

Transformationssysteme zur Erzeugung markerfreier transgener Pflanzen bei *Brassica napus*

Karin Sonntag¹, Youping Wang², Michael Wallbraun³, Carla Struzyna⁴, Katrin Neumann⁴, Inge Broer⁴

¹Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für landwirtschaftliche Kulturen, Rudolf-Schick-Platz 3a, 18190 Groß Lüsewitz, e-mail: k.sonntag@bafz.de

²College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou Universität, Yangzhou 225009, China

³RLP-AgroScience GmbH, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße

⁴Agrar- und umweltwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18059 Rostock

Zur sicheren und schnellen Identifizierung transgener Zellen werden Marker-gene eingesetzt, die eine Antibiotika- oder Herbizidresistenz vermitteln. Die biologische Sicherheit dieser Gene wird jedoch kontrovers diskutiert. Vor diesem Hintergrund wurden Untersuchungen durchgeführt, Nachkommen zu erzeugen, die nur noch das Zielgen tragen. Von mehreren denkbaren Lösungsansätzen, die in den letzten Jahren weltweit entwickelt wurden, kam bei Raps (*Brassica napus*) das nachträgliche Entfernen des *nptII*-Markers durch Kopplung mit dem negativen Selektionsmarker *argE* und die Nutzung des positiven Selektionsmarkers Phosphomannose-Isomerase (PMI) aus *E. coli* zum Einsatz. Durch Expression der Mannose-6-Phosphat-Isomerase sind die transformierten Zellen in der Lage, auf Medium mit Saccharose und Mannose zu Pflanzen zu regenerieren (Joersbo 2001). Für diese Experimente wurden Hypokotylexplantate der Sorte 'Drakkar' nach der Methode von De Block et al. (1989) mit dem *Agrobacterium* inkubiert.

Die höchste Transformationsfrequenz von 7,9 % mit dem Konstrukt pNov-Gus konnte unter Zugabe von 4,5 g/l Mannose und 10 g/l Saccharose erreicht werden. