1376

**Murray u. Thompson 1980**

MURRAY, M.G. ; THOMPSON, W.F.: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: *Nucleic Acids Research* 8 (1980), S. 4321–4325



**Murthy u. Tester 1996**

MURTHY, M. ; TESTER, M.: Compatible solutes and salt tolerance: misuse of transgenic tobacco. In: *Trends in Plant Science* 1 (1996), Nr. 9, S. 294–295

**Nadwodnik u. Lohaus 2008**

NADWODNIK, J. ; LOHAUS, G.: Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. In: *Planta* 227 (2008), S. 1079–1089

**Nakashima et al. 2000**

NAKASHIMA, K. ; SHINWARI, Z.K. ; SAKUMA, Y. ; SEKI, M. ; MIURA, S. ; AL. et.: Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. In: *Plant Molecular Biology* 42 (2000), S. 657–665

**Nanjo et al. 1999**

NANJO, T. ; KOBAYASHI, T.M. ; YOSHIDA, Y. ; KAKUBARI, Y. ; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ; SHINOZAKI, K.: Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. In: *FEBS Letters* 461 (1999), S. 205–210

**Nuccio et al. 1998**

NUCCIO, M.L. ; RUSSELL, B.L. ; NOLTE, K.D. ; RATHINASABAPATHI, B. ; GAGE, D.A. ; HANSON, A.D.: The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. In: *The Plant Journal* 16 (1998), S. 487–496

**Park et al. 2009**

PARK, S-Y. ; FUNG, P. ; NISHIMURA, N.: Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. In: *Science* 324 (2009), S. 1068–1071

**Pikaard et al. 1987**

PIKAARD, C.S. ; BRUSCA, J.S. ; HANNAPEL, D.J. ; PARK, W.D.: The two classes of genes for the major potato tuber protein, patatin, are differentially expressed in tubers and roots. In: *Nucleic Acids Research* 15 (1987), Nr. 5, S. 1979–1994

**Qiu et al. 2002**

QIU, Q-S. ; GUO, Y. ; DIETRICH, M.A. ; SCHUMAKER, K.S. ; ZHU, J-K.: Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99 (2002), S. 8436–8441

**Reed u. Stewart 1988**

REED, R.H. ; STEWART, W.D.P.: The responses of cyanobacteria to salt stress. In: ROGERS, L.J. (Hrsg.) ; GALLON, J.R. (Hrsg.): *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria* Bd. 12. Oxford: Clarendon Press, 1988, S. 217–231

**Reimholz et al. 1997**

REIMHOLZ, R. ; GEIGER, M. ; HAAKE, V. ; DEITING, U. ; KRAUSE, K.-P. ; SONNEWALD, U. ; STITT, M.: Potato plants contain multiple forms of sucrose phosphate synthase, which differ in their tissue distributions, their levels during development, and their responses to low temperature. In: *Plant, Cell and Environment* 20 (1997), S. 291–305

**Reiser et al. 2003**

REISER, V. ; RAITT, D.C. ; SAITO, H.: Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. In: *The Journal of Cell Biology* 161 (2003), Nr. 6, S. 1035–1040

**Rhodes u. Hanson 1993**

RHODES, D. ; HANSON, A.D.: Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. In: *Plant Molecular Biology* 44 (1993), S. 357–384

**Richards 1954**

RICHARDS, L.A. (Hrsg.): *Diagnosis and improvements of saline and alkali soils*. U.S.D.A. Handbook of Agriculture, Washington D.C., 1954 ( 60)

**Roberts 2005**

ROBERTS, M.F.: Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. In: *Saline Systems* 1 (2005), Nr. 5. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>. – DOI 10.1186/1746-1448-1-5

**Rocha-Sosa et al. 1989**

ROCHA-SOSA, M. ; SONNEWALD, U. ; FROMMER, W. ; STRATMANN, M. ; SCHELL, J. ; WILLMITZER, L.: Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. In: *The EMBO Journal* 8 (1989), Nr. 1, S. 23–29

**Roessner-Tunali et al. 2003**

ROESSNER-TUNALI, U. ; URBANCZYK-WOCHNIAK, E. ; T, Czechowski ; KOLBE, A. ; WILLMITZER, L. ; FERNIE, A.R.: De Novo Amino Acid Biosynthesis in Potato Tubers is Regulated by Sucrose Levels. In: *Plant Physiology* 133 (2003), S. 683–692

