



Regionale wissenschaftliche Konferenz Pflanzenbiotechnologie

veranstaltet durch die
IAPTC&B – Sektionen Österreichs, Deutschlands und der Schweiz

Wien, 22. – 24. März 2006



Programm

Mittwoch, 22.03.06

Eröffnung:

- 13.00 Uhr Begrüßung durch den Vizerektor für Forschung der BOKU Wien
MARTIN GERZABEK
- 13.15 Uhr Bundesminister für Landwirtschaft der Republik Österreich
JOSEF PRÖLL
- 13.30 Uhr „Drei Jahrzehnte Biotechnologie in der IAPTC&B“ (G. WENZEL,
München)

Session 1:

Biotechnologische Anwendungen in Gartenbau, Land- und Forstwirtschaft

- 14.10 Uhr Plenarvortrag: „Sicherung genetischer Ressourcen in der langfristigen Zeitebene – Lagerung durch Kryokonservierung“ (J. KELLER, Gatersleben)
- 14.50 Uhr Plenarvortrag: „Management genetischer Ressourcen in der mittelfristigen Zeitebene – Einsatz der In-vitro-Erhaltung in der Züchtung“ (C. SPRINGMANN, Einbeck)
- 15.30 Uhr Biotechnologische Anwendungen bei Obstgehölzen (M. LAIMER, Wien)
- 16.00 Uhr Kaffeepause
- 16.20 Uhr „Methodische Ansätze zur Etablierung eines photoautotrophen In-vitro-Kulturverfahrens“ (G. EGBERS, Bremen)
- 16.45 Uhr „Molekulare Charakterisierung transgener Reben zur Induktion von Virusresistenz“ (S. LEOPOLD, Wien)
- 17.10 Uhr „Die gezielte Verkürzung der Generationszeit bei Apfel (*Malus x domestica* Borkh.) durch Überexpression ausgewählter Gene der Blütenentwicklung“ (H. FLACHOWSKY, Pillnitz)
- 17.35 Uhr „Comparison of microsatellite markers and retrotransposon based markers (SSAPs) for the detection of genetic variation in oak somatic embryos“ (E. WILHELM, Seibersdorf)
- 18.00 Uhr *Mitgliederversammlung der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie e.V. (als Gäste: Mitglieder der IAPTC&B-Sektionen Österreichs und der Schweiz)*

Donnerstag, 23.03.06

- 9.00 Uhr Vorstellung des EU-Konzepts "Plants for the Future"
(K. METZLAFF, EPSO Gent)

Session 2:

Risiken durch transgene Pflanzen – eine Bilanz langjähriger Sicherheitsforschung und Anwendung

- 9.40 Uhr Plenarvortrag: „Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Pflanzen“ (J. SCHIEMANN, Braunschweig)
- 10.20 Uhr „Wie gefährlich ist der Anbau gentechnisch veränderter Apfelbäume nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft?“ (M.-V. HANKE, Pillnitz)
- 10.45 Uhr Kaffeepause
- 11.05 Uhr „Wirkungen transgener Fructan-Kartoffeln auf die assoziierte Mikroflora“ (A. ULRICH, Müncheberg)
- 11.30 Uhr „Experiences in GM-wheat field testing in Switzerland: Science, administration, NGOs, and public opinion as compared to the US“ (C. SAUTTER, Zürich)
- 11.55 Uhr “The probability of a horizontal gene transfer from Roundup ready soybean to microorganisms. A risk assessment study on the GSF lysimeter station” (T. WAGNER, Neuherberg)
- 12.20 Uhr Mittagspause

Session 3:

Aktuelle Trends in der pflanzlichen Gentechnik

- 13.20 Uhr Plenarvortrag: „Konzepte zur gentechnischen Erzeugung von Pilzresistenz“ (D. STAHL, Einbeck)
- 14.00 Uhr „Agrobacterium-mediated gene transfer to androgenetic pollen cultures of barley and its biotechnological application” (J. KUMLEHN, Gatersleben)
- 14.25 Uhr „Hitzeinduzierte Transgeninaktivierung in Solanaceen“ (I. BROER, Rostock)
- 14.50 Uhr „Resistance against Nepoviruses by transgen induced ‘Gene Silencing’” (P. WINTERHAGEN, Neustadt a. d. Weinstraße)
- 15.15 Uhr „Die Expression eines pflanzlichen und eines Insektengens erhöhen die Pilzresistenz in transgenen Pflanzen“ (J. IMANI, Gießen)
- 15.40 Uhr „Etablierung eines auf Mannose-basierenden Selektionssystems für die Transformation von Zierpflanzen“ (C. SEITZ, Freising)
- 16.05 Uhr Kaffeepause

Session 4: Epigenetik

- 16.25 Uhr „Epigenetik – ein klassischer genetischer Begriff wird kampagne-
tauglich gemacht“ (H.-J. JACOBSEN, Hannover)
- 16.45 Uhr Plenarvortrag: „Epigenetics in plants: from hurdle to handle“
(O. MITTELSTEN SCHEID, Wien)
- 17.25 Uhr „Aktivität rekombinanter PGIPs in transgenen Erbsen“
(A. RICHTER, Hannover)
- 18.00 Uhr Postersession

20.00 Optional: *Gesellige Abendveranstaltung im Heurigenlokal*

Freitag, 24.03.06

Session 5: Biotechnologie und nachwachsende Rohstoffe

- 9.00 Uhr Plenarvortrag: „Die Bedeutung der Biotechnologie für nachwach-
sende Rohstoffe“ (W. PRAZNIK, Wien)
- 9.40 Uhr „NAPUS 2000 – Moderne Biotechnologie für gesunde Lebensmit-
tel“ (A. ABBADI, Holtsee)
- 10.05 Uhr „Nutzung von Wasserlinsen (*Wolffia*) in der Bioproduktion
(R. BOEHM, Bonn)
- 10.30 Uhr „Bioplastik in transgenen Pflanzen: Cyanophycin als geeignete
Quelle für Polyaspartat“ (M. HÜHNS, Rostock)
- 10.55 Uhr Kaffeepause

Session 6: Die Pflanzenzelle in der Grundlagenforschung

- 11.15 Uhr Plenarvortrag: „Stem cell niches in plants“ (T. LAUX, Freiburg)
- 11.55 Uhr „The tobacco gene *ntsm10* is required for microspore embryo-
genesis“ (J. HOSP, Wien)
- 12.20 Uhr „Auxin signalling during pattern formation of somatic embryos of
Larix decidua“ (K. ZOGLAUER, Berlin)

12.45 Uhr *Schlusswort*

Session 1:

Biotechnologische Anwendungen in Gartenbau, Land- und Forstwirtschaft

Keller, Joachim; Grube, Marion; Kaczmarczyk, Anja; Senula, Angelika

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Abteilung Genbank,
Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben, Deutschland

keller@ipk-gatersleben.de

Sicherung genetischer Ressourcen in der langfristigen Zeitebene - Lagerung durch Kryokonservierung

Zunehmende genetische Erosion bedroht die Existenz der pflanzengenetischen Ressourcen und ihre Nutzung in Züchtung und Forschung. Zur Minimierung des Arbeitsaufwandes und Erhöhung des Schutzes der wertvollen genetischen Ressourcen vor Krankheiten und Umwelteinflüssen werden in zunehmendem Maße moderne Labormethoden eingesetzt, die unter den Stichworten In-vitro-Erhaltung und Kryokonservierung summiert werden können. In der langfristigen Zeitebene ist die Lagerung in flüssigem Stickstoff (Kryokonservierung) die einzige ökonomisch vertretbare Option. Während das Prinzip „Bewahrung durch Stillstand molekularer Veränderungen und damit aller Lebensfunktionen bei -196 °C“ einfach ist, ist bei seiner technischen Umsetzung eine ganze Reihe von Faktoren zu beachten, die auf drei Ebenen betrachtet werden können: 1) physikochemische Eigenschaften der Zellen und Gewebe unter dem Einfluss von Kälte und Dehydrierung, 2) passive Veränderungen (Schäden) in den Organen bei Dehydrierung und Kälteeinwirkung sowie deren Reparaturreaktionen und 3) aktive adaptive Antworten der Pflanze auf Kälte und Dehydrierung, die den Kryokonservierungserfolg erhöhen können. Ein Arsenal von empirisch entwickelten Methoden steht der Kryokonservierung zur Verfügung, die diese Ebenen berücksichtigen. In der Kryo-Bank des IPK Gatersleben werden genetische Ressourcen von Kartoffeln, Knoblauch und Minze in der Kryokonservierung gehalten. Bei Kartoffeln wurde seit mehr als 10 Jahren ein genügend großer Fundus von 1000 Akzessionen angehäuft, der Auswertungen und Verallgemeinerungen zulässt. Bei Knoblauch wurde durch den Übergang von In-vivo- auf In-vitro-Material die Erhöhung der Qualität durch die Nutzbarkeit von virusfreiem Material aus der Meristemkultur erreicht. Im Rahmen der Bestrebungen zur europäischen Integration der Erhaltung pflanzengenetischer Ressourcen gewinnt das Modell einer länderübergreifenden mehrortigen Kryo-Bank an Bedeutung.

Springmann, Clemens

Planta Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH, Grimsehlstrasse 31,
D-37555 Einbeck

c.springmann@kws.de

Management genetischer Ressourcen in der mittelfristigen Zeitebene – Einsatz der *in vitro* Erhaltung in der Züchtung am Beispiel Zuckerrübe

Die Verfügbarkeit von genetischer Variabilität ist die Voraussetzung für die Entwicklung von neuen leistungsfähigen Zuckerrüben-Sorten. Neben einem hohen Zuckergehalt und Ertrag wird die Züchtung von krankheitsresistenten Sorten zunehmend wichtiger. Über mehrere Zyklen werden im Zuchtprozess die wertvollsten Nachkommen selektiert. Hierbei werden neben klassischen auch biotechnologische Verfahren angewendet. Methoden der Zell- und Gewebekultur gehören mittlerweile zur Routine; durch eine markergestützte Selektion kann die Auslese verbessert und beschleunigt werden.

Seit ca. 25 Jahren werden bei KWS in einigen Zuchtprogrammen Pflanzen für die Dauer der Prüfungen in Gewebekultur gelagert und bei Bedarf vermehrt. So können auch nach einer mehrjährigen Testphase die Ausgangspflanzen identisch reproduziert und in beliebiger Menge verklont werden. Um den Bearbeitungsaufwand der Kloneerhaltung so gering wie möglich zu halten, wird das Wachstum der Pflanzen durch niedrige Temperaturen und Lichtausschluss stark verlangsamt. Es werden Standzeiten von vielen Monaten erreicht, bis die Klonpflanzen auf frisches Kulturmedium subkultiviert werden müssen.

Neben der Erhaltung von Klonen aus den Züchtungsprogrammen wird auch die Einlagerung von transgenen Klonen zunehmend wichtiger. Im Bereich der Pilz- und Virusresistenzforschung werden Konstrukte getestet, und die erstellten transgenen Pflanzen werden später molekularbiologischen Tests, wie z.B. single copy Nachweis, unterzogen. Insbesondere hinsichtlich einer späteren Deregulierung ist es unumgänglich, auf die eingelagerten Ursprungstransformanten zurückgreifen zu können.

Die Klonbank bei PLANTA/KWS hat einen Umfang von ca. 4000 Klonen. Die Dokumentation erfolgt mit einem auf einer Oracle Datenbank aufgebauten Laborinformations- und Management System (LIMS).

Laimer, Margit; Mendonça, Duarte^{*}; Maghuly, Fatemeh; Marzban, Gorji; Leopold, Stephan; Khan, Mahmood; Balla, Ildiko^{} und Katinger, Hermann**

Pflanzenbiotechnologie Gruppe, IAM, Dept. Biotechnologie, BOKU, Wien, A

^{*} Centro Biotecnologia dos Açores, DCA, UA, Terra Cha, 9700 Angra do Heroísmo, P

^{**} Research Institute for Fruit Growing and Ornamentals H-1223 Budapest, H
E-mail: margit.laimer@boku.ac.at

Biotechnologische Anwendungen bei Obstgehölzen

Pflanzenbiotechnologie als interdisziplinäre Wissenschaft bietet besondere Impulse und Lösungen für landwirtschaftliche Herausforderungen an, vor allem im Fall von holzigen Nutzpflanzen, wie z.B. die rasche Vermehrung ausgewählter Sorten, die Bewahrung wertvoller Genressourcen, phytosanitäre und genetische Verbesserung und Schutz der menschlichen Gesundheit, nicht nur durch ernährungswissenschaftliche, sondern auch durch ökologische Aspekte.

Da viele dieser Aspekte, besonders bei mehrjährigen Pflanzen, Langzeitunterfangen darstellen, kann die Anwendung biotechnologischer Methoden bedeutende Beiträge liefern, wie:

- Die Anwendung von molekularen Markern zur Identifizierung und Konservierung wertvoller genetischer Ressourcen
- Die Detektion von Pathogenen und Eliminierung durch *in vitro* Methoden
- Das Verfolgen neuer Züchtungsziele bei Obstgehölzen und Reben, z.B. Resistenzzüchtung gegen Pathogene
- Die molekulare Bestimmung innerer Qualitätsparameter von Lebensmitteln, z.B. Fruchallergene.

Egbers, Gerlinde und Tantau, Hans-Jürgen

Wolfgang Bock Pflanzenexport KG
Butendieker Landstr. 49 A
D-28357 Bremen
ge@bockbioscience.com

Institut für Technik in Gartenbau und
Landwirtschaft (ITG), Universität Hannover
Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover
tantau@itg.uni-hannover.de

Methodische Ansätze zur Etablierung eines photoautotrophen In-vitro-Kulturverfahrens

Im Rahmen eines AIF-Kooperationsprojektes zwischen dem Institut für Technik in Gartenbau und Landwirtschaft der Universität Hannover und dem Gewebelabor der Firma Wolfgang Bock Pflanzenexport KG (Bremen), wurden methodische Ansätze zur Umstellung des konventionell heterotrophen In-vitro-Kulturverfahrens auf photoautotrophe Bedingungen entwickelt.

Über den verfahrenstechnischen Ansatz der indirekten Begasung (gasdurchlässige Folienverschlüsse, hohe CO₂-Außenkonzentration) wurde ein photoautotrophes In-vitro-Kulturverfahren etabliert und der Einfluss dieser Kulturbedingungen auf das Wachstum und die CO₂-Versorgung von C₃- (Tabak) und CAM-Pflanzen (*Phalaenopsis*) untersucht. Zunächst wurde unter Einsatz eines HDPE-Folienverschlusses und einer CO₂-Außenkonzentration von 1000 vpm photoautotrophes Wachstum bei *Phalaenopsis* in der Bewurzelungsphase induziert. Im Vergleich zum konventionellen, heterotrophen Verfahren wiesen die Pflanzen jedoch ein geringeres Wachstum auf. Dieses wurde auf eine unzureichende CO₂-Versorgung zurückgeführt, die in weiteren Kulturversuchen mit Tabak und *Phalaenopsis* mittels gaschromatographischer CO₂-Analysen punktuell entnommener Gasproben aus den Gefäßen und anhand einer geringen ermittelten Gaswechselzahl von 0,14 h⁻¹ bestätigt wurde. Generell wurde ein positiver Einfluss der CO₂-Begasung auf das Wachstum, speziell den Frischmassezuwachs von Tabak verzeichnet, wohingegen sich dieses bei der Kultur von *Phalaenopsis* nicht feststellen ließ. Hier wurde das Wachstum in erster Linie durch den Zuckergehalt des Mediums beeinflusst.

Neben den beschriebenen Ergebnissen wurde außerdem das CO₂-Gaswechselverhalten von C₃- (Tabak) und CAM-Pflanzen (*Phalaenopsis*) im geschlossenen Messgassystem in Abhängigkeit vom Zuckergehalt des Mediums charakterisiert. Die ermittelten typischen CO₂-Tagesgänge dieser Pflanzenarten ergaben zeitlich verschobene CO₂-Fixierungsphasen, die für C₃-Pflanzen in der Photoperiode und für CAM-Pflanzen hauptsächlich in der Dunkelperiode lagen.

Maghuly, Fatemeh; Leopold, Stefan; Borroto, Fernandez Eduvigis; Schartl, Angelika; Katinger, Hermann and Laimer, Margit

Pflanzenbiotechnologie Gruppe, IAM, Dept. Biotechnologie, BOKU, Wien, A

Molecular characterisation of transgenic grapevines for the induction of virus resistance

A collection of 127 putatively transgenic individuals of *Vitis vinifera* cv. Russalka was characterized by PCR and Southern hybridization. Six different constructs containing the neomycin phosphotransferase (*nptII*) marker gene and sequences of the *Grapevine Fanleaf Virus* Coat Protein (GFLV CP) gene including non-translatable and truncated forms were transferred *via Agrobacterium*-mediated transformation. Detection of transgenic sequences by PCR was positive in all lines. Southern blot analysis revealed that the number of inserted T-DNA copies ranged from 1 to 6. More than 46% of the tested transgenic lines contain one copy of the inserted T-DNA, qualifying them as interesting candidates for further breeding programs. Southern data of one line indicate the presence of an incomplete copy of the T-DNA, thus confirming previous PCR results. Since many putative transgenic lines shared identical hybridization patterns, they were clustered into 39 lines and considered as having originated from independent transformation events. The detection of the tetracycline (TET) resistance genes in 15 % of the lines shows that an integration of plasmid backbone sequences beyond the T-DNA borders occurred. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed on leaf tissue did not show any accumulation of the GFLV CP in the 39 transgenic lines analyzed. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Northern blot were carried out; RT-PCR analyses showed that the GFLV CP mRNA was expressed at variable levels.

Flachowsky, Henryk; Peil, Andreas und Hanke, Magda-Viola

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Obstzüchtung,
Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden

h.flachowsky@bafz.de

Die gezielte Verkürzung der Generationszeit bei Apfel (*Malus x domestica* Borkh.) durch Überexpression ausgewählter Gene der Blütenentwicklung

Die Züchtung neuer Sorten bei Obstgehölzen wie dem Apfel *Malus x domestica* Borkh. ist im Vergleich zu vielen einjährigen Kulturpflanzen viel zeitaufwendiger und teurer. Der Grund dafür liegt in einer langen, oft mehrere Jahre andauernden juvenilen Phase. Um diese zu brechen, sind verschiedene Lösungsansätze denkbar. Eine Möglichkeit besteht in der Unterdrückung von Faktoren, welche die Aufrechterhaltung der juvenilen, vegetativen Phase steuern. Zu diesen Faktoren gehört unter anderem das *TERMINAL FLOWER (TFL1)* Gen. Eine alternative Möglichkeit besteht in der Überexpression von Genen, die eine stimulierende Rolle bei der Entwicklung von Infloreszenz- und Blütenmeristemen spielen. Zu diesen Genen gehört neben dem *LEAFY (LFY)* Gen aus *Arabidopsis* auch das *BpMADS4* Gen der Birke. Beide Gene wurden unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S* Promoters in Apfel exprimiert. Die transgenen Linien wurden im Anschluss mittels PCR und RT-PCR auf Integration und Transkription der übertragenen Zielgene sowie des *nptII* Markergens getestet. Eine erste Quantifizierung der Zielgentranskription erfolgte mittels Real Time PCR. Anhand dieser Ergebnisse wurden ausgewählte Linien bewurzelt und ins Gewächshaus überführt. Eine Blühverfrühung konnte an den *LFY* transgenen Pflanzen bislang nicht detektiert werden. Jedoch zeigten diese Linien deutliche verkürzte Internodien sowie einen veränderten Wuchs. Im Gegensatz dazu konnten acht *BpMADS4* transgene Linie detektiert werden, die bereits während der *in vitro* Phase blühten. Die Blüten dieser Linien wurden morphologisch untersucht. Drei dieser Linien blühten sofort nach der Überführung ins Gewächshaus weiter. Die Pollen dieser Linien wurden bereits auf Vitalität und Keimfähigkeit geprüft. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zu Pollen nicht-transgener Blüten gefunden werden. Erste Kreuzungen an diesen Pflanzen sind für das Frühjahr 2006 geplant.

Wilhelm, Eva; Berenyi, Maria; Burg, Kornel; Fluch, Silvia

ARC Seibersdorf research GmbH, Biotechnology, Division of Biogenetics & Natural Resources, A-2444 Seibersdorf, AUSTRIA

e-mail: Eva.Wilhelm@arcs.ac.at

COMPARISON OF MICROSATELLITE MARKERS AND RETROTRANSPOSON BASED MARKERS (SSAPs) FOR THE DETECTION OF GENETIC VARIATION IN OAK SOMATIC EMBRYOS

Somatic embryogenesis as a vegetative propagation method requires monitoring methods to assess genetic uniformity. Cytological and molecular methods (RAPDs, AFLPs, SSRs) have been used to monitor genetic stability in somatic embryos (SEs) and produced plantlets of the genus *Quercus* ssp. Retrotransposons are mobile genetic elements and ubiquitous in plant genomes. Stress activation of plant retrotransposons (e.g. via tissue culture) has been identified as a factor in somaclonal variation. Several long terminal repeat sequences of Ty1-copia retrotransposon elements have been identified in oak as markers for population studies, and they were used in sequence specific amplified polymorphism (SSAP) analysis. SSAP is a multiplex amplified fragment length polymorphism (AFLP) like technique, where one of the primers is based on specific retrotransposon sequences. We evaluated the applicability of the oak SSAP marker system for assessing genetic variability in SEs and derived plantlets of pedunculate oak (*Q. robur* L.) In addition we compared the results obtained from the SSAPs and SSRs marker systems. Comparisons were made among and within five embryogenic culture lines.

Metzlaff, Karin

European Plant Science Organisation, EPSO, Technologiepark 927, 9052 Gent, Belgium
Karin.Metzlaff@psb.ugent.be www.epsoweb.org

Vorstellung des EU Konzeptes “Plants for the Future”

The European Technology Platform (ETP) “Plants for the Future” was initiated following the March 2003 Council decision to create TPs “in areas of high technological potential,...such as plant genomics” in that year.

The TP met it's first 3 objectives:

- It developed the STAKEHOLDER FORUM to a broad expert base from academia, industry, farmer groups, policy makers and society.
- It articulated a LONG TERM VISION 2025 for the Plant Sector in Europe, published 2004.
- The TP developed the Stakeholders Proposal for a STRATEGIC RESEARCH AGENDA 2025 (SRA) including a Draft Action Plan 2010. These proposals were discussed in 20 European countries and with members of the European Parliament and the European Commission. Using the feedback from these consultations the SRA and 1st Action Plan will be finalised in October 2006.

To foster the implementation of the Vision 2025 and SRA 2025 the TP will continues its work by:

- Developing an information platform, the DATABASE of EU-wide research to identify the state of this sector across Europe.
- Analysing the data in a “EUROPEAN MAP” identifying gaps and overlaps in research at national and European level
- Discuss this map with policy makers at national and European level in CONSULTATIONS to foster the implementation of the SRA, pointing towards the need for new strategic initiatives and improving trans-national cooperation and coordination among Member and Associate States.
- COMMUNICATING the TP's recommendations and activities to the wider public ensuring transparency and openness.

This ETP is coordinated by EPSO and EuropaBio. Information is available at www.epsoweb.org/Catalog/TP/index.htm . Contact the ETP by e-mail to PlantTP@psb.ugent.be .

EPSO's first priority is contributing to science policy. Examples are the ETP “Plants for the Future”, the Initiative for Science in Europe (ISE) to create the European Research Council, and support to the ERA-Net on Plant Genomics (ERA-PG) to help coordinate and open up national programs.

EPSO's second priority is boosting science itself. Examples are EPSO workshops to promote promising but still fragmented areas of research, EPSO conferences discussing cutting edge science from all disciplines in plant science, as well as science policy and science and society issues. EPSO articulates a long term vision and considers developing information resources and enhance its networking activities in future.

Session 2:

Risiken durch transgene Pflanzen – eine Bilanz langjähriger Sicherheitsforschung und Anwendung

Schiemann, Joachim

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)

Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig

j.schiemann@bba.de

Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Pflanzen

Weltweit wurden im Jahr 2005 auf ca. 90 Millionen Hektar gentechnisch veränderte (GV) Pflanzen kommerziell angebaut (ISAAA Brief No. 34-2005). Im Vergleich dazu: die gesamte Ackerbaufläche Deutschlands beträgt ca. 12 Mio. ha, die Gesamtfläche Deutschlands 35,7 Mio. ha. Bevor GV Pflanzen und/oder daraus hergestellte Produkte zur Vermarktung zugelassen werden, unterliegen sie einer intensiven Sicherheitsbewertung.

Mit der Einrichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority - EFSA) wurde eine Trennung zwischen Risikobewertung und Risikomanagement auf Europäischer Ebene vollzogen - auch für den Bereich der GV Lebens- und Futtermittel. Die EFSA ist kein Bestandteil der Europäischen Kommission und wird von einem unabhängigen Vorstand kontrolliert. Sie wird von acht wissenschaftlichen Gremien beraten, darunter auch einem wissenschaftlichen Gremium für GV Organismen (GVO-Panel). Entsprechend dem Artikel 29 §1 der Verordnung 178/2002 gibt die EFSA eine wissenschaftliche Stellungnahme ab (i) auf Ersuchen der Kommission, (ii) auf eigene Initiative, (iii) auf Ersuchen des Europäischen Parlamentes oder (iv) auf Ersuchen eines Mitgliedsstaates.

In der Sitzung des Beirates der EFSA im Mai 2003 sprachen sich dessen Mitglieder für eine Harmonisierung der bestehenden Leitlinien für die Risikobewertung von GVO aus und beschlossen, das GVO-Panel mit der Ausarbeitung eines Leitlinienentwurfes zu beauftragen. Das im Juli 2005 veröffentlichte Leitliniendokument (Guidance document of the GMO Panel for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed; www.efsa.eu.int) leistet einen wichtigen Beitrag zur Harmonisierung der Sicherheitsbewertung von GVO auf Europäischer Ebene.

Das komplexe Thema der Sicherheitsbewertung von GV Pflanzen wird benutzerfreundlich im Rahmen des EU-finanzierten Projektes GMO-Compass (www.gmo-compass.org) vermittelt.

Hanke, Magda-Viola; Reim, Stefanie; Peil, Andreas und Flachowsky, Henryk

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Obstzüchtung,
Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden, v.hanke@bafz.de

Wie gefährlich ist der Anbau gentechnisch veränderter Apfelbäume nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft?

Der Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Auch in der Obstzüchtung, hier in erster Linie beim Apfel *Malus x domestica* Borkh., wurden bereits umfangreiche Arbeiten zur Erstellung transgener Pflanzen durchgeführt. Doch mit der Anwendung gentechnischer Methoden wuchsen auch die Bedenken der Verbraucher. So wurden vor allem Fragen zur Stabilität übertragener Gene sowie zum Risiko einer unkontrollierten Verbreitung gentechnisch veränderter Organismen laut. Zur Beantwortung solcher Fragestellungen wurden am Institut für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Dresden-Pillnitz mehrere Studien durchgeführt. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Großteil aller untersuchten gentechnisch veränderten Bäume über viele Jahre stabil war. Pflanzen, bei denen ein Verlust der übertragenen Gene oder deren Expression festgestellt wurde, waren die Ausnahme.

Um die Gefahr einer Auskreuzung von gentechnisch verändertem Erbgut über den Weg des Pollens bewerten zu können, wurden in einer bestehenden Apfelanlage Untersuchungen zum Pollentransport durchgeführt. Dafür wurden Pollenspenderbäume einer rotlaubigen Apfelwildart sowie Pollenfängerbäume verschiedener Apfelsorten ausgewählt. Nach freier Abblüte wurden Früchte der Pollenfänger geerntet, und die Samen zur Aussaat gebracht. Über den Anteil rotlaubiger Sämlinge wurde anschließend das Ausmaß der Auskreuzung bestimmt, welches in einem Bereich von 5-10m um die Pollenspenderbäume am größten war. Mit zunehmender Entfernung ging dieser Anteil jedoch stark zurück und lag im Durchschnitt bei 1,8%. Die Ergebnisse dieses Versuches wurden anschließend mit Hilfe von spezifischen SSR-Markern überprüft.

Zusätzlich wurden Untersuchungen zum Windtransport von Apfelpollen sowie zum Transport von Transgenen und deren Produkten zwischen verschiedenen Veredlungskomponenten einer Pflanze durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen dienen als Grundlage für eine Risikobewertung beim Anbau gentechnisch veränderter Äpfel.

Ulrich, Andreas; Becker, Regina

Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF), Institut für Landschaftsstoffdynamik, Eberswalder Str. 84, D-15374 Müncheberg
aulrich@zalf.de, rbecker@zalf.de,

Wirkungen transgener Fructan-Kartoffeln auf die assoziierte Mikroflora

Bei fructanbildenden Kartoffellinien kann es durch eine Verschiebung des Kohlenhydratspektrums zu einer Veränderung der Nahrungsgrundlage in der Rhizo- und Phyllosphäre und damit zu einer Beeinflussung der pflanzenassoziierten Mikroflora kommen. Davon ausgehend wurden die Auswirkungen transgener fructanbildender Kartoffellinien (Integration der Gene für SST- bzw. SST/FFT aus Artischocke) auf die Mikroflora über die Bestimmung der bakteriellen und pilzlichen Populationsdichten und die T-RFLP-Analyse der 16S rDNA bzw. der pilzlichen ITS rDNA-Region untersucht. Die Untersuchung der mikrobiellen Besiedlungsdichten sowie der bakteriellen Gemeinschaften der Rhizosphäre ergab keine klaren Unterschiede zwischen transgenen und konventionellen Kartoffellinien. Daneben zeichnete sich ein klarer Einfluß der Bodenunterschiede innerhalb der Versuchsanlage ab. Der offenbar starke Einfluß von Umweltfaktoren auf die Rhizosphärenmikroflora zeigte sich auch in einer Baseline-Studie, in der neun Kartoffelschläge mit unterschiedlichem Bodenausgangsmaterial untersucht wurden. Die bakteriellen Gemeinschaften wurden eindeutig durch den Untersuchungsstandort geprägt, der Einfluss der Kartoffelsorten erwies sich als vernachlässigbar. In der Phyllosphäre hingegen konnte im Ergebnis der T-RFLP-Analyse ein Effekt der SST/FFT-Linien auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften festgestellt werden, der auch durch den Vergleich der Klonbibliotheken der 16S rDNA einer SST/FFT-Linie und der isogenen Kontrolle bestätigt wurde. In Auswertung beider Analysen zeigten die SST/FFT-Linien eine reduzierte genetische Diversität in den bakteriellen Gemeinschaften. Dabei war nicht eindeutig zu klären, ob es sich um einen Linieneffekt oder um einen spezifischen Effekt der Transgene SST + FFT handelt. Wenn man jedoch das relativ geringe Ausmaß der Wirkung der transgenen Linien auf die Mikroflora im Zusammenhang mit den geringen Fructangehalten in den Blättern/Wurzeln betrachtet, ergeben sich insgesamt keine Hinweise auf ein erhöhtes Risiko durch die untersuchten transgenen Linien.

Schlaich, Thomas and Sautter, Christof.

Institute of Plant Science, ETH Zurich, Universitätsstr. 2, 8092 Zurich, Switzerland
christof.sautter@ipw.biol.ethz.ch

Experiences in GM-wheat field testing in Switzerland: Science, administration, NGOs, and public opinion as compared to the US.

The viral gene for the killer protein 4 (KP4) has been explored for its anti-fungal effect in genetically modified wheat to defeat specifically the seed transmitted smut and bunt diseases. *In vitro* both important seed transmitted diseases of wheat, loose smut (*Ustilago tritici*) and stinking smut (*Tilletia caries*) are susceptible to KP4, whereas all other organisms tested so far proved to be not susceptible to Kp4. For studies *in planta* we used *T. caries* as a model fungus. In greenhouse experiments, two KP4-transgenic wheat lines showed up to 30% lower symptom development as compared to the non transgenic control. As the last step in the proof of concept, a field trial has shown for the first time increased fungal resistance of a transgene in wheat. Due to its high specificity against smuts and bunts, KP4 exposes very low risk to humans and the environment.

Field testing in Switzerland is regulated since two years by a very strong law, which for research is acceptable, if legally and scientifically correctly applied, but makes it very difficult to compete with e.g. field testing in the US. Biased information given to the public by NGOs makes the situation not easier also for the legal authorities.

www.feldversuch.ethz.ch

Wagner Tobias; Ernst Dieter; Laura Arango

GSF Research Center for Environment and Health
Institute of Biochemical Plant Pathology
Ingolstaedter Landstrasse 1, D-85764 Neuherberg, Germany
tobias.wagner@gsf.de

The Probability of a Horizontal Gene Transfer from Roundup Ready Soybean to Microorganisms
A Risk Assessment Study on the GSF Lysimeter Station

One of the major concerns in terms of environmental impacts of transgenic crops is the possibility of a transfer of the transgenic DNA. This can be caused by pollen flow resulting in hybridization with related species (vertical gene transfer) or by non-sexual exchanges of genetic information between different genomes (horizontal gene transfer, HGT). One essential mechanism for HGT is homologue recombination, which can cross borderlines from species level up to kingdom level.

In the frame of a 5 year risk assessment study under field conditions located at the GSF lysimeter station, we are testing the probability of a HGT by homologue recombination under the selection pressure of the herbicide Roundup from Roundup Ready soybean to the symbiotic microbial partner *Bradyrhizobium japonicum*. Resulting from the transformation of a glyphosate tolerant 5-Enolpyrovylshikimate-3-Phosphate-Synthase (EPSPS) deriving from *Agrobacterium* spec. Roundup Ready soybean is tolerant to the herbicide Roundup. Batch culture studies show a high sensitivity of *B. japonicum* to Roundup. Furthermore sequence comparisons show high similarities between the transgenic EPSPS and the *B. japonicum* EPSPS. Both facts and the close association of plant and bacteria within soybean root nodules support the risk of a HGT. For the detection of transgenic DNA within *B. japonicum*, bacteria were isolated from root nodules and tested with different specific Taqman assays. After two years with two vegetation periods of Roundup Ready soybean and Roundup applications, in all samples already tested no transgenic DNA was detected.

Session 3:

Aktuelle Trends in der pflanzlichen Gentechnik

Pflugmacher, M.¹; Brieß, W.¹; Rohlf, C.¹; Mäser, A.¹; Kurrasch, J.¹; Holtschulte, B.²; Truberg, B.²; Schmidt, K.¹; Nehls., R.¹ and Stahl, D. J.¹

¹Planta GmbH, Grimsehlstraße 31, D-37555 Einbeck, Deutschland

²KWS SAAT AG, Grimsehlstraße 31, D-37555 Einbeck, Deutschland

e-mail: d.stahl@kws.com

Konzepte zur gentechnischen Erzeugung von Pilzresistenz

Pflanzenerkrankungen, die durch parasitäre Pilze hervorgerufen werden, zählen weltweit mit zu den wichtigsten Ursachen von Ernteverlusten und gefährden oftmals durch Mycotoxine in den Ernteprodukten die Sicherheit der Verbraucher. Ein neues Konzept der „Erweiterten Hypersensitiven Reaktion“ zur Verbesserung der Pilzresistenz von Kulturpflanzen wurde entwickelt, dass auf der gezielten Anwendung der induzierten, pflanzlichen Resistenz beruht. Die konstitutive Überexpression von endogenen Resistenzgenen der Zuckerrübe, der Kartoffel und des Weizens löst eine massive R-Gen abhängige Verteidigungsreaktion in den Pflanzen aus. Diese Verteidigungsreaktion äußert sich oftmals in dem Tod der transformierten Zellen - der Hypersensitiven Reaktion. Um diese Form der induzierten Resistenz nutzbar zu machen, wurde die Expression der R-Gene unter die Kontrolle von synthetischen, pathogeninduzierbaren Promotoren gestellt. Die pathogenspezifischen Promotoren wurden aus natürlichen, pathogenresponsiven Promotoren der Petersilie und der Kartoffel abgeleitet und unterscheiden sich von den Spenderpromotoren durch ihre höhere Spezifität (Rushton et al., 2002). Die synthetischen, pathogenspezifischen Promotoren wurden durch Reporterstudien auf ihre Eignung in transgenen Zuckerrüben getestet. Zwei ausgewählte Promotoren wurden mit Zelltod auslösenden R-Genen kombiniert und in Zuckerrüben transformiert. Die transgenen Pflanzen zeigen unter Gewächshausbedingungen eine reproduzierbare Verbesserung der Resistenz gegenüber *Cercospora beticola*, dem wichtigsten Schadpilz der Zuckerrübe. Damit wurde der funktionelle Nachweis erbracht, dass mit Hilfe der grünen Gentechnik natürliche pflanzliche Abwehrmaßnahmen durch die kontrollierte Expression von pflanzeneigenen R-Genen zur Verbesserung der Pilzresistenz genutzt werden können.

