

Etablierung eines alternativen Selektionssystems auf der Basis einer D-Aminosäureoxidase bei Apfel

C. Hättasch, H. Flachowsky und M.-V. Hanke

Institut für Obstzüchtung, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Dresden

Für die Selektion von transgenen Apfelpflanzen werden in der Regel so genannte Markergene verwendet. Dabei handelt es sich meist um Gene, die den transgenen Zellen eine Antibiotika- oder Herbizidresistenz vermitteln. Die Verwendung solcher Markergene wurde in den letzten Jahren zunehmend kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund sollen alternative Selektionssysteme entwickelt und an Apfel etabliert werden.

Eines dieser Systeme basiert auf der Selektion mit dem Gen *dao1*. Dieses Gen stammt aus der Hefe *Rhodotorula gracilis* und kodiert für eine D-Aminosäureoxidase (DAAO). Das Enzym ist in der Lage phytotoxische und nicht-toxische D-Aminosäuren oxidativ zu desaminieren. Dabei werden die phytotoxischen D-Aminosäuren D-Alanin und D-Serin unter Abspaltung von Ammoniumionen zu nicht-toxischen Produkten umgewandelt. Damit ist es transgenen Zellen möglich, unter Anwesenheit von D-Alanin und D-Serin im Selektionsmedium zu regenerieren. Im Gegensatz dazu werden die nicht-toxischen D-Aminosäuren D-Valin und D-Isoleucin zu toxischen Produkten metabolisiert. Diese D-Aminosäuren können somit zur Eliminierung transgener Pflanzen benutzt werden. Das System wurde bisher erfolgreich an *Arabidopsis thaliana* getestet (Erikson et al., 2004) und soll nun im Rahmen dieser Arbeit an der Apfelsorte ‚Pinova‘ etabliert werden.

Es wurden zunächst die Konzentration von D-Alanin und D-Serin ermittelt, bei denen keine Sprossregeneration an Blattexplantaten erfolgt. Dabei wurde festgestellt, dass die Reaktionen des Apfelgewebes bei beiden D-Aminosäuren nahezu identisch sind. In einem Bereich von 0 bis 0,1 mM konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (0 mM) festgestellt werden. Erst ab einer Konzentration von 0,5 mM und größer wurden toxische Effekte sichtbar. Ab einer Konzentration von 2 mM war die Sprossregeneration stark gehemmt. Damit erscheint diese Konzentration geeignet zur Selektion transgener Zellen.

Für Herstellung transgener Pflanzen, die das *dao1* Gen exprimieren, wurde ein binärer Vektor erstellt. Dieser enthält neben dem *dao1* auch noch das *nptII* Gen. Beide Gene stehen unter der Kontrolle konstitutiver Promotoren. Um eine Expression des *dao1* Gens in *A. tumefaciens* zu unterbinden, wurde ein Intron in das Leseraster des Gens eingefügt. Im Anschluss wurden mit diesem Vektor erste Transformationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden parallele Experimente durchgeführt, in denen sowohl mit D-Aminosäuren als auch mit Kanamycin selektiert wurde. Dieser Ansatz ermöglicht einen direkten Vergleich der Effizienz beider Selektionssysteme. Mit D-Serin konnten bislang keine

Regenerate gewonnen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei der Selektion mit Kanamycin bereits 16 Regenerate erzeugt. Diese sollen nun molekulargenetisch und biochemisch charakterisiert werden. Gleichzeitig werden neue Transformationsversuche angelegt, bei denen verschiedene Konzentrationen zwischen 1 mM und 2 mM D-Serin verwendet werden.

Literatur

Erikson, O., Hertzberg, M. & Näsholm, T. (2004) *Nat. Biotechnol.* **22**, 455-458.

Dieses Projekt wird gefördert im Rahmen des europäischen Projektes ISAFRUIT.