**Rosa et al. 2009**

ROSA, M. ; PRADO, C. ; PODAZZA, G. ; INTERDONATO, R. ; GONZÁLEZ, J.A. ; HILAL, M. ; PRADO, F.E.: Soluble sugars–Metabolism, sensing and abiotic stress. In: *Plant Signaling & Behavior* 4 (2009), Nr. 5, S. 388–393

**Shen et al. 1997**

SHEN, B. ; JENSEN, R.G. ; BOHNERT, H.J.: Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. In: *Plant Physiology* 115 (1997), S. 527–532

**Sheveleva et al. 1998**

SHEVELEVA, E.V. ; MARQUEZ, S. ; CHMAWA, W. ; ZEGER, A. ; JENSEN, R.G. ; BOHNERT, H.J.: Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco: high amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. In: *Plant Physiology* 117 (1998), S. 831–839

**Shi et al. 2002**

SHI, H. ; LEE, B. h. ; WU, S.-J. ; ZHU, J.-K.: Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. In: *Nature Biotechnology* 21 (2002), S. 81–85

**Shinozaki u. Yamaguchi-Shinozaki 1996**

SHINOZAKI, K. ; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.: Molecular responses to drought and cold stress. In: *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), Nr. 2, S. 161–167

**Shinozaki u. Yamaguchi-Shinozaki 1997**

SHINOZAKI, K. ; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.: Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. In: *Plant Physiology* 115 (1997), S. 327–334

**Steppuhn et al. 2005**

STEPPUHN, H. ; GENUCHTEN, M.Th. van ; GRIEVE, C.M.: Root-Zone Salinity: I: Selecting a Product-Yield Index and Response Function for Crop Tolerance. In: *Crop Science* 45 (2005), Nr. 1, S. 209–220

**Su u. Wu 2004**

SU, J. ; WU, R.: Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. In: *Plant Science* 166 (2004), Nr. 4, S. 941–948

**Sunilkumar et al. 2002**

SUNILKUMAR, G. ; MOHR, L. ; LOPATA-FINCH, E. ; EMANI, C. ; KATHORE, K.S.: Developmental and tissue-specific expression of a CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. In: *Plant Molecular Biology* 50 (2002), S. 463–474

**Szoke et al. 1992**

SZOKE, A. ; MIAO, G.H. ; HONG, Z. ; VERMA, D.P.S.: Subcellular location of delta-1-pyrroline-5-carboxylase reductase in root/nodule and leaf of soybean. In: *Plant Physiology* 99 (1992), S. 1642–1649

**Taiz u. Zeiger 2000**

TAIZ, L. ; ZEIGER, E.: *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 2000

**Takenaka et al. 2000**

TAKENAKA, F. ; UCHIYAMA, H. ; IMAMURA, T.: Identification of  $\alpha$ -D-Glucosylglycerol in Sake. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64 (2000), Nr. 2, S. 378–385

**Tarczynski et al. 1992**

TARCZYNSKI, M.C. ; JENSEN, R.G. ; BOHNERT, H.J.: Expression of a bacterial *mt1D* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89 (1992), S. 2600–2604

**Tarczynski et al. 1993**

TARCZYNSKI, M.C. ; JENSEN, R.G. ; BOHNERT, H.J.: Stress protection of transgenic plants by production of the osmolyte mannitol. In: *Science* 259 (1993), S. 508–510

**Terada u. Shimamoto 1990**

TERADA, R. ; SHIMAMOTO, K.: Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. In: *Molecular and General Genetics* 220 (1990), Nr. 3, S. 389–392

**Ueda et al. 2008**

UEDA, A. ; SHI, W. ; SHIMADA, T. ; MIYAKE, H. ; TAKABE t.: Altered expression of barley proline transporter causes different growth responses in *Arabidopsis*. In: *Planta* 227 (2008), S. 277–286

**Urao et al. 1999**

URAO, T. ; YAKUBOV, B. ; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ; SEKI, M. ; HIRAYAMA, T. ; SHINOZAKI, K.: A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. In: *The Plant Cell* 11 (1999), S. 1743–1754

**Verbruggen u. Hermans 2008**

VERBRUGGEN, N. ; HERMANS, C.: Proline accumulation in plants: a review. In: *Amino Acids* 35 (2008), S. 753–759

