

Abschlussbericht für das Forschungsprojekt

Produktion von Polyhydroxyfettsäuren in Nutzpflanzen

Phase II

Antragszeitraum 1.1.2000 - 30.6.2004

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Prof. Dr. Christian Jung

Institut für Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

Prof. Dr. Alexander Steinbüchel

Botanisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop

MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm/Potsdam

Prof. Dr. Lothar Willmitzer

PLANTA Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH, Einbeck gemeinsam mit der Südzucker AG

Dr. Hinrich Harling

1. Laufzeit des Projektes

Das Projekt war in zwei Phasen unterteilt. Die erste Phase lief vom 1.10.1996 bis zum 31.12.1999. Die zweite Phase lief vom 1.1.2000 bis zum 31.12.2002. Für den Projektteil Kiel wurde Ende 2002 eine Verlängerung um weitere 12 Monate bewilligt. Da der Aufstockungsbescheid jedoch erst am 19.5.03 in Kiel eintraf, mussten die Arbeiten für mehrere Monate unterbrochen werden. Inzwischen hatte der wissenschaftliche Sachbearbeiter Dr. Menzel das Institut verlassen. Die Stelle wurde am 15.6.03 mit Dr. Y. Tian besetzt, die zum 31.12.03 bedingt durch eine Schwangerschaft aus dem Dienst ausschied. Die restlichen Personalmittel wurden daher zur Bezahlung einer technischen Assistentin umgewidmet. Diese Stelle lief am 30.6.04 aus. An diesem Tag endete somit auch das gesamte Projekt.

Die Teilprojekte Münster, Einbeck und München endeten offiziell am 31.12.2002. In München wurden jedoch über diesen Zeitpunkt hinaus noch transgene Pflanzen erzeugt, die später an den Projektpartner Kiel zwecks PHB-Analytik geschickt wurden. Diese Versuche sind in diesem Bericht beschrieben. Das Teilprojekt Einbeck wurde bis 31.12.2003 bei Eigenfinanzierung durch PLANTA verlängert. Das Teilprojekt Golm wurde kostenneutral bis zum 31.12.2003 verlängert und endete zu diesem Zeitpunkt.

Die Ergebnisse dieser Teilprojekte der Projektphase II wurden detailliert in den Zwischenberichten und Abschlußberichten dargelegt. Daher wird hier auf eine ausführliche Darstellung verzichtet.

Im folgenden werden die aktuellen Ergebnisse der Teilprojekte Kiel, Einbeck und München für den Zeitraum 1.7.03-30.6.04 dargestellt. Anschließend erfolgt eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Projekts und eine abschließende Bewertung.

2. Teilprojekt Kiel: Erzeugung und Charakterisierung PHB-speichernder Pflanzen

Berichtszeitraum: 01.07.2003- 30.06.2004

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Prof. Dr. C. Jung, Dr. G. Menzel, Dr. H.-J. Harloff

2.1. Erzeugung transgener PHB-speichernder Pflanzen

2.1.1. *In planta* Transformation von *Arabidopsis*

Aus den Transformationen von *Arabidopsis* mit dem samenspezifischen Konstrukt pBI/USP-ABC nach der „floral dip“ Methode konnten 601 Kanamycin-resistente T1-Pflanzen selektiert und auf Erde ausgepflanzt werden. Davon bildeten 475 Pflanzen genügend Samenansatz für eine PHB-Analyse, 26 Pflanzen konnten aus einer zu geringen Samenernte nachgebaut werden. Die Ergebnisse sind unter 2.2.3 zusammengefasst.

2.1.2. Transformation von Raps

Aus 4 Transformationsansätzen mit dem samenspezifischen Konstrukt pBI/USP-ABC konnten insgesamt 115 *in vitro* bewurzelte Pflanzen auf Erde ausgepflanzt werden. Davon setzten bislang 66 Pflanzen ausreichend Samen für die PHB-Analyse an, 30 Pflanzen stehen noch im Gewächshaus, 33 Pflanzen befinden sich im Nachbau (T1), von insgesamt 12 Pflanzen aus einer Transformation mit Vektorkontrolle wurden 7 analysiert, von 14 nachgebauten Kontrollpflanzen 3. Vier Pflanzen bildeten normale Schoten aus, jedoch

enthielten diese keine Samen. Es ist unbekannt, ob dies eine Folge der Aktivität der PHB-Gene war. Die Ergebnisse sind unter 2.2.4 zusammengefasst.