Kumlehn, Jochen

Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research Gatersleben
Plant Reproductive Biology, Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany
kumlehn@ipk-gatersleben.de

Agrobacterium-mediated Gene Transfer to Androgenetic Pollen Cultures of Barley and its Biotechnological Application

A reproducible and efficient method for *Agrobacterium*-mediated transformation of barley pollen cultures undergoing androgenetic development has been developed. The most exciting aspect of gene transfer to haploid target cells such as microspores is the unique opportunity to immediately generate plants homozygous for the transgene. However, since spontaneous genome doubling typically happens very early in androgenetic development, i.e. predominantly before transgene integration can be accomplished by agrobacteria, only a few homozygous transgenic plants are immediately obtained by this method. Moreover, these true-breeding transgenic individuals cannot be directly discriminated from the hemizygous ones and have thus to be identified via tedious and time-consuming analysis of the progeny's segregation as is generally necessary following transformation using somatic target cell systems. Pursuing a novel concept, haploid plantlets which represent about half of the primary transgenics obtained following gene transfer to androgenetic barley pollen were identified by flow cytometry at an early stage of development and subjected to induced genome doubling. While haploid barley is generally sterile, almost all colchicine-treated transgenics showed at least partial seed set and all progeny plants generated turned out to be homozygous for the transgene. We thus provide evidence that there is no further need to analyse segregation of the exclusively homozygous transgenic T₁ populations generated this way. This novel technology is routinely employed in our laboratory to produce several hundred primary transgenic barley plants per year. Results from current experimental approaches including the development of cell-specific gene expression systems, overexpression or knock-down of pathogen-related genes as well as an example of mutant complementation are presented.

Huckauf, J.; Neumann, K.; Kerbach, S.; Knöchel, N. and Broer, I.

Universität Rostock, Justus v. Liebigweg 8; D-18051 Rostock
Inge.Broer@uni-rostock.de

Heat induced transgene inactivation in Solonaceae

The inactivation of transgenes during periods of stress or environmental changes has already been demonstrated in tobacco plants carrying different transgenes like *nptII* or *luc* during a heat treatment (37 °C) (Broer, 1996, Neumann et al., 1997, Köhne et al., 1998). Detailed analysis was carried out for the herbicide resistance gene *pat* (*pat40*), consisting of a 823bp CaMV35S promoter, the *pat* coding region isolated from *Streptomyces viridochromogenes* and the *nos* termination signal. After a 10 days cultivation period at 37°C, the activity of *pat40* was strongly reduced in 100% of 27 independent lines. This reversible reduction occurred in sterile and unsterile culture in the first, second and third generation. The inactivation was not correlated with changes in DNA methylation. Neither the enzyme activity, the protein nor the *pat40* specific RNA could be detected in the heat treated plants, regardless of the number of copies and the hemi -or homozygous state of the transgene. In contrast to this, the expression of the synthetic *patS* coding region fused to the 534 bp CaMV35S promoter and coding for essentially the same protein, was stable in heat treated plants. The exchange of the GC rich coding region of the *pat40* gene by the AT rich synthetic DNA fragment carrying the *patS* coding region in the *pat 43* gene led to the stabilization of the specific RNA steady state level. However, the amount of the transgene-encoded protein at 37°C depended on the 5' UTR, the terminator sequence and the insertion locus. Hence, two different mechanisms are involved in the heat induced inactivation. Both are transmitted by a specific signal to non heat treated parts of the plant. The formation of the transmitting signal is possible even in the wild type plant.

The heat induced inactivation of *luc* and *pat* could also be observed in transgenic potato plants, but only at 38°C.

1. Broer, I. Stress inactivation of transgenes. *Field Crops Research*, 45:19-25 (1996)
2. Neumann, K.; Köhne, S.; Broer, I. Heat treatment results in a heritable loss of transgene encoded activities in several *Nicotiana tabacum* lines. *Plant Physiology*, 115: 939-947 (1997)
3. Köhne, S.; Neumann, K.; Pühler, A.; Broer, I. The heat treatment induced reduction of the *pat* gene encoded herbicide resistance in *Nicotiana tabacum* can be influenced by modifications of the transgene sequence. *J. of Plant Physiology* 153, 5/6: 631-642 (1998).

Winterhagen, Patrick; Cobanov, P.; Dubois, C.; Kehrer, Ch.; Manthey, T.; Paschiller, P.; Sinn, M.; Wetzel, T.; Jardak-Jamoussi¹, R.; Krczal, G. and Reustle, G.M.

RLP AgroScience GmbH, AIPlanta – Institute for Plant Breeding, Breitenweg 71,
67435 Neustadt a. d. Weinstraße, Germany

¹ Centre de Biotechnologie a la Technopole de Borj-Cédria, Hammam-Lif 2050,
Tunisia

E-mail: goetz.reustle@agrosience.rlp.de

Resistance against Nepoviruses by transgen induced 'Gene Silencing'

The Fanleaf disease, caused by a group of nepoviruses, is a major viral disease in viticulture world-wide. Affected vineyards reveal dramatically loss in yield and quality of the grapes. A transgenic approach was chosen to develop rootstocks and cultivars resistant against the most relevant agents of the disease based on post transcriptional gene silencing (PTGS). For proof of concept gene constructs consisting of several virus derived sequences were genetically transferred into *Nicotiana benthamiana* by *Agrobacterium* mediated transformation.

Molecular analysis showed transgen induced mRNA degradation through PTGS resulting in accumulation of small interfering (si)RNA in most of the transgenic lines. *Agrobacterium* infiltration of WT and transgenic *N. benthamiana* with an binary vector consisting of a GFP coding sequence attached to a virus-sequence, homologous to the sequence used in the transgen, yielded GFP expression in the WT plants whereas no GFP expression was observed in some transgenic lines. Challenge inoculation with the native virus and Agro-infiltration with the GFP-virus vector was performed on transgenic lines simultaneously to compare the silencing model and virus resistance.

Results show that silencing of the GFP-Virus-model did not always correspond to virus resistance demonstrated by challenging inoculation. Furthermore resistance and / or silencing behaviour inbetween and within independent transgenic lines were inconsistent.

Imani, J.; Langen, G.; Altincicek, B.; Vilcinskas, A.; Hückelhoven, R. und Kogel, K.-H.

Interdisziplinäres Forschungszentrum für Umweltsicherung, Institut für Phytopathologie & Angewandte Zoologie, Justus-Liebig Universität, Heinrich Buff-Ring 26-32, D-35392 Gießen

E-Mail: Jafargholi.imani@agrar.uni-giessen.de

Die Expression eines pflanzlichen und eines Insektengens erhöhen die Pilzresistenz in transgenen Pflanzen

Die Bekämpfung phytopathogener Pilze zur Minderung von Ernteverlusten bei Kulturpflanzen steht in der Landwirtschaft weltweit im Vordergrund. Dabei wird die Erstellung resistenter Sorten durch klassische Resistenzzüchtung oder durch die moderne Technologie eines artübergreifenden Transfers von Genen aus anderen Quellen angestrebt.

In dieser Arbeit wurden zwei Gene verwendet und deren Effekte auf die Entwicklung von Krankheitserregern untersucht:

1. Das Bax Inhibitor-1 Gen aus der Gerste (*HvBI-1*)

Wie in der Literatur beschrieben, kann durch Überexpression des humanen oder des *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 Gens (*BI-1*) Zelltod inhibiert werden [1]. In Gerste erhöht die Überexpression von BI-1 die Anfälligkeit gegen das biotrophe Blattpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* [2]. Für weitere Untersuchungen der BI-1-Effekte auf die Entwicklung von anderen Krankheitserregern haben wir mittels *Agrobacterium*-vermittelter Transformation transgene Karottenpflanzen (*Daucus carota* ssp. *sativus*, cv. Rotin) erstellt [3]. Hierbei wurden sowohl induzierbare als auch konstitutive Promotoren verwendet.

2. Gallerimycin

Während der Immunantwort der Großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) wird ein neuartiges antifungales Peptid (Gallerimycin) exprimiert [4]. Zur Stärkung der Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen phytopathogene Pilze wurde dieses Insekten-Defensin in transgenem Tabak unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert und die Expression mittels SDS-PAGE verifiziert. Die antifungalen Effekte von gallerimycinhaltigen Blattextrakten und die parasitäre Entwicklung von *Erysiphe cichoracearum* und *Sclerotinia minor* auf Blättern wurde getestet.

In beiden Fällen werden die erzielten Ergebnisse diskutiert.

Literatur:

[1] Hückelhoven, R. 2004. Apoptosis 9, 299-307.

[2] Hückelhoven, R., Dechert, C., Kogel, K. H. 2003. P.N.A.S. U.S.A.. 100, 5555-5560.

[3] Imani, J., Berting, A., Nitsche, S., Schäfer, S., Gerlich, W. H, Neumann, K. H. 2002. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 71, 157-164.

[4] Seitz, V., Clermont, A., Wedde, M., Hummel, M., Vilcinskas, A., Schlatterer, K. and Podsiadlowski, L. (2003) Developmental and comparative immunology 27, 207-215.

Seitz, Christian¹; Bruna, Simona²; Li, Houhua¹; Hirsche, Jörg¹; Hauser, Bernhard¹; Forkmann, Gert¹

¹Lehrstuhl für Zierpflanzenbau und gartenbauliche Pflanzenzüchtung, TU München, Am Hochanger 4, D-85350 Freising, Deutschland

²CRA – Istituto Sperimentale per la Floricoltura, Corso Inglesi 508, 18038 Sanremo, Italien
E-mail: christian.seitz@wzw.tum.de

Etablierung eines auf Mannose-basierenden Selektionssystems für die Transformation von Zierpflanzen

Ein viel versprechendes alternatives Selektionssystem für die Produktion transgener Pflanzen basiert auf Mannose als Selektionsagens. Wenn Mannose als C-Quelle angeboten wird, akkumuliert es meist als Mannose-6-Phosphat, da es von Pflanzen in der Regel nicht verstoffwechselt werden kann. Durch die Verwendung eines Gens für die Mannose-6-Phosphat-Isomerase (PMI) werden transgene Zellen in die Lage versetzt, Mannose-6-Phosphat als Kohlenstoffquelle zu nutzen, da PMI die Umwandlung in Fructose-6-Phosphat katalysiert.

Unser Ziel besteht in der Etablierung dieses „positiven“ Selektionssystems für die Transformation von Zierpflanzen. Als Versuchspflanzen wurden *Torenia*, *Petunia*, und *Osteospermum* ausgewählt. Vorversuche zeigten, dass die Regeneration von Sprossen aus Blattexplantaten von *Petunia* und *Osteospermum* bei Konzentrationen im Bereich von 2 bis 5 g/l Mannose und 20 g/l Saccharose im Regenerationsmedium deutlich reduziert ist. Explanate von *Torenia* dagegen wurden erst bei sehr hohen Mannose- und reduzierten Saccharose-Gehalten inhibiert. In Enzymextrakten aller verwendeter Pflanzen konnte mit einem spektrophotometrischen Enzymtest keine PMI-Aktivität nachgewiesen werden.

Die erfolgreiche Infektion durch *Agrobacterium tumefaciens* mit einem entsprechenden *pmi*-Konstrukt wurde mit dem histochemischen GUS-Test bei allen drei Arten nachgewiesen. Bei den selektierten Regeneraten von *Torenia* konnte die Integration und Expression des PMI-Gens ebenso demonstriert werden wie eine deutliche PMI-Aktivität in Enzymextrakten. Im Gegensatz zu *Torenia* konnten allerdings über Mannose-Selektion bei *Osteospermum* und *Petunia* bislang keine transgenen Regenerate gewonnen werden.

Session 4: Epigenetik

Jacobsen, Hans-Jörg

Institut für Pflanzengenetik, Abt. Pflanzenbiotechnologie, Herrenhäuserstr. 2, 30419 Hannover

Epigenetik – wie ein wissenschaftlicher Begriff Kampagnentauglichkeit erlangt

Die Begriffe „Epigenetik“ oder „epigenetische Phänomene“ werden derzeit von Gentechnikkritikern förmlich als Waffen gegen gentechnisch verbesserte Kulturpflanzen ins Feld geführt. Dabei wird – etwa in einer aktuellen Schrift des Ökoinstituts aus Freiburg - der Anschein erweckt, es handele sich hier um etwas völlig Neues. Der Begriff „Epigenetik“, der von der Autorin des Pamphlets gegen die Gentechnik in Stellung gebracht wurde, fand allerdings bereits zu Beginn des 20. Jahrhundert Eingang in das genetische Denken: Er beschrieb, bevor man molekulargenetisch zu kausalen Analysen in der Lage war, all die Phänomene, die nicht mit den herkömmlichen genetischen Modellen oder Vorstellungen erklärbar waren. Epigenetische Phänomene traten somit auch in der Züchtung immer auf und sie werden immer wieder auftreten. Vor allem handelt es sich aber um Phänomene, die in keinem speziellen Zusammenhang mit gentechnischen Anwendungen stehen. Es ist lediglich so, dass man, genauso wie bei klassischen Verfahren, auch bei gentechnischen Anwendungen damit rechnen muss. In aller Regel werden derartige Ereignisse aussortiert, genau wie der klassische Züchter die meisten der von ihm entwickelten Genkombinationen aussortiert und nur diejenigen weiterführt, die seinen Erwartungen entsprechen und die tatsächlich Vorteile bringen.

Ein Beispiel soll dies erläutern:

In einer Kulturpflanze XY besteht das Problem, dass diese Art sehr anfällig ist für Insekten, die die Samen dieser Pflanze besiedeln und ungenießbar machen. Leider ist dies die einzige eiweißreiche Pflanze, die in einer bestimmten Region wächst, weil sie auch tolerant ist gegen Trockenheit. Man findet nun, dass entfernt verwandte Arten resistent sind gegen diese Schadinsekten. Diese Arten wiederum sind aber für Mensch und Tier nicht genießbar, weil sie hemmende Inhaltsstoffe (Amylase- oder Protease-Inhibitoren) enthalten, die die Verdauung lahm legen und das Immunsystem beeinflussen. Nach 10-15 Jahren Züchtungsarbeit erreicht man trotzdem, dass nun die Kulturform eine Insektenresistenz aufweist. Wir nehmen - was nahe liegt - an, dass diese „neue“ Resistenz auf die Ausprägung eines solchen Hemmstoffes (Inhibitors) zurückzuführen ist, der in der Kulturform weggezüchtet wurde. Keine Zulassungsbehörde würde nun verlangen, dass vor einer Markteinführung

- a.) eine toxikologische Prüfung daraufhin durchgeführt werden müsste, auf welchem Mechanismus diese Resistenz beruht oder welche Effekte dieser Inhibitor hat, oder
- b.) ob er in der Kulturform vielleicht anders prozessiert wird, als in der ursprünglichen Wildform, denn schließlich ist diese neue, resistente Sorte ja durch „natürliche“ Verfahren entwickelt worden.

Wäre man anders vorgegangen und hätte das Gen, welches zur Insektenresistenz führt, molekular analysiert, isoliert und in einem Schritt mittels Gentechnik in die bedrohte Kultursorte eingeführt –und so dass Problem in 5-6 Jahren gelöst-, hätten in Europa etwa 50 Behörden in eine Prüfung und Zulassung einbezogen werden müssen.

Transgene Pflanzen werden routinemäßig auf verschiedene Inhaltsstoffe überprüft und man findet bisweilen signifikante Änderungen, die man in Bezug auf das Transgen allein nicht erklären kann – auch hier ist Epigenetik im Spiel. Solche Untersuchungen werden bei konventioneller Züchtung eben nicht gemacht. Deswegen werden gentechnisch veränderte Pflanzen, bei denen man etwas Auffälliges findet, nicht weiter bearbeitet. Bei konventionell gezüchteten werden erst gar keine Fragen gestellt. „Sicherer“ sind sie deshalb nicht. Dies bedeutet aber auch, dass die Erforschung epigenetischer Prozesse ungeheuer spannend ist und daher in allen Kongressen der modernen Pflanzenbiologie diskutiert werden muss.

Mittelsten Scheid, Ortrun

Gregor Mendel-Institute of Molecular Plant Biology
Dr. Bohr-Gasse 3, A-1030 Wien
Phone +43-1-79044 98 30 ; Fax +43-1-79044 90 01
e-mail: ortrun.mittelsten_scheid@gmi.oeaw.ac.at

Epigenetics in plants: from hurdle to handle

While genetic and genomic research focus on heritable information encoded in the DNA sequence, epigenetics is the study of heritable changes in genome function that occur without changes in the DNA sequence. Epigenetic features are determined by chemical modifications of DNA and DNA-associated proteins as well as by chromatin structure and nuclear organization. It is becoming increasingly apparent that epigenetic differences contribute significantly to phenotypic diversity; however, they escape traditional sequence-based marker analysis. As plants are able to maintain epigenetic changes during somatic and sexual reproduction, it is likely that stable, yet potentially reversible, epigenetic modifications may play an important role in plant evolution and plant breeding.

Although a few observations of epigenetic phenomena were reported early in the genetic era, it was not until the failure to express transgenes in plants with the expected success that epigenetic research began to flourish. While the silencing of transgenes was initially seen as a severe technological impediment, researchers soon seized the opportunity to investigate the underlying molecular mechanisms. Plants offer many advantages as experimental models, which has stimulated fruitful biochemical, molecular and especially genetic approaches to identifying parameters and factors involved in epigenetic regulation. The discovery of the epigenetic regulation of transposons, the relationship of small RNA molecules to gene silencing and the identification of many *trans*-acting epigenetic regulators are just a few examples of the impact of plant research in the field. As epigenetic alterations occur in many eukaryotes including humans and seem to be generally involved in cell differentiation as well as in degeneration, the mechanistic insight gained from plant research reaches far beyond the plant kingdom. Furthermore, knowledge about the molecular basis of epigenetic regulation, in combination with genomics, bioinformatics, transgene technology and therapeutic information, equips us with tools that can be used to interfere with regulatory pathways with a degree of specificity, which until recently was not imaginable.

In summary, the perception of epigenetics has changed drastically over the last decade, moving from an unwanted obstacle to a sophisticated, biotechnological tool that has already begun to offer numerous applications in basic research, agriculture and medicine.

Richter, Andrea; Kiesecker, Heiko *; Jacobsen, Hans-Jörg

Institut für Pflanzengenetik, Abt. Pflanzenbiotechnologie, Herrenhäuserstr. 2, 30419
Hannover

*DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig
Richter@lgm.uni-hannover.de

Aktivität rekombinanter PGIPs in transgenen Erbsen

Am Institut für Pflanzengenetik der Universität Hannover wird ein gentechnischer Ansatz zur Resistenzverbesserung der Erbse verfolgt und mit klassischer Züchtung kombiniert. Hierbei wurden transgene Erbsenpflanzen, die verschiedene antifungale Gene integriert hatten, molekular und funktional charakterisiert.

Der Effekt des heterolog exprimierten Polygalakturonase-inhibierenden Proteins (PGIP) aus der Himbeere (*Rubus idaeus* L.) auf verschiedene pilzliche Polygalakturonasen, wurde mittels Agarosediffusionstest überprüft und quantifiziert.

Die Analyse der Mutterlinie (98-19-1,9) und einer Kombinationslinie (02/484) zeigten starke Expressionsunterschiede zwischen Individualpflanzen einer Linie, sowie innerhalb der Pflanze. Zudem hatte das Alter der Pflanzen einen großen Einfluss auf die Expressionsstärke des PGIPs.

Um den Effekt von Hemizygotie und Homozygotie des Transgens auf die Aktivität des rekombinanten PGIPs zu analysieren, wurden Rückkreuzungen mit nicht transgenen Pflanzen der Sorte 'Baroness' durchgeführt. Die resultierenden Hybriden wurden analog zu den Elternpflanzen auf die Aktivität des PGIPs gegenüber pilzlichen Polygalakturonasen analysiert. Zudem sollen die Methylierungsmuster der integrierten Gene bestimmt werden, um Informationen über den zugrunde liegenden Mechanismus zu erhalten. Abschließend sollen Resistenztests durchgeführt werden, um zu zeigen, inwieweit sich diese Expressionsinstabilität des Transgens auf das Resistenzverhalten der Pflanzen auswirkt.

Session 5:

Biotechnologie und nachwachsende Rohstoffe

Praznik, Werner

Universität für Bodenkultur, Department für Chemie, Abt. Organische Chemie,
Muthgasse 18, 1190 Wien, Austria
werner.praznik@boku.ac.at

Die Bedeutung der Biotechnologie für nachwachsende Rohstoffe

Die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen als wesentlicher Ersatz von fossilen Ressourcen gewinnt in den letzten Jahren sowohl auf dem Sektor Erneuerbarer Energien als auch als Grundstock für die Gewinnung industriell hochwertiger Basis- oder Finalprodukte wie z.B. Biopolymere immer mehr an Bedeutung. Zur Erreichung dieser Zielsetzung sind biotechnologische Verfahren zur Modifizierung der ursprünglichen pflanzlichen Rohstoffe eine unabdingbare Voraussetzung.

Die Schwerpunkte in der biotechnologischen Forschung sind dabei deutlich umrissen:

- Modifikation von Pflanzen durch Züchtung und gentechnische Maßnahmen;
 - dadurch maßgeschneiderte Produktion von Pflanzeninhaltsstoffen - Biopolymere wie Amylose/Amylopectin unterscheiden sich in Menge und Struktur
 - Zunahme der Ertragsleistung der kultivierten Pflanzen – Rapspflanzen mit einem höheren ha-Ertrag und/oder mehr Ölproduktion
 - Reduktion des Schädlingsbefalls durch transgene Pflanzenresistenz
- Verbesserung der biotechnologischen Prozesstechnik für die Herstellung von Basis- und Finalprodukten
 - Herstellung von Biosprit – Verbesserung der Ethanolausbeute
 - Modifikation von Holz durch Biotechnologie, enzymatische Entrindung; Produktion von Zellstoff aus einjährigen Pflanzen
 - Produktion von Milchsäure und ihre Umsetzung zu Polylaktiden
 - Herstellung von hochwertigen Biopolymeren für die Medizin
- Einsatz der Grünen Bioraffinerie zur Herstellung von Spezialprodukten und zur Energiegewinnung
 - Verwertung von Gräsern – Proteine und Fasern
 - Herstellung von Biogas

Abbad¹, Amine, Orsini², José und Leckband¹, Gunhild

¹ Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, Hohenlieth, D-24363 Holtsee

² Saaten-Union Resistenzlabor GmbH, Hovedisser Straße 92, D-33818 Leopoldshöhe

NAPUS 2000 – Moderne Biotechnologie für gesunde Lebensmittel

„NAPUS 2000 – Gesunde Lebensmittel aus transgener Rapssaat“ ist eines der drei Leitprojekte, das im Jahr 2005 ausgelaufen ist. Ziel dieses Vorhabens war und ist die grundlegende Erforschung von Raps als wichtigste heimische Öl- und Eiweißpflanze und die Verbesserung ihrer Eigenschaften mit Hilfe biotechnologischer, als auch gentechnologischer Verfahren. Insgesamt haben sich 20 Partner zu einem Verbund zusammengeschlossen, um sich dieser Aufgabe zu widmen. So arbeiten drei Pflanzenzuchtunternehmen, sechs Groß- und mittelständische Unternehmen der verarbeitenden Industrie sowie elf Universitäten und Forschungseinrichtungen aufeinander abgestimmt parallel auf ihren jeweiligen Spezialgebieten. Konzentriert auf fünf Schwerpunkte stehen die Optimierung und Erweiterung der ernährungsphysiologischen Qualität des Rapses auf transgenem und klassischem Züchtungsweg im Mittelpunkt der gemeinsam Forschungs- und Entwicklungsarbeit.

Den Einsatz von modernen molekulargenetischen Techniken für die Züchtung neuer Raps-Qualitäten im Bereich von Antioxidantien und Protein wurde durch die Schaffung einer hoch effizienten Transformation- und Regenerationsplattform von Raps komplimentiert. Eine Reihe von neuen hochwertigen Inhaltstoffen, die in Raps nicht vorkommen, wie z.B. die essentiellen langkettigen omega-3-Fettsäuren und das in Wein vorkommende Resveratrol werden durch diesen biotechnologischen Ansatz angestrebt. Erste Ergebnisse dieser Ansätze werden diskutiert.

**Boehm, Robert¹; Friedrich, Andrea¹; Barth, Stefan², Biselli, Manfred³,
Schnabl, Heide¹**

¹Universität Bonn, Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Karlrobert Kreiten-Str. 13, D-53115 Bonn

²Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Abt. Pharmazeutische Produktentwicklung, Forckenbeckstrasse 6, D-52074 Aachen

³Fachhochschule Jülich, Abt. Zellkulturtechnik, Ginsterweg 1, D-52428 Jülich
r.boehm@uni-bonn.de

Nutzung von Wasserlinsen (*Wolffia*) in der Bioproduktion

Wasserlinsen gehören zur Familie der Araceae und umfassen die kleinsten bekannten Blütenpflanzen. Die Gattung *Wolffia* weist dabei die höchste Kormusreduktion auf. Die nur ca. 1 mm großen Pflanzen besitzen weder Wurzeln noch Leitgewebe oder eine Sproß-Blatt-Differenzierung. Ihr kugeliges Körper - Frond genannt - enthält jedoch eine meristematische Gewebszone, über die sich die Pflanzen vegetativ vermehren und so ihren natürlichen Lebensraum - Gewässeroberflächen - in kurzer Zeit zu überwachsen vermögen. Wasserlinsen weisen einen hohen Protein- und Nährstoffgehalt auf, weswegen sie in früheren Zeiten in Südostasien für die Ernährung von Mensch und Tier kultiviert wurden. Alle diese Eigenschaften machen Wasserlinsen zu einem interessanten Objekt einer möglichen biotechnologischen Nutzung wie z.B. als Nahrungsquelle, zur Abwasserreinigung oder zur Produktion wertgebender Substanzen für den Menschen. Nach einem Screening von 11 verschiedenen Arten der Gattung *Wolffia* wurde *Wolffia australiana* als besonders aussichtsreicher Kandidat für eine robuste *in-vitro* Kultivierung ausgewählt und deren Kulturbedingungen optimiert. Die Pflanzen können in Suspensionskulturen mit einer Biomasse-Verdoppelungszeit von ca. 7 Tagen kultiviert werden. Um die Möglichkeiten einer biotechnologischen Nutzung auszuweiten wurden 2 Transformationsmethoden entwickelt, die auf der Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* beruhen. Dadurch konnte das *gus*-Reportergen mit hoher Effizienz in den Pflanzen zur Expression gebracht werden. Nach Selektion können stabil transgene Linien erhalten werden. Weiterhin wurde die Kultivierung in Airlift-Biofermentern erfolgreich ausprobiert. Die erarbeiteten Techniken sollen nun zur Expression therapeutisch relevanter Proteine (z.B. Antikörper, Vakzine) genutzt werden, um ein effizientes Produktionssystem zu etablieren. Entsprechende Versuche laufen zur Zeit und erste Ergebnisse werden präsentiert.

Hühns, M.¹; **Neumann, K.**¹; **Stephan, D.P.**²; **Ziegler, K.**³; **Lockau, W.**³; **Pistorius, E.K.**²; **Broer, I.**¹

¹ Universität Rostock, Agrar-und-Umweltwissenschaftliche Fakultät, Agrobiotechnologie, Justus-von-Liebig-Weg 8, 18059 Rostock

² Universität Bielefeld, Biologie VIII: Lehrstuhl für molekulare Zellphysiologie, Postfach 100131, 33501 Bielefeld

³ Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Biologie, Biochemie der Pflanze, Chausseestr. 117, 10115 Berlin

maja.huehns@uni-rostock.de

Bioplastik in transgenen Pflanzen: Cyanophycin als geeignete Quelle für Polyaspartat

Die Produktion von Biopolymeren in transgenen Pflanzen soll es ermöglichen, den Verbrauch von Petrochemikalien zu reduzieren. Polyaspartat stellt ein solches biologisch abbaubares Biopolymer dar, das als Ersatz für Polyacrylate genutzt werden kann. Es kann durch Hydrolyse aus Cyanophycin, einem Stickstoffspeicherprotein der Cyanobakterien, das aus einer Polyaspartatkette mit Argininresten besteht, gewonnen werden. Cyanophycin wird über eine Cyanophycin-Synthetase aus den beiden Aminosäuren Arginin und Aspartat gebildet. Kartoffelknollen, die bereits zur Produktion von Stärke in großem Umfang genutzt werden, scheinen für die Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren als Beiprodukt besonders geeignet zu sein, da sie eine kostengünstige Herstellung erlauben sollten.

Bisher wurden drei verschiedene Cyanophycin-Synthetasegene aus unterschiedlichen Bakterien mit dem konstitutiv cytoplasmatischen exprimierenden 35S Promotor fusioniert (Cy1, Cy2 und Cy3) und in Tabak -und Kartoffelzellen eingebracht. Nur mit dem Cy3-Gen war eine Cyanophycinproduktion in Pflanzen möglich. Der Cyanophycingehalt betrug durchschnittlich ca. 0,3% des Trockengewichts. Die Pflanzen zeigten in direkter Korrelation zum Cyanophycingehalt eine veränderte Blattmorphologie, wie eine verdickten Zellwand, fleckige Aufhellungen und eine Wachstumsreduktion.

Um die Polymerproduktion in den Pflanzen zu erleichtern, wurde der Cy3 Kodierbereich mit verschiedenen Transitsequenzen für den Import der Synthetase in den Chloroplasten fusioniert und anschließend in Tabak -und Kartoffelzellen eingebracht. So konnte sowohl in Tabak als auch in Kartoffel der Polymergehalt im Blatt auf ca. 3% gesteigert werden. Die Pflanzen weisen im Gegensatz zur cytoplasmatischen Expression außer einer verdickten Zellwand keine phänotypischen Veränderungen oder Schädigungen auf.

Die knollenspezifische Produktion des Polymers in der Kartoffel könnte die Cyanophycin-Produktion erleichtern. Nach der Expression der Cyanophycin-Synthetase über einen knollenspezifischen Promotor weisen die transgenen Knollen einen erhöhten Polymergehalt in der Knolle von max. 2% auf, allerdings sind diese Knollen sehr klein und stark deformiert.

Session 6:

Die Pflanzenzelle in der Grundlagenforschung

Sarkar, Ananda; Tucker, Elise, Laux, Thomas

Institute of Biology III, Schaezlestr. 1, 79104 Freiburg, Germany

laux@biologie.uni-freiburg.de

Stem cell development in plants

The stem cell populations of the shoot and root meristem are reliably maintained although cells continuously leave the meristem and are replaced by new ones. The stem cells in the shoot meristem are controlled by signaling from an underlying organizing center, expressing the *WUSCHEL* gene (Mayer et al., 1998), and the size of the stem cell population is dynamically regulated by a feedback loop between stem cells and organizing center (Lenhard et al. 2000). This signaling circuitry has the potential to act as a self-regulatory system that is integrated into a larger regulatory network to control organ formation from the shoot apex (Lenhard et al. 2002; Lenhard and Laux 2003). In the root meristem, stem cells maintenance requires short range signaling from the quiescent center (Scheres group). Here we discuss commonalities and differences between both plant stem cell niches.

Hosp, Julia; Belogradova, Kristina; Tashpulatov, Alisher; Yong-Feng, Jin; Ankele, Elisabeth; Akimcheva, Svetlana; Heberle-Bors, Erwin and Touraev, Alisher

Max F. Perutz Laboratories, University Departments at the Vienna Biocenter, Department of Genetics, Vienna University, A-1030, Dr. Bohrgasse 9, Vienna Austria
julia.hosp@univie.ac.at

The tobacco gene *ntsm10* is required for microspore embryogenesis

Isolated microspores of higher plants can be reprogrammed towards sporophytic development by various stress treatments leading to haploid embryos and plants. A novel gene was isolated from stressed tobacco microspores using suppression subtractive hybridisation. The 1.2 kb gene *ntsm10* encodes a 35 kDa protein containing an N-terminal ubiquitin-associated domain (UBA), a C-terminal domain of unknown function (DUF298) and a calcium-binding EF-hand domain. The protein is highly conserved across plant and metazoan species. Our analyses showed that *ntsm10* expression is strongly upregulated in stressed microspores and microspore-derived embryos. Transgenic tobacco RNAi lines displayed defects in pollen in regards to both gametophytic and sporophytic development. The ability of microspores to counteract stress conditions with embryogenesis decreased dramatically, leading to developmental arrest during early embryogenic development. A complementation approach on RNAi lines by retransforming them with a transcriptional silencing (TGS) construct, restored both *ntsm10* levels and wild type phenotype. Thus we could prove that *ntsm10* is required for tobacco microspore embryogenesis.

J.H. was supported by a DOC scholarship granted from the Austrian Academy of Sciences.

Thiel, Johannes and Zoglauer, Kurt

Institut für Biologie, Botanik und Arboretum, Humboldt University Berlin,
Invalidenstrasse 42, 10115 Berlin, Germany
E-mail: kurt.zoglauer@rz.hu-berlin.de

Auxin signalling during pattern formation of somatic embryos of *Larix decidua*

The plant hormone auxin has been implicated in regulating embryonic pattern formation in plants. To study the role of auxin and its transport in embryo development of conifers in the absence of maternal factors, somatic embryogenesis of *Larix decidua* was used as a model system for developmental studies. The addition of auxin transport inhibitors to the culture medium caused alterations of the embryo phenotype. The auxin efflux inhibitor N-naphthylphthalamic acid (NPA) interfered with cotyledon separation or apical-basal axis formation. Similar morphological effects have been provoked by the conjugation of free indole-3-acetic acid (IAA). The soybean GH3 promoter has been shown to be suitable for visualizing auxin distribution *Larix decidua* embryos. Cellular auxin localisation was firstly detected in the late globular stage and revealed a specific distribution pattern with restriction to the differentiating root cap. Exogenous auxin induced a specific expression pattern which changed during embryo development. In the earliest stages an ubiquitous expression in the embryo and suspensor cells was observed, whereas at later stages the expression was localised to the basal pole of the embryo. Treatments of transgenic embryos with auxin transport inhibitors and an antiauxin indicated correlations between auxin distribution and apical-basal patterning. During different developmental stages free IAA concentrations were directly measured using a microscale technique and exhibited a maximum during the late globular stage just before transition to the bilateral symmetry of the embryo. The results indicate evolutionary conserved mechanisms of auxin signalling between conifers and angiosperms during embryonic pattern formation.

Poster

Aurich, Claudia; Brendel, Simone; Rahmat, Adi and Zoglauer, Kurt

Institute of Biology, Humboldt University of Berlin, Invalidenstr. 42, 10115 Berlin,
Germany

e-mail: kurt.zoglauer@rz.hu-berlin.de

Somatic embryogenesis in Nordmann's fir (*Abies nordmanniana*) and its potential application for clonal mass propagation and development of clonal varieties

In conifer species, somatic embryogenesis (SE) is an interesting model system for investigation of patterns and control of embryogenesis. Additionally, it is the basic process for the establishment of biotechnological procedures for clonal propagation and transformation. Both aspects, the fundamental and the practical, will be presented using the example of *Abies nordmanniana*.

Abies nordmanniana has an enormous commercial importance for Christmas tree production in Germany and Europe. It is exclusively grown from seeds harvested from natural populations in the Caucasian mountains. Clonal varieties would help to improve the quality of trees and the cultivation characteristics considerably. SE-based propagation methods are expected to be a realistic possibility to solve these problems within the next decade. In *Abies* spp., SE has been reported for the first time 1989. In the recent years the developmental patterns were described in detail and the protocols for initiation, proliferation, maturation and germination were improved.

The characteristic developmental patterns, the control of embryo development as well as the advantages and limitations for commercial applications will be discussed.

Balla, Ildikó

Res. Inst. for Fruitgrowing and Ornamentals, H-1223 Budapest, Park u. 2., Hungary
ildballa@mikrolab.axelero.net

Micropropagation of black locust and poplars – applied in the forest-tree breeding in Hungary

According to the EU decisions 750,000 ha forest have to be planted in the next 50 years in Hungary. To save the heterogeneity of the natural forests an already 50-year-long breeding work is going on in the Forest Research Institute (Budapest) on the selection of *Robinia pseudoacacia* L. and *Populus spp.* to make forest plantations according to the agricultural or industrial demands.

As well as the selection of the trees, especially in case of forest-trees, takes very long time and the selected tree will become old during this period. Traditional propagation methods (e.g. using root cuttings) are lengthy and the quantity of the produced plants is strictly limited and the mother tree will be seriously injured. To overcome these difficulties offer a proper solution the adequate micropropagation method improved.

Selected mother trees are used for culture establishment. Rejuvenation of the starting material in case of some clones is necessary. Modified MS culture media are used for multiplication and rooting. Artificial microbial inoculation improve the growth of the acclimatized plantlets. During the micropropagation procedure plantlets for mother plantations will be produced to ensure homogeneous starting material for the cheaper traditional mass propagation by root-cuttings or planting forests directly.

The *in vitro* procedure in the near future could be a good opportunity for the health control of the propagated plantlets and focus on the healthy planting material like in case of fruit-trees and improve the quality of forest plantations.

Support of **9-FVM/A-18/K00557/1/2004** is highly acknowledged.

