

# Gezielte Übertragung minimierter Transgensequenzen mit optimierter Funktion Erzeugung Markergen-freier, transgener Pflanzen mit Hilfe eines negativen Selektionsmarkers

Carla Struzyna, Katrin Neumann, <sup>1</sup>Karin Sonntag, Inge Broer

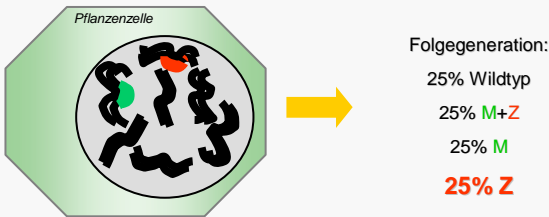
Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Institut für Landnutzung, Agrobiotechnologie, <sup>1</sup>Bundesanstalt für Züchtungsforschung Groß Lüsewitz

Förderkennzeichen 0312627 I

Nachdem die Markergene (Antibiotikaresistenzgene) ihre Aufgabe, das „Markieren“ von transgenen Zellen, erfüllt haben, sind sie in der gentechnisch veränderten Pflanze funktionslos. Deshalb soll in diesem Projekt ein System entwickelt werden, das es erlaubt, das Markergen im nachhinein zu entfernen. Negative Selektionsmarker sollen ermöglichen, dass Markergen-tragende Pflanzen problemlos aussortiert werden können. Hierfür müssen das Antibiotikaresistenzgen und der negative Marker zusammen in einer „Markerkassette“ gekoppelt werden. Sind Zielgen und Markerkassette unabhängig im Genom eingebaut worden, verteilen sie sich unterschiedlich auf die Nachkommenschaft, daher muß die Kassette getrennt vom Zielgen auf verschiedenen Chromosomen der Pflanze eingebaut werden (Cotransfer und getrennte Integration). Dies soll durch die Variation der Transformationsbedingungen erreicht werden. Nach Segregation der Chromosomen auf die Nachkommen sollen mit Hilfe des in der Kassette aktiven negativen Markers einfach und zuverlässig jene Pflanzen erkannt und eliminiert werden, in denen das Antibiotikaresistenzgen vorhanden ist.

VERSUCHSBESCHREIBUNG:

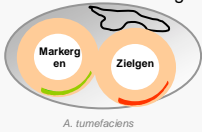
**Ziel:** Integration von Marker- und Zielgen in einer Kopie an getrennten Orten



markerfreie Nachkommen mit Zielgen kann man erhalten, wenn Marker- und Zielgen im Genom der transgenen Pflanze getrennt in einer Kopie vorliegen

Mögliche Transformationsmethoden für gleichzeitige (Cotransfer) und örtlich getrennte Integration:

A) Infektion mit einem Bakterienstamm, der zwei Plasmide trägt



hohe Cotransferraten

Aber: geringe Wahrscheinlichkeit, dass Marker- und Zielgen auf verschiedenen Chromosomen eingefügt werden  
**erschwertes Auskreuzen markerfreier Nachkommen**

B) Infektion mit zwei Bakterienstämmen, die jeweils ein Plasmid tragen



niedrige Cotransferraten

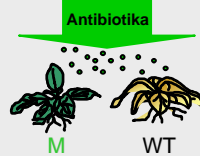
Aber: hohe Wahrscheinlichkeit, dass Marker- und Zielgen auf verschiedenen Chromosomen eingefügt werden  
**einfaches Auskreuzen markerfreier Nachkommen**

ERGEBNISSTAND:

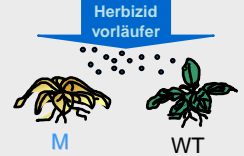
Wie erwartet führte die Transformationsmethode A mit einem Agrobakterienstamm und zwei Plasmiden zu hohen Cotransferraten (Raps 71%, Tabak 68%) während Methode B (zwei Agrobakterienstämme mit je einem Plasmid) bei Raps mit 47% und bei Tabak mit nur 7% niedrigere Raten ergab. Durch Modifikationen des Verfahrens konnte dieser Nachteil der Methode B jedoch ausgeglichen werden (Cotransferrate 57%), sodass hier sowohl die Cotransferraten als auch die Wahrscheinlichkeit der getrennten Integration hoch genug sind, um markerfreie, transgene Nachkommen zu erhalten. Zur Identifizierung dieser Pflanzen wird als negativer Marker ein Deacetylasegen aus *E. coli* (*argE*) verwendet, dessen Produkt aus der nicht phytotoxischen Induktorsubstanz *N*-ac-Phosphinothricin das Herbizid Phosphinothricin bildet. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Substanz für die Selektion *argE*-freier Pflanzen geeignet ist. Für einen breiten Einsatz ist die Induktorsubstanz noch nicht rein genug, es sind aber vielversprechende Ansätze zur Aufreinigung vorhanden. Zur Zeit wird eine molekulare Optimierung der Gensequenz und die Verbesserung der Synthese- und Aufreinigungsmethoden der Induktorsubstanz angestrebt. Der Analysenaufwand zur Identifizierung von Pflanzen mit Zielgen wird dann um ein Vielfaches verringert.

positive und negative Selektion:

**Positive Selektion:** Pflanzen mit einem bestimmten Fremdgen überleben.



**Negative Selektion:** Pflanzen mit einem bestimmten Fremdgen sterben.



Kopplung von positivem und negativem Markergen in einer Markerkassette