2.2. PHB-Analytik

2.2.1. Transgene Rüben aus Einbeck

Aufgrund der Erkenntnis, dass der knollenspezifische Patatinpromoter aus Kartoffel sinkspezifisch im Rübenkörper aktiv ist, wurden in Einbeck entsprechende Transformationen mit dem Konstrukt pBI/B33-ABC der Arbeitsgruppe von Prof. Willmitzer aus Golm durchgeführt. Aus insgesamt 74 Transformanten konnten 49 Gewächshauspflanzen erhalten werden. Von diesen Pflanzen wurden uns Rübenkörper aus 2 Ernteterminen, sowie entsprechende Kontrollen zur PHB-Analyse zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sind in Tab.1a zusammengefasst. Die Werte der Kontrollen der ersten Meßreihe (Ernte1) sind aufgrund von meßtechnischen Problemen (Säulenalter) etwas erhöht. Signifikant gesteigerte PHB-Mengen wurden in den 4 Genotypen PH22-20, PH22-30, PH22-44 und PH22-53 gefunden, allerdings in so geringen Konzentrationen, dass sie eine weitere züchterische Bearbeitung nicht sinnvoll erscheinen lassen. Die Vorextraktion mit kaltem Methanol deutete zudem auf das Vorliegen von überwiegend Monomeren hin (vgl. dagegen polymere Positivkontrolle in der letzten Zeile). Zusätzliche Extraktionsversuche bestätigen diesen Befund (Tabelle 1.b): die geringsten Werte werden in Rückständen von Proben gefunden, die mit kaltem Chloroform in Gegenwart von 1M Essigsäure extrahiert wurden, dabei scheint in PH22-53 eine besonders stark matrixgebundene Form mit einem Anteil von ca. 40% vorzuliegen.

Für weiterführende Analysen wurden aus Einbeck sterile Sprosskulturen von PH22-30 und PH22-53 zur Verfügung gestellt, in denen der B33-Promoter offensichtlich aktiv ist, wie eine erste Messung in Tab.1.a zeigt.

Der Nachweis der Integration des Konstruktes in die positiven Genotypen wurde von der PLANTA mittels PCR geführt. In den uns vorliegenden Versuchprotokollen wurden die PHB-Synthesegene A, B und C in PH22-20, PH22-30 und PH22-53 über ein starkes PCR-Signal nachgewiesen, lediglich PH22-44 wies für B und C schwächere Banden auf.

Um die Expression der Transgene nachzuweisen, wurden Gewebekulturproben entnommen. Daraus soll zu einem späteren Zeitpunkt mRNA gewonnen werden, um eine RT-PCR durchzuführen. Zusätzlich liegt noch tiefgefrorenes Material aus den Rübenkörpern vor (siehe auch 5).

2.2.2. Transgener Tabak aus München

PHB-Werte wurden gemessen in transgenen Tabakblattproben mit einer Alkohol-induzierbaren PHB-Synthese, erstellt mit einer Strategie aus Kern- und Plastomtransformation (kernkodierte, plastidendirierte RNA-Polymerase unter Kontrolle des Ethanol-induzierbaren ALCR-Promoters, plastidäres PHB-Operon mit T7-Element für den Polymerasestart). Die Werte sind in Tab.2. dargestellt. Dabei ist eindeutig eine Induktion der PHB-Synthese durch Ethanol zu erkennen, die z.T. erhöhten transgenen Kontrollwerte ("nicht induziert") lassen sich durch die räumliche Nähe induzierter und nicht induzierter Pflanzen erklären, so dass aufgrund der Flüchtigkeit des Ethanols auch die Kontrollen in geringem Masse induziert wurden. Der Maximalwert von 1380 ppm spiegelt eine ähnliche Größenordnung wie bei unseren Experimenten mit Ethanolinduktion bei Raps wieder.

2.2.3. Transgene Arabidopsis aus Kiel

Die PHB-Gehalte in den Samen von 474 Transformanten aus 2.1.1 lagen in der T1-Generation bei 2-54 ppm (Kontrolle 2-20), lediglich eine Transformante erreichte einen Wert von 1586+/-360 ppm. 26 Pflanzen, die wegen zu geringer Samenernte in T1 nicht analysiert werden konnten, wurden nachgebaut zusammen mit den 6 Kandidaten aus T1 mit Werten >40ppm und einer Kontrolle <40 ppm. Alle wurden vor dem Pikieren einer Kanamycin-Selektion ausgesetzt. Die Ergebnisse der Samengehalte in Tab.3. zeigen, dass nur der Genotyp USP_I_395 gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte PHB-Werte auch in selektierten Einzelpflanzennachkommenschaften besitzt. Verwunderlich für ein Transformationsexperiment mit Arabidopsis ist die geringe Zahl von transgenen Pflanzen (1 von 501!). Allerdings wurden bei den Experimenten mit dem samenspezifischen fatB4-Promoter gar keine Pflanzen mit signifikanter PHB-Synthese gefunden. Um die transgene USP_I_395 bezüglich Promoterspezifität und PHB-Synthese näher zu charakterisieren wurden in T2-Pflanzen verschiedene Zielgewebe beprobt: alte und junge Blätter, junge und reife Schoten an verschiedenen Terminen, sowie Samen und Schotenwände zur Zeit der Ernte. Die Ergebnisse waren überraschend und weisen darauf hin, dass der USP-Promoter in Arabidopsis nicht samenspezifisch aktiv ist (Abb.1.). Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen bei Raps in 2.4.

Um die Expression der Transgene nachzuweisen, wurden jeweils 2 Proben von jungen Blättern und grünen Schoten entnommen. Daraus soll zu einem späteren Zeitpunkt mRNA gewonnen werden, um eine RT-PCR durchzuführen (siehe auch 5).