**Williamson et al. 1989**

WILLIAMSON, J.D. ; HIRSCH-WYNCOTT, M.E. ; LARKINS, B.A. ; GELVIN, S.B.: Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. In: *Plant Physiology* 90 (1989), S. 1570–1576

**Withers et al. 1978**

WITHERS, B. ; VIPOND, S. ; LECHER, K.: *Bewässerung*. Berlin, Hamburg : Paul Parey, 1978

**Wohlbach et al. 2008**

WOHLBACH, D.J. ; QUIRINO, B.F. ; SUSSMAN, M.R.: Analysis of the *Arabidopsis* ATHK1 Reveals a Connection between Vegetative Osmotic Stress Sensing and Seed Muration. In: *The Plant Cell* 20 (2008), S. 1101–1117

**Xiong et al. 2002**

XIONG, L. ; SCHUMAKER, K. ; ZHU, J.K.: Cell signaling during cold, drought and salt stress. In: *Plant Cell* 14 (2002), S. S165–183

**Xiong u. Zhu 2002**

XIONG, L. ; ZHU, J.-K.: Salt Tolerance. In: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists, 2002

**Yamaguchi-Shinozaki u. Shinozaki 1993**

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ; SHINOZAKI, K.: *Arabidopsis* DNA Encoding Two Desiccation-Responsive *rd29* Genes. In: *Plant Physiology* 101 (1993), S. 1119–1120

**Yamaguchi-Shinozaki u. Shinozaki 1994**

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ; SHINOZAKI, K.: A Novel cis-Acting element in an *Arabidopsis* Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. In: *The Plant Cell* 6 (1994), S. 251–264

**Yamaki 1982**

YAMAKI, S.: Distribution of Sorbitol, Neutral Sugars, Free Amino Acids, Malic Acid and some Hydrolytic Enzymes in Vacuoles of Apple Cotyledons. In: *Plant and Cell Physiology* 23 (1982), Nr. 5, S. 881–889

**Yang et al. 2009**

YANG, Q. ; CHEN, Z.-Z. ; ZHOU, X.-F. ; YIN, H.-B. ; LI, X. ; XIN, X.-F. ; HONG, X.-H. ; ZHU, J.-K. ; GONG, Z.: Overexpression of SOS(*Salt Overly Sensitive*) Genes Increases Salt Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*. In: *Molecular Plant* 2 (2009), Nr. 1, S. 22–31

**Yang et al. 2008**

YANG, X. ; LIANG, Z. ; WEN, X. ; LU, C.: Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants. In: *Plant Molecular Biology* 66 (2008), S. 73–86

**Yeo et al. 2000**

YEO, E.T. ; KWON, H.B. ; HAN, S.E. ; LEE, J.T. ; RYU, J.C. ; BYUN, M.O.: Genetic engineering of drought-resistant potato plants by introduction of the *trehalose-6-phosphate synthase* (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecules and Cells* 10 (2000), S. 263–268

**Zhang u. e. Blumwald 2001**

ZHANG, H-X. ; BLUMWALD e.: Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. In: *Nature Biotechnology* 19 (2001), S. 765–768

**Zhang et al. 2005**

ZHANG, N. ; SI, H-J. ; WANG, D.: Cloning of rd29A Gene Promotor from *Arabidopsis thaliana* and Its Application in Stress-resistance Transgenic Potato. In: *Acta Agronomica Sinica* 31 (2005), Nr. 2, S. 159–164

**Zhang et al. 2010**

ZHANG, X-Y. ; LIANG, C. ; WANG, G-P. ; LUO, Y. ; WANG, W.: The protection of wheat plasma membrane under cold stress by glycine betaine overproduction. In: *Biologia Plantarum* 54 (2010), Nr. 1, S. 83–88

**Zhao et al. 2000**

ZHAO, H.W. ; CHEN, Y.J. ; HU, Y.L. ; GAO, Y. ; LIN, Z.P.: Construction of a trehalose-6-phosphate synthase gene driven by drought-responsive promotor and expression of drought-resistance in transgenic tobacco. In: *Acta Botanica Sinica* 42 (2000), S. 616–619

**Zhu 2002**

ZHU, J-K.: Salt and drought stress signal transduction in plants. In: *Annual Review of Plant Biology* 53 (2002), S. 247–273

**Zhu 2007**

ZHU, J-K.: Plant Salt Stress. In: *Encyclopedia of Life Science* (2007). <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0001300.pub2>. – DOI 10.1002/9780470015902.a0001300.pub2



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des <i>SOS-Pathway</i> in Pflanzen zur Regulation des zellulären Ionengleichgewichtes unter Salzstress (Xiong u. Zhu, 2002) . . . . .	4
1.2	Schematische Darstellung einiger <i>compatible solutes</i> aus verschiedenen Strukturklassen wie sie in Bakterien und Pflanzen vorkommen. . . . .	6
1.3	Vergleichende schematische Darstellung der GG-Synthese im Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 und in heterotrophen Bakterien wie <i>A. vinelandii</i> . . . . .	7
1.4	Schematische Darstellung der ABA-abhängigen und ABA-unabhängigen Genregulation in Pflanzen als Reaktion auf Salz- und Trockenstress (Boudsocq u. Luer, 2005). . . . .	9
2.1	Lambda-DNA <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> -Größenstandard(Fermentas). . . . .	21
2.2	<i>Unstained Protein Molecular Weight</i> -Größenstandard(Fermentas). . . . .	21
2.3	Plasmidkarte des pGEM-T-Vektors (Promega). . . . .	22
2.4	Plasmidkarte der 35S-CaMV-Kassette (JIC, Norwich). . . . .	23
2.5	Plasmidkarte des pGreen0029-Vektors (JIC, Norwich). . . . .	23
2.6	Plasmidkarte des pGreenII0229-Vektors (JIC, Norwich). . . . .	24
2.7	Plasmidkarte der Grundstruktur der pCambia-Vektoren (Cambia). . . . .	25
2.8	Plasmidkarte des pB33-Hyg2-Konstruktes (Hühns et al., 2009). . . . .	25
2.9	Plasmidkarte des pLH-AF-Konstruktes (Klähn et al., 2009). . . . .	26
2.10	Plasmidkarte des pG0029-TP-SF-Konstruktes (Dr. S. Klähn). . . . .	27
2.11	Plasmidkarte des pG0029-SF-Konstruktes (Dr. S. Klähn). . . . .	27
3.1	Schematische Darstellung der T-DNA-Region der 35S-Konstrukte. . . . .	40
3.2	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die T-DNA-Region der B33-Konstrukte. . . . .	41
3.3	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die T-DNA-Regionen der rd29A-AF-Konstrukte. . . . .	43
3.4	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die T-DNA-Region des rd29A-GUS-Konstruktes. . . . .	44
3.5	Darstellung des optimierten Transformationsprotokolls. . . . .	45
3.6	Selektion von regenerierten Pflänzchen nach der Transformation des pGII0229-B33-AF-Konstruktes in Albatros. . . . .	46
3.7	Gaschromatografie als Methode zum Nachweis von GG in transgenen Pflanzenextrakten. . . . .	48
3.8	GG-Gehalte in Blättern der 15 transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp. . . . .	49
3.9	Untersuchung des Genotyps der transgenen Alba-AF-Linien durch Transgennachweis mittels PCR. . . . .	49
3.10	Verlauf der Gewächshausversuche. . . . .	51
3.11	Untersuchung zum Wachstum von Wildtyp- und transgenen Pflanzen im Gewächshaus unter Kontroll-, Salzstress- und Trockenstressbedingungen. . . . .	52