**BALLA, Ildikó¹; KIRILLA, Zoltán¹; NAGY, Apollónia¹; TÓTH, Endre Kristóf²;
KRISTON, Éva² and LAIMER, Margit³**

¹Res. Inst. for Fruitgrowing and Ornamentals, H-1223 Budapest, Park u. 2., Hungary

²Óbuda Ltd, H -1039 Budapest, Királyok útja 226., Hungary

³IAM. BOKU, A -1190 Vienna, Nussdorfer Lände 11. Austria

Examinations of the phytosanitary status of *in vitro* cultures originating from an orchard planted with virus-free material

About 10 years ago a virus-free stone-fruit orchard was planted in the Research Station of the Research Institute for Fruitgrowing and Ornamentals, in Érd. Within 600 meters in the surroundings of the plantation there were no stone fruit plants. To avoid the appearance of viral infections in the virus free plantation strict plant protection systems were applied. The virological status of the trees was controlled by visual observation every year in early summer. In summer 2005, some leaves indicated to be infected. To avoid the long period of biotests, *in vitro* cultures of the suspicious trees (3 apricot, 5 plum cultivars) were established. Testing by molecular techniques of *in vitro* cultures requires only very little sample material. Cultures of every individual bud in the propagation phase were tested for PPV, PDV and PNRV by ELISA, and for ESFY by a PCR method developed by Heinrich et al. (2001). All plantlets with negative ELISA results for PPV were further checked by IC-RT-PCR. PDV and PNRV infections were not found in any of the cultures. PPV and ESFY infections were detected in some of the examined samples as single and mixed infections. We assume that in spite of the careful plant protection, during the very dry, hot and windy summer of 2002 – 2004 some infecting agent reached the orchard, causing the infections of some trees.

Abbreviations: PPV – Plum pox virus, PDV – Prune dwarf virus, PNRV – Prunus necrotic ringspot virus, ESFY – European stone fruit yellows, ELISA – enzyme linked immuno sorbent assay, PCR – polymerase chain reaction, IC - RT – PCR –immuno capture reverse trnscriptase polymerase chain reaction

Heinrich M., Botti S., Caprara L., Arthofer W., Strommer S., Hanzer V., Paltrinieri S., Martini M Katinger H., Bertaccini A. and Laimer da Câmara Machado M. 2001. Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. Plant Mol. Biol. Rep. 19:169 -179. Support by the BMBWK (Austria) project:

"Improved strategies for assuring the phytosanitary and genetic quality for stone fruit planting material in Europe" and by the GKM (Hungary) project: "Virus elimination of stone fruit cultivars and virophyll ornamental plants under *in vitro* conditions", number GVOP-0148, are kindly acknowledged.

Berenyi¹, Maria; Fluch¹, Silvia; Wandl¹, Stefan; Mauleon², Ramil; Friedl¹, Roswitha; Boonruangrod¹, Ratri; Burg¹, Kornel

¹ ARC Seibersdorf research GmbH, A2444 Seibersdorf, Austria, Biogenetics/Natural resources, Bioresources, PICME.

²Entomology and Plant Pathology Division, International Rice Research Institute, DAPO 7777 Metro Manila, Philippines;
Maria.Berenyi@arcs.ac.at, r.mauleon@cgir.org

Isolation and characterisation of gene-near GC rich islands from plant genomes

Considerable body of literature supports the idea that GC rich sequence patches are present near or inside genes of plant genomes and these regions are mostly hypomethylated. Here we describe a simple method for the isolation of these types of sequences by using methylation sensitive restriction endonucleases having GC rich cut sites. In the present study rice (*Oriza sativa*), sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and banana (*Musa species*) genomes were tested and the fully sequenced rice genome served as model organism.

We have established small fragment genomic libraries after digestion of rice, sweetpotato and musa genomic DNA with HpaII and MspI restriction endonucleases and fragments between 200 and 2000 bp were used for library construction. Eventually 704 rice, 260 sweetpotato and 503 banana clones were sequence analysed. Analyses of the sequences revealed that 60-70 % of them contain GC rich regions, CpG islands.

Exact positions of the rice clones could be determined using the rice sequence databases at IRRI and NCBI. Sixty percent of the clones represented gene-related genomic sequences (known genes, hypothetical genes and unknown expressed sequences). More than half of the CpG island like GC rich clusters were associated to gene related sequences in rice, thus the presence of the CpG islands in the cloned fragments is possibly a good indication for the presence of gene near-regions in the filtered libraries of sweetpotato and banana. Therefore, we concluded that the developed filtering method results in the isolation of gene-near genomic regions with high efficiency thus could be applied in identifying genes in different species with less sequence information.

Bleischwitz, Marc; Albert, Markus; Kaldenhoff, Ralf

Technische Universität Darmstadt

Fachbereich Biologie

Schnittspahnstr. 10

D-64287 Darmstadt

Germany

bleischwitz@bio.tu-darmstadt.de, albert@bio.tu-darmstadt.de,

kaldenhoff@bio.tu-darmstadt.de

Assault proteins from the plant parasite *Cuscuta reflexa*, a molecular approach towards plant -plant interaction

The plant holoparasite *Cuscuta reflexa* is a dicotyledonous plant without leaves or roots. *C. reflexa* exhibits inefficient photosynthesis and is therefore dependent on nutrients from a host plant. By use of haustoria *C. reflexa* penetrates a putative host plant and generates tight connections to phloem- and xylem-vessels. *C. reflexa* has a very broad host spectrum including crops. It could cause a significant reduction in plant yield particularly in soybean or tomato production in southern Europe, Asia and America.

To date, just a few details about *Cuscuta* ssp. infections were known, mainly the molecular mechanisms of this plant-plant interaction is yet unidentified. We therefore constructed a cDNA library from *C. reflexa* mRNA consisting of about 7000 clones. The library was differentially screened for genes specifically induced during the infection process. Up to now, approximately 2000 sequences were screened and 30 correspond to induced genes. Among these were cDNAs matching proteolytic and cell-wall loosening enzymes, proteins for signal transduction and genetic mobility. Our current focus of investigation is on a pectinase and a reverse transcriptase.

Boehm, Robert¹; Friedrich, Andrea¹; Becker, Stefanie¹; Hetzel, Christian¹; Stahnke, Bettina¹; Rechmann, Henrik²; Kruse, Cordula¹; Biselli, Manfred²; Barth, Stefan³; Schnabl, Heide¹

¹Universität Bonn, Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Karlrobert Kreiten-Str. 13, D-53115 Bonn

²Fachhochschule Jülich, Abt. Zellkulturtechnik, Ginsterweg 1, D-52428 Jülich

³Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Abt. Pharmazeutische Produktentwicklung, Forckenbeckstrasse 6, D-52074 Aachen
r.boehm@uni-bonn.de

Duckweed (*Wolffia spec.*) cultures as expression system for recombinant therapeutics

The genus *Wolffia*, a member of the monocotyledonous family of Araceae, represents aquatic plants, floating on the surface of still waters. They are known to be the smallest flowering plants in the world. Each plant consists of a disk-like frond without vascular elements and roots. A meristemic center within a reproductive pocket is the origin for the generation of daughter fronds by vegetative budding. With its minimized size and the rapid vegetative propagation *Wolffia* offers an ideal system for the culture in large-scale systems, i.e. in bioreactors. Complex, multimeric human polypeptides, e.g. antibodies or growth factors, have been shown to be synthesized, assembled and modified in a correct and bioactive manner in the endoplasmic reticulum of higher plants such as tobacco. Thus, *Wolffia* ssp. might be a suitable system for the large scale production of such heterologous polypeptides. As a first step, sterilized cultures of *W. columbiana* and *W. australiana* were used to establish a transformation protocol with the *gus* reporter gene in the binary vectors pBI121 and pCAMBIA1301 using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. Stable transformed plant cells could be obtained, showing high GUS activity in staining experiments. Expression of the GUS protein was alternatively achieved by particle bombardment. This opens the possibility to test this higher plant as production system for pharmaceutically relevant proteins.

Boonruangrod, R.; Desai, D. ; Fluch, S. ; Burg, K.

ARC Seibersdorf research GmbH, A2444 Seibersdorf, Austria, Biogenetics/Natural resources, Bioresources, PICME.

kornel.burg@arcs.ac.at

Geographic origin and hybrid haplotype of *Musa* revealed by high resolution genotyping of the cytoplasmic genomes

The diversity of *Musa* genome is constantly expanding with its high rate of somaclonal variations. The current classification based on morphological characters and predicted genomic constitution after crossing over makes this system unreliable for sterile, heterozygous and polyploid *Musa* accessions. Due to its uniparental inheritance cp and mtDNA provides an interesting and comprehensive tool for parental analysis of plants. In this study, we have used cpDNA and mtDNA PCR-RFLP marker system revealing hybrid origins and geographic distribution of 54 *Musa* accessions. Phylogenetic analysis provided the clear distinction between A and B cytoplasm and relationships between their polyploid progenies. Additionally the *acuminata* genotypes could be separated into two geographically separate groups, one representing genotypes from India, Thailand, Malaysia and Indonesia, while genotypes from Philippines and Papua New Guinea formed the other group. The organellar genome analysis of *Musa* showed that the use of universal conserved gene markers of cp and mtDNA is not only useful in determining inter and intraspecific variations but also for confirming the geographic origins of the hybrids.

Desai, D.; Berenyi, M.; Wandl, Stefan; Kopecky, Dieter; Stierschneider, Michael; Fluch, Silvia; Burg, Kornel

ARC Seibersdorf research GmbH, A2444 Seibersdorf, Austria, Biogenetics/Natural resources, Bioresources, PICME.
dhairyasheel.desai@arcs.ac.at,

cDNA Microarray platform for gene expression analysis of Sweetpotato root development.

DNA Microarray technology is powerful tool that allows the simultaneous analysis of selective and differential expression under various conditions of a large number of nucleic acid hybridization experiments in a rapid and efficient fashion. In the proposed work we have created a cDNA Microarray chip containing 15000 clones in duplicates, representing the quantitative and qualitative gene expression in roots of different varieties of Sweetpotato at several growth stages. Five libraries were constructed using SMART cDNA library construction kit, using pGEM-T phage vector from three Sweetpotato accessions with five different growth stages. Approx. 3000 clones were picked from each library and were spotted on a chip. Probe and reaction conditions optimization experiments were carried out. Qualitative analysis of the chip was carried out using probes derived from mRNA extracted from the roots of Sweetpotato plants at different growth stages. Sequencing of all the ESTs spotted on the chip has been completed and annotated. These sequences have been classified and grouped according to their putative functions in the database.

Ewald, Aloma; Seyring, Martina

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e. V. (IGZ), Kühnhäuser Straße 101, D-99189 Erfurt – Kühnhausen.

E-mail: ewald@erfurt.igzev.de, seyring@erfurt.igzev.de,

Interspezifische Hybridisierungen in der Gattung *Cyclamen* durch Embryo Rescue

Interpezifische Hybridisierungen zwischen *Cyclamen persicum*-Kulturformen und anderen *Cyclamen*arten sind nur durch Embryokultur (Embryo Rescue) möglich. Sie dienen der Einbringung von wertvollen Eigenschaften, wie Fusariumtoleranz, Winterhärte oder attraktiven Blattzeichnungen in die Kulturformen. Am IGZ erstellte Hybriden zwischen der Sorte `Reinweiß` und der Wildart *C. purpurascens* entstanden durch die In-vitro-Kultur von Fruchtknoten (nur Zentralplazenta mit Samenanlagen). 2005 erfolgte die Einführung in die gärtnerische Praxis (Sortengruppe ‚Odorella‘).

Für die dauerhafte Etablierung auf dem Markt ist eine Erweiterung des Blütenfarbenspektrums dringend notwendig. Deshalb wurde die Eignung der bereits angewandten Methode des Embryo Rescue für die Kombination von fünf weiteren Sorten mit *C. purpurascens* und drei *C. persicum*-Sorten mit der Wildart (*C. hederifolium*) geprüft. In jeder Kreuzungskombination wurden mehr als 200 Blüten bestäubt (221 – 566). Die In-vitro-Kultivierung erfolgte 21, 28, 35 oder 42 Tage nach der Bestäubung in 45 ml Wulstrandflaschen auf MS-Medium + 3 % Saccharose oder MS-Medium + 6 % Saccharose dunkel bei 24 °C. Nach der Spross- und Wurzelbildung wurden die Embryonen zunächst auf N69, U-Medium oder O-Medium überführt (dunkel, 20 °C.). Die weitere Kultur erfolgte bei 20 °C und Licht. Vor der Gewächshausüberführung wurden die Regeneratpflanzen ca. 4 Wochen bei 8 °C und Licht gelagert.

13 % - 42 % der bestäubten Blüten abortierten. Von den aufgelegten Fruchtknoten waren in Abhängigkeit von der Kreuzungskombination und dem Abnahmezeitpunkt 32 % - 72% unsteril. Embryonen waren 14 % – 49 %. Unabhängig von der Mediumvariante begann kombinationsabhängig ab dem 54. Tag nach der Bestäubung die sichtbare Embryoentwicklung. Die Wahl des väterlichen Partners beeinflusste die weitere Entwicklung. Erste neue Farbkombinationen blühten ca. 13 Monate nach Beginn der Bestäubungen.

Die Autorinnen danken Frau Kerstin Schütze für ihre sorgfältige und kompetente Durchführung der Bestäubungs- und In-vitro-Arbeiten die wesentlich zum Gelingen der Arbeiten beitrugen.

Scholz, Andrea; Groot, Edwin P.; Gleissberg, Stefan

Institut für Spezielle Botanik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Germany
gleissberg@uni-mainz.de

Establishing the California Poppy (*Eschscholzia californica*) as a model plant for basal eudicots

Developmental genetic investigations in model plants such as *Arabidopsis* have provided fundamental insights into the control of plant development. However, flowering plants are extremely diverse morphologically, and we are only just beginning to understand the evolution of developmental mechanisms underlying this diversity. A basic component of flowering plants is the leaf, the main structure supporting photosynthetic function. Not only are flower organs based on a leaf identity, also foliage leaves have evolved a tremendous variety of form. In our group, we seek to understand the evolution of angiosperm leaves, focusing on the basal eudicot family Papaveraceae. In *Eschscholzia* leaf primordia, leaflet production is associated with specific expression of several transcription factors, including *KNOX*, *FLORICAULA*, *YABBY*, and *AINTEGUMENTA* genes. This suggests neofunctionalization of genes during the evolution of leaf dissection. Effects of auxins, gibberellins, and cytokinins on leaf shape and degree of leaf dissection indicate that developmental genes act together with phytohormones to regulate dissected leaf development. To study phenotypic effects of gene expression modulation, we have established (1) *Agrobacterium*-mediated transformation with subsequent regeneration of somatic embryos and (2) Virus-induced gene silencing (VIGS).

M. Griesser, H. Bohlmann, and F.M.W. Grundler

Institute of Plant Protection, Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Peter-Jordan-Str. 82, 1190 Vienna, Austria, phone: +43 1 47654 3350, fax: +43 1 47654 3359, mail: michaela.griesser@boku.ac.at

Tomato expansins in syncytia of *Globodera rostochiensis*

The cyst nematode *Globodera rostochiensis* establishes a syncytial feeding structure in the roots of host plants. Syncytia are formed by the fusion of root cells and their formation is accompanied by local cell wall degradation, fusion of protoplasts and hypertrophy. Expansins are wall-loosening proteins involved in growth and cell wall disassembly.

We studied the expression of the 12 known tomato expansins during syncytium formation. In a semi-quantitative RT-PCR, several expansin genes (*LeExp2*, *LeExp4*, *LeExp5*, and *LeExp11*) turned out to be up-regulated in 7-day-old syncytia. For further studies we focused on *LeExp5* as it is not detected in control roots and showed a specific expression in syncytia. *In situ* RT-PCR showed a localisation of *LeExp5* transcript within young syncytial cells. To determine the role of *LeExp5* during syncytium formation we used RNAi for functional analyses. The RNAi construct was used with different promoters such 35S, *AtPYK20* and *AtSUC2* which were tested to be expressed in syncytia. The transgenic lines were analysed and nematode infection tests were conducted. In some of the lines female formation was reduced considerably.

Hänsch, K.-T.

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.,
Kühnhäuser Str. 101, D-99189 Erfurt-Kühnhausen,
haensch@erfurt.igzev.de

Einfluss der Temperatur auf die Regeneration in vitro an Blattstielsegmenten von *Pelargonium × hortorum* und *Pelargonium × domesticum*

Somatische Embryogenese bietet das Potential auch bei Pelargonien effektivere Vermehrungstechniken zu schaffen. Die gegenwärtigen Möglichkeiten, Pelargonien über diesen Regenerationsweg zu vermehren, sind jedoch noch sehr gering. Ein Schlüsselfaktor für den Typ und das Ausmaß der Regeneration in vitro kann die Temperatur sein (ASAKA et al. 1993, DUBOIS et al. 1988, DECOUT et al. 1994). Das Ziel des vorliegenden Versuches war es deshalb, den Einfluss der Temperatur auf die Art der Regeneration an Blattstielsegmenten in vitro zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Bedingungen gewählt, die eine Eignung für sowohl somatische Embryogenese als auch Sproßbildung gezeigt hatten. Blattstielsegmente von 'Madame Layal' (*P. × domesticum*) und 'PAC Bruni' (*P. × hortorum*) wurden für 4 Wochen auf einem modifizierten MS-Medium mit 10 µmol l⁻¹ NES und 2 µmol l⁻¹ BAP oder mit 2 µmol l⁻¹ NES und 10 µmol l⁻¹ BAP kultiviert und danach für 4 weitere Wochen auf gleiches, jedoch wachstumsregulatorfreies Medium übertragen. Die Kultur erfolgte während der gesamten Zeit bei 19°C, 24°C, 29°C, 34°C oder 39°C.

Das Maximum der Regeneration befand sich nach der Primärkultur bei beiden Wachstumsregulatorkombinationen bei 'PAC Bruni' bei 29°C und bei 'Madame Layal' bei 24 bis 29°C. Bei beiden Sorten konnte eine Verschiebung des Reaktionsmusters zwischen Sproßbildung und somatischer Embryogenese in Abhängigkeit von der Temperatur nicht festgestellt werden. Dies änderte sich auch nach dem Umsetzen der Kulturen auf wachstumsregulatorfreies Medium nicht. Dies zeigt, dass im Gegensatz zu obigen Berichten bei anderen Pflanzenarten, an Blattstielsegmenten von Pelargonien nicht mit einer wesentlichen Steigerung der somatischen Embryogenese durch eine Veränderung der Temperaturbedingungen zu rechnen ist.

ASAKA et al., *Planta Med.* **59**, 345-346 (1993)

DECOUT et al., *J. Exp. Bot.* **45** (281), 1859-1865(1994)

DUBOIS et al., *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 307, Serie III, 669-675 (1988)

Hofmann Julia, Wieczorek Krzysztof and Grundler Florian M.W.