2.2.4. Transgener Raps aus Kiel

Tab.4. zeigt die PHB-Gehalte in den Transformanten von Raps aus 2.1.2. Dabei wurden ausgehend von den Erfahrungen in Arabidopsis zusätzlich zu den Samengehalten auch Blattgehalte und bei den jüngeren Proben die Gehalte der reifen Schotenwände gemessen. Als gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht können Gehalte ab 50 ppm gelten. Bei 66 Pflanzen waren das 10 Pflanzen von 50-100 ppm, 10 Pflanzen von 100-150 ppm und 2 Pflanzen >150 ppm. Hier ist die Samenspezifität des USP-Promoters eindeutig gegeben. Obwohl die Höchstwerte von ca. 170 ppm noch nicht von wirtschaftlichem Interesse sind, wurden die betreffenden Pflanzen nachgebaut. Mit den abschließenden Ergebnissen ist wegen der langen Vegetationsperiode und der 2monatigen Vernalisationsfrist jedoch erst am Jahresende zu rechnen.

2.3. Weiterführende Analysen

Wie oben angesprochen stehen bereits Gewebeproben für eine Expressionsanalyse zur Verfügung, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Transkriptmenge, PHB-Gehalt und Polymerisationsgrad zu klären. Auch wurde bereits ein Southernblot mit DNA aus B33-Rüben und USP-Arabidopsis erstellt, um die Kopienzahl der eingeführten PHB-Gene festzustellen. Diese Experimente werden im August 04 durchgeführt werden.

Ferner soll das Extraktionsverhalten und der Polymerisationsgrad von PHB aus den Transformationen mit den USP-Konstrukten in Raps und Arabidopsis untersucht werden.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse aller Teilprojekte der Projektphase II

Auf eine detaillierte Zusammenfassung der Ergebnisse aller Teilprojekte der Projektphase II wird hier verzichtet, weil diese bereits in den vorliegenden Schlussberichten aufgeführt sind. Im folgenden wird daher eine tabellarischen Übersicht über die im Projekt erzielten PHB-Gehalte in Pflanzen gezeigt.

Dabei wird eine Gliederung nach Transformationsstrategie vorgenommen. Die Spalte "Organell" bezeichnet das Kompartiment, in dem die Synthese stattfindet (Target), die Spalte "Konstrukt" beschreibt Promoter und PHB-Gene, der PHB-Gehalt ist als %-Anteil der Gewebstrockenmasse angegeben. Bei kursiven Werten mit der Bezeichnung *m* liegt hauptsächlich Monomer und kein Polymer vor.

Übersicht 1: PHB-Gehalte in verschiedenen transgene Pflanzen nach Kerntransformation und Plastidentargeting. Der 40%-Wert für *A. thaliana* wurde nach Transformation mit einem pBI_ABC, der 2%-Wert nach Transformation mit einem pAM_ABC-Konstrukt erhalten. Die Monomer-Akkumulationen stammen aus pAM_ABC-Transformationen.

Spezies	Organell	Konstrukt	Speichergewebe	max. PHB [%DW]	Arbeitsgruppe
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plastid	35S/ ABC	Blatt	40 2,0	Willmitzer Jung
<i>Nicotiana tabacum</i>		35S/ ABC	Blatt	0,08 <i>m</i>	Jung, KWS
		35S/ ABC	Blatt	0,05	Willmitzer
<i>Solanum tuberosum</i>		35S/ ABC	Blatt, Knolle	<0,05	Willmitzer
<i>Brassica napus</i>		35S/ ABC	Blatt	0,13	Jung, KWS
<i>Beta vulgaris</i>		35S/ ABC	Blatt	1,2 <i>m</i> / 0,6 <i>m</i>	Jung, KWS
		35S/ ABC	hairy root	5,5	Jung

Übersicht 2: PHB-Gehalte in verschiedenen transgene Pflanzen nach Kerntransformation und Plastidentargeting unter Verwendung von alternativer Promotoren und Phasingenen (P). FatB4, P-LH und USP sind samenspezifische Promotoren, B33 ein Knollen-/Speicherwurzel-spezifischer und AlcA ein alkoholinduzierbarer Promoter. Das Monomer in Rübe tritt nach pBI_B33_ABC-Transformation auf.

Spezies	Organell	Konstrukt	Speichergewebe	max. PHB [%DW]	Arbeitsgruppe
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plastid	35S/AlcA ABC	Blatt	0,5	Willmitzer
		FatB4/ ABC	Samen	0,003	Jung
		USP/ ABC	Samen	0,18	Jung
			Blatt	1,07	
<i>Nicotiana tabacum</i>	Plastid	FatB4/ ABC	Samen	0,005	Jung, KWS
<i>Solanum tuberosum</i>		B33/ ABC	Knolle	1,0	Willmitzer
<i>Brassica napus</i>		FatB4/ ABC	Samen	0,005	Jung, KWS
		35S/AlcA ABC	Blatt	0,14	
		USP/ ABC	Samen	0,017	
<i>Beta vulgaris</i>		35S/ ABC, P	Hairy roots	1,5	Jung
		B33/ ABC	Rübe	0,05 <i>m</i>	Willmitzer, KWS