3.12	Untersuchungen zum Ertrag und Lagerungsschwund von Wildtyp- und transgenen Pflanzen aus dem Kontroll-, Salzstress- und Trockenstressversuch. . . . .	53
3.13	Vergleich der Knollenform der Linie Alba-AF1 mit dem Albatros-Wildtyp. . . .	54
3.14	Akkumulation ausgewählter niedermolekularer Verbindungen in jungen Blättern verschiedener Kartoffellinien vor Stressbeginn. . . . .	55
3.15	Akkumulation ausgewählter niedermolekularer Verbindungen in jungen Blättern verschiedener Kartoffellinien sieben Wochen nach Stressbeginn unter Kontroll-, Salzstress- und Trockenstressbedingungen. . . . .	56
3.16	Akkumulation von GG und Saccharose in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Blattes. . . . .	58
3.17	Akkumulation von GG und Saccharose in jungen Blättern in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit. . . . .	58
3.18	Akkumulation von GG und Saccharose in den Stolonen nach sieben Wochen Wachstum. . . . .	58
3.19	GG-Akkumulation in jungen Blättern der M2-Generation der transgenen Linien Alba-AF1 und 11 und dem Wildtyp. . . . .	59
3.20	Untersuchung des Genotyps der transgenen Linien Alba-rd29A-AF und Alba-rd29A-GUS durch Transgennachweis mittels PCR. . . . .	60
3.21	Analyse des Wachstums von Wildtyp- und transgenen Pflanzen im Gewächshaus unter Kontroll- und Salzstressbedingungen. . . . .	62
3.22	Ertrag und Lagerungsschwund der transgenen Linien im Vergleich zur Wildtyp-Linie unter Kontroll- bzw. Salzstressbedingungen. . . . .	63
3.23	Vergleich der Knollenmorphologie der transgenen Linien Alba-rd29A-AF5, 9 und 16 mit dem Wildtyp unter Kontroll- bzw. Salzstressbedingungen. . . . .	64
3.24	Akkumulation ausgewählter niedermolekularer Verbindungen in jungen Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp vor dem Beginn der Stressphase. . . . .	66
3.25	Akkumulation ausgewählter niedermolekularer Verbindungen in jungen Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp nach dreiwöchiger Stressphase. . . . .	66
3.26	X-Gluc Färbung von Knollen des Wildtyps, und der transgenen Linie Alba-rd29A-GUS1 aus dem Kontroll- und dem Salzstressversuch. . . . .	66
3.27	Akkumulation von GG in den Knollen aller untersuchten transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp aus dem Kontroll- und Salzstressversuch. . . . .	67
3.28	Akkumulation von GG in jungen Blättern der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit unter Kontroll- und Salzstressbedingungen. . . . .	67
4.1	Mittelwerte der GG-Gehalte in jungen Blättern verschiedener transgener Alba-AF-Linien im Vergleich zum Wildtyp. . . . .	71
4.2	Nachweis der <i>gppPS</i> -Expression mittels RT-PCR. . . . .	72
4.3	Knollenentwicklung entlang der Topfwand. . . . .	76
4.4	Mittelwerte der GG- und Saccharose-Gehalte in den Knollen der transgenen Linien Alba-rd29A AF5, 9 und 16 im Vergleich zum Wildtyp. . . . .	78



# Tabellenverzeichnis

1.1	Zusammenstellung ausgewählter Beispiele für die heterologe Expression von Synthesegenen für <i>compatible solutes</i> in Pflanzen. . . . .	12
3.1	Zusammenfassung der Transformationsereignisse nach Verwendung des Transformationsprotokolls I . . . . .	42
3.2	Zusammenfassung der Transformationsereignisse nach Verwendung des optimierten Transformationsprotokolls II . . . . .	46



# Anhang



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Diese Arbeit hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen.

Rostock, 26.08.2011

Nanette Sievers



# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst gilt meine Dank der gesamten Abteilung Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Bauwe für das angenehme Arbeitsatmosphäre, nette Gespräche, labortechnische Hilfestellungen und auch schöne außerbetriebliche Veranstaltungen.

Ein großer Dank gilt dabei Prof. Dr. M. Hagemann für die hervorragende Betreuung, die motivierenden Gespräche, die hilfreichen Anregungen und die jederzeit offene Tür.

Ganz besonders möchte ich mich bei Manja Henneberg bedanken, die nicht nur durch ihre aufgezeichnete technische Assistenz, Zuverlässigkeit und Hilfsbereitschaft zur Seite stand, sondern während dieser Zeit eine liebe Freundin geworden ist.

Dr. H. Junghans und speziell Dr. K. Muders der Firma NORIKA danke ich für die gute Zusammenarbeit in diesem Projekt, die Bereitstellung der Kartoffelsorten, die Erhebung von Daten, die Regeneration und Erhaltung von Pflanzen und auch die Beantwortung meiner kartoffelspezifischen Fragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mich während dieser Zeit nicht nur finanziell unterstützt, sondern mir auch starken Rückhalt geboten und mir geholfen hat, mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Martin, vielen Dank für alles!