Institute of Plant Protection, Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, BOKU – University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Peter-Jordan Straße 82, 1190 Wien, Austria
julia.hofmann@boku.ac.at, Kwieczor@boku.ac.at, Grundler@boku.ac.at

Sugar supply of nematode-induced syncytia depends on the apoplasmic and the symplasmic transport pathway

The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* infects roots of various plant species such as *Arabidopsis thaliana*. As an obligate parasite its development is fully dependent on nutrients which are provided in specific and metabolically highly active syncytia. Sucrose is the major carbohydrate in the allocation system of most plant species. In *A. thaliana* sucrose is loaded into the transport phloem and unloaded into specific sinks both apoplasmically with the aid of specific transporters and symplasmically through plasmodesmata. In the present work we studied the mechanism employed for sucrose import into nematode-induced syncytia. In fact, the expression of the phloem-specific sucrose transporters *AtSUC2* and *AtSUC4* could be shown using promoter-GUS plants, *in situ* RT-PCR and quantitative RT-PCR. According to these data expression of both transporters was strongly related with syncytium and nematode development. In order to demonstrate a possible symplastic continuity, *Arabidopsis pAtSUC2-gfp* lines were grafted onto wildtype rootstocks. This led to an even distribution of GFP within the phloem of scion and rootstock. In infected plants, GFP was translocated into syncytia of female juveniles ten days after inoculation. This indicates that GFP-permeable plasmodesmata are formed between syncytia and sieve elements. Syncytia of males were never stained. Thus, in the first days of nematode infection sucrose is transported into syncytia first by sugar transporters. At later stages the high demand of syncytia is apparently met by symplasmic transport. Transporters are then employed for sucrose retrieval from the apoplast.

Höhnle, Martin & Weber, Gerd

Institute for Plant Breeding, Seed Science & Population Genetics, Plant Breeding and Biotechnology (350c), University of Hohenheim, Fruwirthstr. 21; D-70599 Stuttgart
hoehnle@uni-hohenheim.de

Towards Transgenic Apple Rootstocks with Increased Resistance against Fire Blight (*Erwinia amylovora*)

Fire blight caused by the bacterium *Erwinia amylovora* (BURR.), is a common and very serious bacterial disease of apple and pear. It was first reported more than 200 years ago in the New York Hudson Valley. Meanwhile fire blight spread through Northern America and Europe. Epidemics can develop rapidly in orchards (with no history of the disease) destroying much of the current crop and killing whole trees within a few months. The disease is so named because infected leaves on very susceptible trees will suddenly turn brown, appearing as though they had been scorched by fire.

To increase the resistance to fire blight in apple at the same time as retaining its desirable characteristics by conventional breeding methods is virtually impossible, because of apple's heterozygosity and long generation time. The use of biotechnology can overcome these obstacles by introducing genes conferring resistance directly in our existing commercial apple cultivars and rootstocks.

Sterile shoot cultures of the apple rootstocks M26 and M9 were established from shoot tips and then subdivided into several sublines that were subcultured at monthly intervals. An efficient regeneration and a suitable protocol for transformation (using *Agrobacterium tumefaciens*) with gene constructs increasing the resistance to fire blight are under construction.

Schwekendiek¹, Axel; Pickel², Benjamin; Höhnle¹, Martin; Spring², Otmar & Weber¹, Gerd

¹ Dep. of Plant Breeding & Biotechnology, Institute for Plant Breeding, Seed Science and Population Genetics, University of Hohenheim, Fruwirthstr. 21; D-70593 Stuttgart;

² Dep. of Phytochemistry & Plant Systematics, Institute of Botany, University of Hohenheim, Garbenstr. 30, D-70599 Stuttgart

hoehnle@uni-hohenheim.de

Hop (*Humulus lupulus* L.) Genetically Transformed with Grape Stilbene Synthase Synthesizes the New Compound Resveratrol Glycoside

Flavonoids comprise an enormous class of secondary plant metabolites with a variety of interesting characteristics. For example, they have been associated with pathogen resistance in plants and are used as flavoring agents in foods and in pharmaceutical preparations. Specifically in hop, unique prenylated flavonoids have been found which attracted recent interest from pharmacologists due to their strong anticancerogenic and phytoestrogenic activity. We have used STS and CHS genes to modify the flavonoid composition in transgenic hop in order to increase its resistance against fungal pathogens. Transgenic hop plants expressing STS have been produced and are currently investigated by HPLC for altered flavonoid composition. These plants are currently evaluated in field trials and *in vitro*. The first results of our analyses will be presented here. In contrast to the enormous available knowledge on the biosynthesis of a variety of basic flavonoid structures, secondary modifications leading to prenylated flavonoids are less well understood at the molecular level. Such modified flavonoids accumulate in unique secretory glands in hop, which occur in high density on the surface of hop cones. So far, no genes involved in formation of prenylated flavonoids have been cloned from hop. We are interested in cloning gland-specific genes responsible for the biosynthesis of prenylated flavonoids and other valuable secondary metabolites (terpenes) from hop. A suitable method for the isolation of pure and intact mRNA from secretory glands has been developed in our laboratory and is presented here. In combination with our hop genetic transformation system, we further aim at developing new transgenic hop varieties with altered flavonoid content and improved pharmaceutical value.

Hönemann, Claudia; Richter, Andrea; Jacobsen, Hans-Jörg

Universität Hannover, Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Pflanzengenetik,
Abteilung Pflanzenbiotechnologie

Herrenhäuserstr. 2, D-30419 Hannover

Claudia.Hoenemann@stud.uni-hannover.de

Untersuchungen zur Etablierung eines Regenerationssystems für *Phaseolus vulgaris* L.

Bei Bohnen (*Phaseolus vulgaris* L.) der Sorte „Scuba“ wurde der Einfluss verschiedener TDZ-Konzentrationen auf die Regeneration der Embryonen untersucht. Desweiteren wurde der Effekt der Dauer (7 Tage oder 4 Wochen) dieser Behandlung analysiert.

Nach der Oberflächensterilisation der Samen wurden Embryonen-Explantate präpariert und auf Murashige und Skoogs Basis Medium mit TDZ (0; 0,25; 0,5 oder 1,0 μM) übertragen. Es folgte eine Vorkultur für 7 Tage beziehungsweise 4 Wochen, auf die jeweils eine vierwöchige Kultur auf hormonfreiem Medium folgte.

Im Anschluss an die Behandlung wurde die Regeneration von Adventivsprossen, die Elongation und die Wurzelbildung untersucht. Bei den Varianten, die bereits nach 7 Tagen auf hormonfreies Medium überführt wurden, war keine Bildung von Adventivsprossen zu beobachten, lediglich die vorhandenen Meristeme wuchsen aus. Bei allen TDZ-Konzentrationen wurde eine gute Elongation sowie Wurzelbildung erreicht.

Die Varianten, bei denen die Explantate 4 Wochen auf hormonhaltigem Medium kultiviert wurden, konnte nach 4 Wochen ausschließlich bei den Varianten mit 0,5 μM und 1,0 μM TDZ die Bildung von multiplen Adventivsprossen beobachtet werden. Bei diesen Varianten war allerdings auch die Elongation sowie die Wurzelbildung deutlich reduziert, zudem kam es an der Basis zu einer erhöhten Kallusbildung.

Kleine, Michael

PLANTON GmbH, Am Kiel-Kanal 44, 24106 Kiel
www.planton.de, kleine@planton.de

Plant Made Pharmaceuticals (PMP) - Produktion therapeutisch relevanter Proteine in Pflanzen

Die PLANTON GmbH nutzt Pflanzen als Bioreaktoren zur Rohstoffherstellung in der Medikamentenentwicklung (Plant Made Pharmaceuticals, PMP). Die Überexpression rekombinanter Proteine in pflanzlichem Gewebe ermöglicht die Entwicklung biotechnologischer Verfahren zur nachhaltigen Produktion rekombinanter Proteine – bei verringertem Energieeinsatz, verbesserter Produktqualität und einer kostengünstigeren Herstellung.

Humane antimikrobielle Peptide (AMPs) sind eine neue Klasse antibiotisch wirksamer Substanzen, die eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Antibiotika darstellen. Zur Nutzung dieser Peptide für die Entwicklung einer neuen Generation von antibiotisch wirksamen Medikamenten in der klinisch - pharmazeutischen Praxis bedarf es großer Mengen (kg bis to-Mengen) dieser Substanz. Ziel der hier dargestellten Arbeit ist die Entwicklung eines ressourcen-, umweltschonenden und kosteneffizienten Verfahrens zur großtechnischen Produktion humaner antimikrobieller Peptide in der Kartoffel.

Durch Expression, Produktion und Aufreinigung aus pflanzlichem Material, das im Gewächshaus angebaut wurde, konnten biologisch aktive AMPs gewonnen werden, die den menschlichen Molekülen identisch sind. Dieser Befund wurde durch molekulare, biochemische und biologische Methoden und Tests gestützt. Erstmals konnte mit den rekombinanten AMPs eine große Anzahl humanpathogener mikrobieller Erreger getestet und damit das Wirkspektrum der AMPs charakterisiert werden. Zur Zeit werden die Moleküle in der präklinischen Entwicklungsphase eingesetzt. Die körperlichen Ersatzstoffe aus der Kartoffelpflanze, die auch die menschliche Haut zum Schutz vor bakteriellen Infektionen produziert, sollen künftig z.B. Menschen bei der Heilung von Brandwunden unterstützen.

Lössl¹, Andreas; Harloff², Hans and Koop³, Hans-Ulrich

¹ Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology (DAPP) University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Gregor-Mendel-Strasse 33, 1180 Vienna, Austria

² Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel, Germany

³ Ludwig-Maximilians-Universität, Faculty of Biology, Department I, Botany, Menzinger Str. 67, D-80638 Munich, Germany

andreas.loessl@boku.ac.at

h.harloff@plantbreeding.uni-kiel.de

koop@lrz.uni-muenchen.de

A novel system for induction of plastid transgene expression by chemical induction of a nuclear encoded RNA Polymerase

Undesirable effects of constitutive transgene expression can occur if gene products are harmful to the transformed plant. Male sterility and growth inhibition have been observed in plastid transformants containing the *phb* operon encoding the genes required for the production of the polyester polyhydroxybutyric acid (PHB). In order to induce PHB synthesis in tobacco in a well-timed manner, we have constructed an inducible system to regulate transcription of the *phb* operon in plastids. This system consists of a nuclear located, ethanol inducible T7RNA polymerase which is targeted to plastids harbouring the *phb* operon under control of T7 regulatory elements.

Following treatment with ethanol, moderate induction of PHB synthesis was found. PHB amounts reached up to 1383 ppm in dry weight and an overall background activity of 171 ppm was measured in non-induced tissues.

Without ethanol application the plants developed flowers and fertile seeds. Thus, the main problem of inhibitory transgene expression was solved. Our results show that this inducible system could serve as an alternative to constitutive expression of transgenes in chloroplasts.

Maghuly, Fatemeh; Borroto, Fernandez Eduvigis G.; Leopold, Stephan; Pedryc, Andrzej^{*}; Katinger, Hermann and Laimer, Margit

Institute of Applied Microbiology, BOKU, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

* St. Istvan University, H-1118 Budapest, Hungary.

E-mail: Fatemeh.maghuly@boku.ac.at

Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot cultivars

A collection of 133 apricot cultivars and three related species originating from different geographical regions were studied with 10 polymorphic microsatellite markers developed in apricot. Altogether, 133 alleles were identified in the set of accessions with an average of 13.30 alleles per locus. Out of them, 32 alleles occurred only once in the investigated samples, especially in apricots originating from different eco-geographic groups or in different species. The observed heterozygosity for individual loci ranged from 0.8636 to 0.3182 with an average of 0.6281. A UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance grouped the accessions according to their eco-geographical origin and/or their pedigree information. Central-Asian cultivars have a distinct position on the dendrogram, which supports the assumption that most cultivars have an Asian ancestor. Most East European cultivars analysed cluster together and data even revealed a few synonyms. Results show that American cultivars have not only European germplasm in their pedigree, but they have also been enriched with germplasm of Asian origin. The implications of these data for the use of SSR markers as a tool for fingerprinting cultivars in breeders rights protection and apricot breeding are discussed. In this paper, we demonstrate for the first time the variability of apricot SSRs in a large collection of apricot cultivars and closely related species (Maghuly et al. 2005).

Maghuly F., Borroto Fernandez E., Ruthner S., Bisztray G., Pedryc A. and Laimer M. 2005. Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographical origin and breeding history. *Tree Genetics and Genome*. 1: 151 -165.

Marzban, Gorji; Herndl, Anita; Stoyanova, Elitza; Hoffmann-Sommergruber, Karin (*); Breiteneder, Heimo (*); Martinelli, Alessio (); Zaccharini, Marzio (**); Asero, Riccardo (**); Kolarich, Daniel (****); Altmann, Fritz (****); Katinger, Hermann and Laimer, Margit**

Institute of Applied Microbiology, BOKU, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

* Dept. of Pathophysiology, AKH, Vienna, Austria

** Consorzio Italiano Vivasti (CIV), Ferrara, Italy

** Ambulatorio di Allergologia, Clinica San Carlo, Dugnano, Italy

E-mail: margit.laimer@boku.ac.at

Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits and tissues

The importance of apple allergens, in particular Mal d 1, a Bet v1 homologue for the pollen-fruit syndrome in Northern European countries and Mal d 3 responsible for true fruit allergies in Southern European countries, has been repeatedly emphasised by researchers during the past two decades [1,2]. However, little is known about the distribution pattern of the major allergens in the apple fruit and among different cultivars. The aim of this study was to investigate the spatial expression of the major allergens in apple (pulp and peel), and their allergenicity for differently sensitised patients across Europe as well as evaluation of variations in allergen expression of selected cultivars [3]. Next to Mal d1 at least two further proteins are involved in the birch-apple syndrome: Mal d 2, a 31 kD thaumatin-like protein with anti-fungal activity, and Mal d 4, a 14 kD proline-binding protein, well known as the pan-allergen profilin [4]. In Mediterranean countries, where basically no birch or other Fagales trees are growing, allergic reactions to fruits are frequently not related to birch pollinosis and are predominantly evoked by non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs). The Mal d 3 - a 9 kD nsLTP in apple - seems to correlate with the appearance of 'true' food allergies in Southern European countries, since it is cross-reactive with homologous proteins in pear, peach and apricots. In order to evaluate the individual expression levels of the four apple allergens known so far, relevant screening assays were a prerequisite. In the framework of our studies a number of methods for allergen detection ranging from rapid antibody-based Immuno-Tissue Prints, ELISA, Northern blots were developed for conclusive characterisation of allergen proteins within single fruit and among cultivars [3].

References

- [1] van't Veer, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ (2000) Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr.* 3:103-107.
- [2] Hsieh L-S, Moos Jr. M, Lin Y (1995) Characterization of apple 18 and 31 kD allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 96:960-970.
- [3] Marzban Pühringer H, R. Dey, S. Brynda, Martinelli A, Zaccarini M, Kolarich D, Altmann F, Katinger H and Laimer M. 2005. Localisation and distribution of major apple allergens in fruit tissue. *Plant Science*, 169 (2005) 387–394.

Milcevicova, Renata¹; Berenyi, Maria¹; Fischer, T².; Hanke, Viola³; Halbwirth, Heidrun⁴; Stich, K⁴.; Wilhelm, Eva¹

¹ARC Seibersdorf Research GmbH, Biogenetics & Natural Resources, Biotechnology, A-2444 Seibersdorf, Österreich

²TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Fachgebiet Obstbau, Alte Akademie 16, D-85350 Freising-Weihenstephan, Deutschland

³BAZ, Institut für Obstzüchtung, Pillnitzer Platz 3a, D-01326 Dresden-Pillnitz, Deutschland

⁴TU Wien, Fakultät für Techn. Chemie, Getreidemarkt 9, A-1060 Wien, Österreich
renata.milcevicova@arcs.ac.at

Molekulare und biochemische Untersuchungen der Toleranzmechanismen von Apfel (*Malus spp.*) gegen Feuerbrand (*Erwinia Amylovora*)

Feuerbrand wird durch das Bakterium *E. amylovora* hervorgerufen und führt zu schweren Erkrankungen bei Pflanzen aus der Familie der Rosaceae. Molekulare und biochemische Untersuchungen sollen zur Aufklärung der Resistenzmechanismen von Apfel (*Malus spp.*) beitragen. Der Phenylpropanoidstoffwechsel ist in die Abwehrmechanismen von vielen Pflanzenkrankheiten (z.B. Schorf) involviert. Es konnte gezeigt werden, daß Isoflavonoide wichtige Phytoalexine von Apfel sind und daher diesen eine Rolle in der Resistenz zukommt (Burse et al. 2004).

Feuerbrandinfektionsversuche wurden sowohl an in vitro Apfelsprossen als auch in der Quarantänekabine der AGES mit veredelten Pflanzen der anfälligen Kulturapfelsorte (*M. domestica* cv. Idared) der moderat resistenten Kulturapfelsorte (*M. domestica* cv. Rebella) sowie der resistenten Wildapfelart *Malus robusta* durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Pflanzen mit Nährmedium (King B) behandelt. Die Expressionsmuster der Gene für Flavonolsynthase (FLS), Chalconsynthetase (CHS), Chalconisomerase (CHI), Dihydroflavonolreductase (DFR) sowie Phenylalaninammonia-lyase (PAL), wurden von Idared mit *Malus robusta* im zeitlichen Verlauf (6, 24, 48, 72 Std. nach Inokulation) verglichen. Die Analysen wurden mittels quantitativer, real time RT-PCR durchgeführt. Parallel zu den molekularen Untersuchungen wurden auch die Enzymaktivitäten bestimmt.

Olmo, Christian; Matusikova, Ildiko; Trauber, Stefanie; Strierschneider, Michael; Fluch, Silvia

ARC Seibersdorf research GmbH, A2444 Seibersdorf, Austria, Biogenetics/Natural resources, Bioresources, PICME.

Christian.Olmo@arcs.ac.at

Gene expression analysis in poplar plants (*Populus nigra*) exposed to wind stress

Abiotic stresses is caused by different abiotic factors associated with climatic conditions including drought, salinity and wind. Although plant responses to these forms of environmental stress are interconnected, signals and subsequent pathways under each condition have not yet been studied in detail. The aim of this work is to elucidate the molecular events associated with response to wind treatment in poplar (*Populus nigra*) leaves.

High-density cDNA microarrays holding a unigene set of poplar ESTs were used to search for genes differentially expressed during exposure to wind. Leaves of three different developmental stages were collected from plants cultured either under windy or static (control) conditions, and subsequently used in hybridizations as targets. Gene expression profiles for each leaf stage were compared with respect to growth conditions. Our results show that wind treatment triggers in plants expression of different kinases, membrane-associated proteins, other stress related genes (e.g. aquaporin, peroxidase) as well as genes involved in phenylpropanoid and lignin biosynthesis pathways. Most (~230) of these genes were up- or down regulated in older leaves. In contrast, only a part of them (~10) were activated in very young leaves. These results can contribute to general understanding of mechanisms of defence responses in plants.

Weyen¹, Jens; Preis¹, Elena; Orsini¹, José; Falk², Jon; Römer², Susanne; Krupinska², Karin

¹ Saaten-Union Resistenzlabor GmbH, Hovedisser Strasse 92, 33818 Leopoldshöhe

² Botan. Institut, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel

Spezifische Produktion von Tocotrienolen in transgenen Gerstenpflanzen (*H. vulgare* L., cv. Golden Promise)

Tocotrienole gehören zur Gruppe der Vitamin E-Verbindungen, die sich analog zu den Tocopherolen durch eine antioxidative Wirkung auszeichnen. Im Unterschied zu den Tocopherolen haben sie zudem eine hemmende Wirkung auf die Cholesterin-Synthese und das Wachstum von Tumorzellen (Therault *et al.*, 1999). Tocotrienole könnten daher für die Prävention und Behandlung von Arteriosklerose und Krebs eingesetzt werden. Zur Zeit sind Tocotrienole allerdings nur im Gemisch mit Tocopherolen in Nahrungsergänzungsmitteln enthalten und im Hinblick auf medizinische Indikationen nur bedingt geeignet.

In einem von der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR) geförderten Verbundprojekt „Gewinnung von medizinisch wirksamen Tocotrienolen aus relevanten Pflanzen“ werden potentiell zur Tocotrienolgewinnung geeignete Pflanzen untersucht (Falk & Krupinska 2005). Von Interesse sind insbesondere Pflanzen mit einem hohen Tocotrienolgehalt und/oder einem spezifischen Tocopherol-Tocotrienol-Muster, die in mitteleuropäischen gemäßigten Klimaten kultivierbar sind. Im Rahmen dieses Projekts wurde die Gerste als eine potentiell interessante Pflanze identifiziert.

Mit den hier vorgestellten insgesamt drei gentechnischen Ansätzen sollen Gerstenpflanzen entwickelt werden, die in den Körnern einen hohen Tocotrienolgehalt aus vorzugsweise nur alpha- oder gamma- Tocotrienol aufweisen. Im ersten Ansatz soll durch konstitutive Expression des Gens für der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, eines Schlüsselenzyms der Vitamin E-Biosynthese, wie bereits bei Tabakpflanzen der Vitamin E-Gehalt deutlich erhöht werden (Falk *et al.* 2003). Da in Gerstenkörnern neben α -Tocotrienol auch β -Tocotrienol in größeren Mengen zu finden ist, soll in einem zweiten Ansatz durch eine endospermspezifische Expression des Gens für die β -Tocopherolmethyltransferase (β TMT), die die Umwandlung von β -Tocotrienol in α -Tocotrienol katalysiert, eine verstärkte α -Tocotrienolakkumulation erreicht werden. Im dritten Ansatz soll zur Erzeugung von Pflanzen mit vorwiegend β -Tocotrienol diese Reaktion mittels „anti-sense“-Technologie unterdrückt werden. Es werden erste Ergebnisse der mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens* erfolgreich durchgeführten Transformationen der Gerste (*H. vulgare* L., cv. Golden Promise) vorgestellt.

Literatur: Falk, J. and K. Krupinska (2005) Gewinnung von medizinisch wirksamen Tocotrienolen. Schriftenreihe “Nachwachsende Rohstoffe” 27:298-304.

Peil, A.¹; Flachowsky, H.¹; Garcia, T.²; Richter, K.³; Trognitz, B.² und Hanke, V.¹

^{1,3} Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, ¹Institut für Obstzüchtung, Pillnitzer Platz 3a, D-01326 Dresden, ³ Institut für Epidemiologie und Resistenz-ressourcen, Theodor-Roemer-Weg 4, D-06449 Aschersleben

² ARC Seibersdorf research GmbH, A-2444 Seibersdorf
a.peil@bafz.de

Kartierung der Feuerbrandresistenz in *Malus* und weitere Analysen zum Feuerbrand

Im Jahr 2004 wurde eine Kreuzung zwischen der feuerbrand-anfälligen Sorte 'Idared' und der feuerbrand-resistenten Wildartabstammung *Malus robusta* 5 durchgeführt. Insgesamt wurden von der resultierenden Kreuzungsnachkommenschaft 150 Sämlinge ausgewählt. Von jedem dieser Sämlinge wurden bis zu 12 Klone auf Unterlagen veredelt. Im Anschluss an eine künstliche Inokulation mit *Erwinia amylovora* im Gewächshaus wurde der Befall als Anteil Nekrose am Gesamtrieb bestimmt. Ein hoher Anteil der Nachkommen (ca. 23 %) konnte von den Feuerbrandbakterien nicht infiziert werden. Die anderen Klassen von resistent bis hochgradig anfällig waren gleichmäßig auf den Rest der Nachkommen verteilt.

Für eine erste Kartierung wurden aus bestehenden Karten 78 Mikrosatelliten ausgewählt, welche die 17 Kopplungsgruppen abdecken sollten. Diese 78 Mikrosatelliten wurden an vier bis sechs Nachkommen getestet. Bei 62 Mikrosatelliten konnten Polymorphismen detektiert werden. Mit Multiplex-PCR wurden die 62 Mikrosatelliten an der Population angewandt. Die 62 Mikrosatelliten lieferten insgesamt 67 auswertbare Loci. Mit dem Programm Joinmap 3.0 wurden bei einem LOD von 5.0 die Daten verrechnet. Es ergaben sich insgesamt 15 Kopplungsgruppen mit 2 bis 7 Markern pro Gruppe. Die Anordnung der Marker entspricht im wesentlichen der Verteilung in anderen veröffentlichten Gen-Karten des Apfels.

Mit dem Programm MapQTL 4.0 gelang es einen Bereich von Kopplungsgruppe 3 zu finden, der eine hohe Signifikanz für einen Zusammenhang zwischen Markern und Feuerbrand-Resistenz aufweist. Auf anderen Kopplungsgruppen wurden nur geringe Effekte beobachtet.

Langjährige Versuche zur Bestimmung des Resistenzverhaltens von Wildarten und die Segregation von Nachkommen aus Kreuzungen von resistenten Wildarten mit einer anfälligen Sorte wurden fortgeführt.

Ergänzend zu den Arbeiten zur Kartierung der Feuerbrandresistenz wurden verschiedene Kandidatengene der pflanzlichen Pathogenabwehr mittels Real Time PCR getestet. Dazu wurden Reiser von drei resistenten Apfelwildarten (*Malus robusta*, *Malus fusca* und *Malus baccata*) sowie einer anfälligen Sorte ('Idared') in der Klimakammer mit einer *Erwinia amylovora* Suspensionskultur infiziert. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurde die cDNA von Blättern unterhalb der Infektionsstelle auf die Transcription von ausgewählten Genen getestet. Die Ergebnisse dieses Tests wurden mit Transcriptionsmustern nicht-infizierter Kontrollen verglichen. Dabei konnten deutliche Unterschiede zwischen den resistenten Wildarten und der anfälligen Kontrollsorte detektiert werden. Es ist zu vermuten, dass es innerhalb der resistenten Wildarten verschiedene Systeme der Pathogenabwehr gibt.

Poletti, Susanna; Gruissem, Wilhelm and Sautter, Christof

Institute of Plant Sciences, ETH Zurich, Universitätsstr. 2, 8092 Zurich, Switzerland
Christof.sautter@ipw.biol.ethz.ch

Exploring possibilities of iron bio-fortification in rice by genetic engineering.

Although trace elements are always present in the environment, their uptake, transport, and storage are not well understood, however they are limiting for plant production and human health. Cereals, the most important staple crops, contain only little micronutrients in the seeds, where they are almost entirely localized in the aleurone layer and in the embryo, which are removed by polishing and consequently not accessible to human consumption. Moreover, the presence of anti-nutritional factors in the grain may inhibit uptake of trace elements.

We use gene technology to study uptake, transport, accumulation and availability of trace elements in sink organs. Uptake and availability of zinc and iron under standardized conditions is the focus of our current research. Several transgenic lines over-expressing genes involved in iron and zinc uptake, transport and storage in the plant are under functional analysis. Trace element contents in rice endosperm are under study by a variety of methodical approaches including ICP-MS.

In parallel the project studies lateral root development in rice. A large soil volume covered by the root system might improve uptake of non-soluble trace-elements from the soil.

Schlaich, Thomas; Urbaniak, Bartosz; Malgras, Nicole; Ehler, Elisabeth; Birrer, Christof; Meier, Lukas; Sautter, Christof

Institute of Plant Sciences, ETH Zurich, Universitaetsstr. 2, 8092 Zurich, Switzerland.

Christof.Sautter@ipw.biol.ethz.ch

Increased field resistance to *Tilletia caries* provided by a specific anti-fungal virus gene in genetically engineered wheat.

Field performance of a viral gene in two Swiss wheat (*Triticum aestivum*) varieties showed 10% increase in fungal resistance against *Tilletia caries* (stinking smut) under high infection pressure. To the best of our knowledge, this is the first report of improved resistance against any fungus in the field achieved by genetic engineering in wheat. The genetically modified wheat lines previously showed ca. 30% reduction in symptoms of *T. caries* in the greenhouse (Clausen et al. 2000), depending on the fungal strain inoculated. A greenhouse experiment run in parallel to the field test and using the same collection of *T. caries* confirmed these results. In a dose-response experiment with isolated fungal strains in which the infection pressure was varied *via* the spore concentration, the transgene behaved as quantitative resistance gene and shifted the S-shaped dose-response curve towards higher resistance. The transgene was shown to be highly specific for fungi of the order *Ustilaginales*. Tests of the transgene using cell cultures of eukaryotes, including hamster and human, showed no significant side effects with respect to biosafety. Endogenous pathogen-related genes were also activated upon fungal infection in the presence of the *kp4* transgene as shown by the Barley1 Affymetrix micro-array, confirmed by real time-PCR.

Schlaich et al. (2006) Plant Biotechnology Journal 4, 63-76.

Schmidt, Thomas¹; Ewald, Aloma²; Seyring, Martina²; Hohe, Annette²;

¹: University of Applied Sciences Giessen

Department of Hospital and Clinical Engineering, Environment and Biotechnology
Wiesenstrasse 14, 35390 Giessen

²: Institute of Vegetable and Ornamental Crops

Department of Plant Propagation

Kuehnhaeuser Strasse 101, 99189 Erfurt – Kuehnhausen

th.schmidt@erfurt.igzev.de; hohe@erfurt.igzev.de

Zygotic vs. Somatic Embryogenesis in *Cyclamen*: A Comparison of Cytological and Morphological Aspects

For *Cyclamen persicum* an in vitro propagation protocol based on somatic embryogenesis has been published in 1998 (Schwenkel und Winkelmann 1998). However this propagation system suffers from a high rate of developmental aberrations. In order to define these aberrations more detailed we compared morphology and mitotic activity both in zygotic and somatic pathways during the maturation and germination periods applying flowcytometry as an effective tool to measure mitotic cell division activities.

As a crucial point of this study we learned that both pathways differed in their duration as well as in certain visual features like size and shape. In addition, the mitotic activity of zygotic and somatic embryos varied particularly during the maturation phase. In combination with the results from germination assays we identified zygotic embryos belonging to the group of orthodox seeds because the mitotic activity clearly decreased during maturation. In contrast, somatic embryos exhibited no decline of their mitotic activity in which they resemble recalcitrant seeds as initially defined by Roberts (1973). Nevertheless, zygotic and somatic torpedo-shaped embryos displayed similar mitotic activities during the monitored germination time interval. Thus, we confirmed previous morphological classifications (Seyring and Hohe 2005) by the mitotic activity as additional morphological parameter. Results will be published in Plant Cell Reports (2006).

References:

Roberts EH (1973) Predicting the storage life of seeds. Seed Sci Technol 1:499-514;
Schwenkel HG, Winkelmann T (1998) Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis from Ovules of *Cyclamen persicum* MILL.. Plant Tiss. Cult. Biotechnol. 4:28-34;
Seyring M, Hohe A (2005) Induction of desiccation tolerance in somatic embryos of *Cyclamen persicum* MILL.. J Hort Sci Biotechnol 80:65-69;
Schmidt T, Ewald A, Seyring M, Hohe A (2006) Comparative analysis of cell cycle events in zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* indicates strong resemblance of somatic embryos to recalcitrant seeds. Plant Cell Rep (accepted)

Senula, Angelika; Keller E.R.J.

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)

Corrensstraße 3

06466 Gatersleben

E-Mail: senula@ipk-gatersleben.de; keller@ipk-gatersleben.de

Kryokonservierung von Minze – Entwicklung einer neuen Vitrifikationsmethode unter Einbeziehung kälteadaptierter Pflanzen

Die Kryokonservierung als eine Methode der Langzeitlagerung von genetischen Ressourcen hat in den letzten Jahren, insbesondere bei der Erhaltung vegetativer Pflanzenmuster in Genbanken, stark an Bedeutung zu genommen. Kryokonservierung ist am besten geeignet vegetative Muster über sehr lange Zeit ohne Veränderung und geschützt vor Infektionen zu erhalten. Vertreter der Gattung *Mentha* sind wichtige Heil- und Gewürzpflanzen und wegen ihrer Bastardherkunft als steriles Material nur in vegetativer Form zu erhalten. In-vitro-Erhaltung und Kryokonservierung sind geeignete alternative Methoden, die auch für Minze Anwendung finden. Im IPK ist im vergangenen Jahr mit der Kryokonservierung von Minze begonnen worden, wobei die Methode der Droplet-Vitrifikation angewandt wurde. Von drei verschiedenen Minzearten (*Mentha x piperita*, *M. x villosa* und *M. spicata*) wurden In-vitro-Kulturen unter verschiedenen Vorbedingungen (konstant 20-25°C, alternierend 25/15°C sowie und 25/-1°C Tag/Nacht, jeweils 16h Licht) angezogen. Von diesen Pflanzen wurden dann Sprossspitzen (1mm) entnommen und nach einer dehydrierenden Vorbehandlung kryokonserviert. Die Pflanzenregeneration nach dem Auftauen war bei den bei 25/-1°C kälteadaptierten Sprossspitzen signifikant höher als bei den anderen Methoden (69 % gegenüber 36% Regenerationsrate bei den beiden anderen Temperaturregimes).

Seyring, Martina; Hennig, Frank; Ewald, Aloma

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e. V.

Kühnhäuser Straße 101, D-99189 Erfurt – Kühnhausen.

E-mail: seyring@erfurt.igzev.de, hennig@erfurt.igzev.de, ewald@erfurt.igzev.de

Einfluß von *Piriformospora indica* auf die Weiterentwicklung mikrovermehrter Cyclamen-Hybriden

Piriformospora indica ist ein wurzelendophytischer Pilz mit pflanzenwachstums-fördernden Eigenschaften und führt bei Gerste zur Resistenz gegenüber Wurzel- und Blattpathogenen, einschließlich dem Pilz *Fusarium culmorum*. Der Pilz *Piriformospora indica* kann im Gegensatz zu arbuskulären Mycorrhiza – Pilzen auf Nährboden kultiviert werden.

Das Alpenveilchen (*Cyclamen persicum*) als wichtige Topfpflanze im europäischen Markt leidet besonders unter der Welkekrankheit, ausgelöst durch den Pilz *Fusarium oxysporum*, der ein großes Problem in der gärtnerischen Produktion darstellt. Es soll untersucht werden, ob sich die obengenannten Eigenschaften von *Piriformospora indica* auch bei Cyclamen nachweisen lassen.

In einem ersten Versuch wurde geprüft, wie sich über somatische Embryogenese vermehrte Pflanzen, die in vitro mit *Piriformospora indica* inokuliert wurden, nach der Überführung und Akklimatisierung unter Gewächshausbedingungen verhalten.

14 Tage nach der Inokulation wurden die Pflanzen in der 16. KW pikiert und akklimatisiert. Das Topfen erfolgte in der 21. KW. Bonitiert wurde auf die Blühfähigkeit der Pflanzen. Dabei stellte das Erreichen der ersten acht Blüten, als Merkmal einer verkaufsfähigen Pflanze, ein wesentliches Kriterium dar. In der 35. (KW) hatten bei den unbeimpften Kontrollpflanzen nur 7,7% die Verkaufsreife erreicht, während es bei den mit den Pilz inokulierten Pflanzen schon 31,3 % waren. Diese positive Tendenz setzte sich im weiteren Kulturverlauf fort und in der 44. KW war immer noch ein Unterschied von 30 % zu beobachten. Die inokulierten Pflanzen hatten bis auf eine Pflanze mindestens acht Blüten erreicht. Ein weiterer positiver Effekt war auf die Blütenanzahl zu verzeichnen. In der 50. KW hatten die inokulierten Pflanzen im Durchschnitt 90 und die Kontrollpflanzen 53 Blüten (bezogen auf blühende Pflanzen) ausgebildet. Die Blütengröße blieb unbeeinflusst, während die Blütenstiele verlängert waren. Sechs der getopften inokulierten Pflanzen zeigten im Kulturverlauf Krankheitssymptome, deren Ursache noch nicht geklärt werden konnte.

**Steniczka, Gertraud; Popowich, Elena; Hanzer, Veronika; Drumonde, Neves
João^{*}; da Câmara Machado, Artur^{*}; Katinger, Hermann, Laimer, Margit**

Institute of Applied Microbiology, BOKU, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

^{*}Center of Biotechnology of the Azores, Department of Agricultural Sciences,
University of the Azores, Terra Cha, Angra do Heroísmo, Terceira, Portugal

E-mail: margit.laimer@boku.ac.at

***Vaccinium cylindraceum*: biotechnological approaches to breeding and propagation**

V. cylindraceum is a neotropical species native to the islands of Azores. The large semi-evergreen, upright shrubs proved to be hardier than expected as ornamental garden plant, probably because they grow at higher, colder altitudes in an otherwise subtropical climate (Trehane 2004).

The morphogenetic potential of *V. cylindraceum* in micropropagation as well as in adventitious regeneration from leaf tissue was examined. *In vitro* cultures of four clones (VCY1, VCY 2, VCY4, and VCY9) were established from a seedling population collected on Terceira Island and grown in the greenhouse. Two media formulations and three combinations of growth regulators were tested for their ability to sustain good plant growth and multiplication. Woody Plant Medium (WPM; Lloyd and McCown 1980) gave significantly better results than Anderson's medium (Anderson 1980). Three out of four clones showed improved growth on WPM supplemented with 1mg/l zeatin and 0,2 mg/l IAA, while clone VCY9 did equally well on medium with either 2iP, 2iP riboside or zeatin.

VCY1 and VCY9 are the most active clones in respect to growth and multiplication, VCY4 on the other hand is the least vigorous. This situation is also reflected in our findings concerning adventitious regeneration from leaf tissue. While clone VCY9 showed the highest frequency of regeneration (97±3%) and excellent shoot growth on regeneration medium (WPM containing 4 mg/l zeatin and 0,5 mg/l IAA; Song and Sink 2004), clone VCY1 regenerated poorly, and no regeneration was observed from VCY2 and VCY 4 leaf explants. These differences are very likely connected to both genetic variations of plants in a seedling population as well as the epigenetic status of the respective mother plants (Popowich and Filipenya 1997). Due to its high regeneration potential and active growth clone VCY9 will be the clone of choice for future biotechnological approaches in plant breeding, e.g. transformation experiments.

Szakasits, Dagmar, Heinen, Petra, Kreil, David, Hofmann, Julia, Wieczorek, Krzysztof, Grundler, Florian and Bohlmann, Holger

Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, Peter Jordan-Straße 82, A-1190 Vienna, Austria

Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria

dagmar.szakasits@boku.ac.at, petra_heinen@web.de, david.kreil@boku.ac.at, Hofmann.Julia@boku.ac.at, krzysztof.wieczorek@boku.ac.at, florian.grundler@boku.ac.at, holger.bohlman@boku.ac.at

The transcriptome of syncytia induced by the cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots

The cyst nematode *Heterodera schachtii* is a biotrophic plant parasite which can cause significant economic losses on sugar beet but can also complete his life cycle on a variety of other plants including Arabidopsis. Larvae invade the roots of host plants and induce a syncytium on which the nematode feeds throughout his life.

The syncytium develops from a single cell inside the central cylinder through incorporation of neighbouring cells. How the induction and the development of the syncytium is achieved is still largely unknown. We have therefore started a project to study the transcriptome of syncytia induced by *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. Pure material from syncytia was obtained through microaspiration and used for RNA isolation. This RNA was amplified, labeled, and used for the hybridization of Affymetrix GeneChips. Our results show that a variety of genes is up- or down-regulated in syncytia. Results have been validated for selected genes by real time PCR and *in situ* RT-PCR. In addition, promoter::GUS lines are being prepared.

Closer inspection of the up-regulated genes revealed, that different pathways for genes that are normally specific for certain tissues other than roots, are induced in the syncytium. These genes are not only of scientific interest but may also be used as targets for applications to engineer nematode-resistant plants.

Sziderics, Astrid Heide; Fluch, Silvia; Trognitz, Friederike; Rasche, Frank;
Sessitsch, Angela; Wilhelm, Eva

ARC Seibersdorf research GmbH, Biogenetics and Natural Resources,
Biotechnology
A-2444, Austria
astrid.sziderics@arsc.ac.at, Eva.Wilhelm@arcs.ac.at

Assembly of a cDNA-microarray to Test Abiotic Stress in Pepper (*Capsicum annuum* L.) inoculated with Entophytes

The aim of our study is the assembly of a stress-array with homologous and heterologous cDNA probes. Literature research resulted in more than 1000 interesting drought stress related genes in various species. Corresponding ESTs available in the PICME-clone depository (www.picme.at) were selected by BLAST alignment. Clones of differentially expressed genes of pepper isolated by cDNA-SSH serve as control. The stress-array will be evaluated with a stress-tolerant (Ziegenhorn Bello) and a stress-sensitive (Milder Spiral) pepper variety. To correlate gene expressions with the physiological status of the plants, selected stress genes (real time-PCR) and proline content, peroxidase activity and osmotic potential were measured. In addition the effect of several endophytic bacteria on these two pepper varieties were tested. Preliminary tests revealed two strains of growth promoting bacteria, which will be further investigated.

Thieme¹, R.; Schubert², J.; Nachtigall², M.; Heimbach³, U. & Thieme⁴, T.

¹BAZ, Institut für landwirtschaftliche Kulturen, Rudolf-Schick-Platz 3a, D-18190 Gross Lüsewitz, r.thieme@bafz.de

²Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik, Theodor-Roemer-Weg 4, D-06449 Aschersleben, j.schubert@bafz.de; m.nachtigall@bafz.de

³BBA, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11-12, D-38104 Braunschweig, u.heimbach@bba.de

⁴BTL Bio-Test Labor Sagerheide, Birkenallee 19, D-18184 Sagerheide, tt@biotestlab.de

Virus- und Krautfäuleresistenz bei Nachkommen der Wildart *Solanum tarnii*

Weltweit verursacht der Befall mit Aphiden, Virose und der Kraut- und Braunfäule große Probleme im Kartoffelanbau aufgrund des ubiquitären Auftretens und der Anpassungsfähigkeit der Schaderreger und Pathogene. Die Einführung von 'exotischem' Keimplasma aus Wildarten mit noch nicht genutzten Resistenzquellen durch biotechnologische Methoden bietet die Möglichkeit zur Erweiterung der genetischen Diversität in der Kartoffelzüchtung. Die in Mexiko vorkommende, diploide, knollenbildende Wildart *Solanum tarnii* Hawkes et Hjerting (Akzession GLKS 96.203.1; Genbank IPK Gatersleben Groß Lüsewitz) verfügt nach eigenen Untersuchungen über Kartoffelvirus Y- (PVY-) und Krautfäule-Resistenz und ist damit für die Kartoffelzüchtung besonders interessant. Zur Überwindung der Kreuzungsbarrieren wurden durch Zellfusion Hybriden zwischen *Solanum tarnii* und der Sorte 'Delikat' erzeugt. Im Einzelblatt-Test zeigten diese somatischen Hybriden eine hohe Krautfäule-Resistenz auf dem Niveau des Wildelterns. Bei zehn selektierten Hybriden wurde nach Prüfung mit sechs Isolaten aller bekannten PVY-Stämme sowie in Pfropfungsversuchen und im Feld PVY-Resistenz festgestellt. Wüchsige krankheitsresistente Hybridpflanzen wurden mit der Kulturform gekreuzt. Bei 36 BC₁-Klonen von zwei Hybridherkünften konnte PVY-Resistenz nachgewiesen werden. Von 139 BC₁-Klonen zeigten drei Klone hohe und acht mittlere Krautfäule-Resistenz. In einer zweijährigen Feldstudie waren Knollenanzahl, -gewicht und -merkmale vergleichbar zu den Kontrollsorten. Die somatischen Hybriden und die meisten der BC-Klone wurden der mittelspäten bis späten (Standardsorte 'Sonate'), sechs Klone der frühen (Standardsorte 'Delikat'), und zehn Klone der sehr späten Reifegruppe zugeordnet. Die Klone variierten im Ertrag, wiesen aber nur geringe Unterschiede in den Knolleneigenschaften auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass PVY- und Krautfäule-Resistenz von der Wildkartoffelart *S. tarnii* durch somatische Hybridisierung und weitere sexuelle Kreuzungen auf die Kulturkartoffel übertragen werden können. Somit trägt die Nutzung biotechnologischer Verfahren zur Erweiterung der genetischen Basis von Resistenzen gegen Krankheiten und Schaderreger für die Kartoffelzüchtung bei.

Tran; D. Duong¹; Friedrich, Andrea¹; Barth, Stefan²; Schnabl, Heide¹; Boehm, Robert¹

¹Universität Bonn, Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Karlrobert Kreiten-Str. 13, D-53115 Bonn

²Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Abt. Pharmazeutische Produktentwicklung, Forckenbeckstrasse 6, D-52074 Aachen
tdduong01@yahoo.com

Expression of the VP2 gene encoding vaccine against Infectious Bursal Disease virus in *Wolffia australiana*

Transgenic plants represent a safe, effective and inexpensive way to produce vaccines. Infectious bursal disease (IBD), also known as Gumboro disease, is an acute contagious viral disease of young chickens that is of major importance for the poultry industry. The IBD virus (IBDV) causes a severe immunosuppression by destroying B-lymphoid cells present in the bursa of Fabricius followed by bursal atrophy. The immunosuppression leads to an increased susceptibility to other pathogens and reduces the growth rate of surviving animals. VP2 protein is the major host-protective immunogenic of infectious bursal disease virus (IBDV) of chickens. In this study, the VP2 gene was cloned and ligated into pPAM expression vector and then was transferred in two different *Agrobacterium tumefaciens* strains: C58 and GV3101. These are used to transform the duckweed species *Wolffia australiana* to establish transgenic lines as production tool for the vaccine. First results are presented.

Ewald, Dietrich; Ulrich, Kristina

Bundesanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Eberswalder Chaussee 3a, D-15377 Waldsiedersdorf
ewald@holz.uni-hamburg.de, k.ulrich@holz.uni-hamburg.de

Untersuchung der Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers von zur Transformation benutzten Agrobakterien auf endophytische Bakterien in transgenen Pappeln

In der Pappel konnten endophytische Bakterien nicht nur in natürlich wachsenden Pflanzen sondern auch in *in vitro*-Vermehrungssystemen nachgewiesen werden. Da darüber hinaus die rekombinanten Agrobakterien in der transformierten Pappel über lange Zeit persistieren können, besteht die Möglichkeit einer Übertragung der binären Vektoren auf die endophytischen Bakterien. Um einen möglichen Gentransfer abzuschätzen, werden zunächst die in der Pappel vorkommenden Bakterientaxa analysiert. Ausgewählte Isolate der verschiedenen Gruppen werden auf ihre Fähigkeit als Rezipienten beim konjugativen Transfer eines binären Plasmids (Modellsystem) getestet. In einem weiteren Schritt wird zu unterschiedlichen Zeiten nach der Transformation geprüft, ob der horizontale Gentransfer von den rekombinanten Agrobakterien auf endophytische Bakterien direkt in den transgenen Pappeln (transformiert mit einem gus-Reportergen) erfolgt.

Erste Ergebnisse zeigten eine starke Diversität der endophytischen Bakterien im Sproß und in den Blättern von Freiland-Pappelklonen. Hierbei konnten über die 16S rDNA-Analyse der Isolate eine Vielzahl von Gattungen der Aktinomyceten, Proteobakterien und Bacilli nachgewiesen werden. Verschiedene Pappelklone zeigten deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Endophyten-gemeinschaft. Die Populationsdichte der kultivierbaren endophytischen Bakterien lag im holzigen Gewebe bei $10^3 - 10^4$ und in Blättern $10^5 - 10^6$ cfu/g. Im Gegensatz zur hohen Diversität in den Freiland-Pappelklonen wurden in den *in vitro*- Vermehrungssystemen nur Isolate der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* gefunden. Beide Gattungen gehören zu den typischen Endophyten und scheinen sich in den *in vitro*-Kulturen zu einem hohen Titer anzureichern.

Varshney, Alok; Czauderna, Tobias; Meysing, Maren; Hensel, Götz; Knüpffer, Susanne; Bollmann, Carola; Seiffert, Udo and Kumlehn, Jochen

Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research Gatersleben (IPK)
Plant Reproductive Biology and Pattern Recognition Groups
Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben, Germany
varshney@ipk-gatersleben.de

Digital image analysis of reporter gene expression in wheat suspension culture following *Agrobacterium*-mediated transformation

Genetic transformation is instrumental to functional gene analysis and crop improvement. Cereals which represent the most important crop plants worldwide are considered recalcitrant in gene transfer. Development and optimization of transformation technology is thus highly desirable. The establishment of useful transformation systems requires quantification of transgene expression in cell cultures. Here, we present a technique based upon digital image analysis which allows for rapid assessment of the transformation success obtained by culture conditions to be compared. To this end, the software AREA has been developed. AREA processes images of cell cultures showing reporter gene expression. It quantifies the surface areas of reporter gene-expressing and non-expressing tissue followed by the calculation of the percentage of transgenic tissue. As a model system for wheat transformation, a more than 10 years-old suspension culture was used which can be provided in large amounts with fairly reproducible quality. Several co-culture parameters (e.g. pH, concentrations of mineral elements, carbohydrates, glutamine, acetosyringone, AgNO₃) were varied and the resultant transformation efficiencies scored in order to optimize the interaction of plant cells and agrobacteria. Owing to its reliability and efficiency, the method can be employed to develop powerful transformation methods for cereals and other crops.

Khidr, Yehia; Wallbraun, Michael; Wetzel, Thierry; Krczal, Gabi; Reustle, Götz

RLP AgroScience, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße

Michael.Wallbraun@agrosience.rlp.de

***Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Zucchini zur Induktion von Virusresistenz**

Virusbefall verursacht beim Zucchini-Anbau weltweit großen wirtschaftlichen Schaden. Früchte von virusinfizierten Pflanzen weisen mosaikähnliche Verfärbungen und schwerwiegende Deformationen auf, Pflanzen sind gestaucht und Blätter deformiert. Der wirtschaftliche Verlust ist mit mehr als 50% Ernteausschlag schwerwiegend. Vier verschiedene Viren sind weltweit für den Befall von Zucchini und anderen Cucurbitaceen verantwortlich: Zucchini Yellow Mosaik Virus (ZYMV), Watermelon Mosaic Virus-2 (WMV-2), Cucumber Mosaic Virus (CMV) und Papaya Ringspot Virus (PRSV). Wie in den meisten Zucchini Anbaugebieten weltweit dominiert auch in der Pfalz WMV-2 mit über 80% der Virus befallenen Pflanzen. Die konventionelle Züchtung konnte zwar bereits virustolerante Sorten hervorbringen, diese können jedoch Mischinfektionen oder einem Befall eines aggressiven Stammes auf dem Felde nicht standhalten.

Ziel dieses Projektes ist die Erzeugung von virusresistentem Zuchinimaterial auf gentechnischem Wege. Die Resistenzstrategie basiert auf dem Phänomen des posttranskriptionellen Gene Silencing (PTGS). Jeweils 150 bp Fragmente aus den Coat-Proteinregionen von WMV-2 und ZYMV wurden als „inverted repeat“ unter Kontrolle des 35S Promotors kloniert. Als Ausgangsmaterial für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation diente embryogener Kallus. Um eine nachträgliche Eliminierung des Selektionsmarkers zu ermöglichen, wurde das ‚inverted repeat‘-Konstrukt zusammen mit einem mGFP5ER-Konstrukt cotransformiert, welches den Selektionmarker nptII enthält. Transgene GFP-positive Kalli konnten bereits selektiert werden. Nach Keimung dieser embryogenen Kalli sollen die Pflanzen auf Vorhandensein des ‚inverted repeat‘-Konstruktes getestet und anschließend unter Gewächshausbedingungen auf Virusresistenz untersucht werden.

Wawrosch, Christoph; Ruprecht, Doris; Fruhmann, Thomas; Kopp, Brigitte

Department für Pharmakognosie, Universität Wien, Althanstr. 14, A-1090 Wien,
Österreich

christoph.wawrosch@univie.ac.at, brigitte.kopp@univie.ac.at

Mikrovermehrung von *Hypericum perforatum* in einem Temporärimmersions-System

Das Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L., Clusiaceae) ist aufgrund seiner antidepressiven Wirkung in zahlreichen Phytotherapeutika zur Behandlung leichter und mittelschwerer Depressionen sowie nervöser Unruhe enthalten. Diese Präparate werden dabei im Vergleich zu chemischen Therapeutika besser vertragen und zeigen geringere Nebenwirkungen (Woelk, 2000). Ein Teil der Arzneidroge stammt derzeit aus Wildsammlung in Europa und dem westlichen Asien. Aufgrund der steigenden Nachfrage kommt dem kontrollierten Anbau von Johanniskraut zunehmend Bedeutung zu, wobei einer der Vorteile auch in einer besseren Standardisierung und Qualitätskontrolle liegt. Bei der Züchtung als auch der genetisch homogenen Vermehrung entsprechender krankheitsresistenter, wirkstoffreicher Sorten kann die Pflanzenbiotechnologie vorteilhaft eingesetzt werden (Zobayed und Saxena, 2004).

Mit dem Ziel einer effizienteren in vitro-Vermehrung wurde ein Klon von *H. perforatum* in einem Temporärimmersions-System (TIS) unter wechselnden Bedingungen kultiviert. Im Vergleich zur Kontrolle auf Agar-Medium konnte die Vermehrungsrate deutlich gesteigert werden. Daneben sprechen auch weitere Faktoren wie billigeres Nährmedium und wesentlich reduzierter Arbeitsaufwand für den Einsatz von TIS zur effizienten Mikrovermehrung von Johanniskraut.

Literatur:

Woelk H. (2000) Comparison of St. John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. Br. Med. J. 321: 636-539.

Zobayed S., Saxena P.K. (2004) Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximising biomass and secondary metabolites. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 40: 108-114.

Wieczorek, Krzysztof¹, Golecki, Bettina², Gerdes, Lars², Heinen, Petra¹, Szakasits, Dagmar¹, Durachko, Daniel³, Cosgrove, Daniel³, Kreil, David⁴, Puzio, Piotr², Bohlmann, Holger¹, Grundler, Florian¹

¹ Institute of Plant Protection, Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

² Institut für Phytopathologie, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Germany

³ Department of Biology, 208 Mueller Lab, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, 16870 USA

⁴ Chair of Bioinformatics, Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

Krzysztof Wieczorek: krzysztof.wieczorek@boku.ac.at

Expanding walls. Expression of expansins in nematode-induced syncytia

Root parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii* is characterised by the formation of syncytial feeding structures in the root of host plants. Syncytia are formed by the fusion of root cells and their formation is accompanied by local cell wall degradation, fusion of protoplasts and hypertrophy. Expansins are wall-loosening proteins involved in growth and cell wall disassembly. In this study we tested the hypothesis that during syncytium formation specific expression of expansin genes takes place in roots of *Arabidopsis thaliana*. Using PCR we screened a specific cDNA library of 5-7-day-old syncytia for expansins. *AtEXPA1*, *AtEXPA3*, *AtEXPA4*, *AtEXPA6*, *AtEXPA8*, *AtEXPA10*, *AtEXPA15*, *AtEXPA16*, *AtEXPA20*, and *AtEXPB3* were detected in the library. Semi-quantitative and quantitative analyses comparing root sections with and without syncytia revealed that only *AtEXPA3*, *AtEXPA6*, *AtEXPA8*, *AtEXPA10*, and *AtEXPA16* are up-regulated specifically in infected root tissue. For some lines these results were confirmed with the aid of promoter::GUS plants. On the histological level, *in situ* RT-PCR confirmed that expression of these genes is restricted to syncytia.

On the base of our experiments we found our hypothesis approved and will further study the function of the single proteins.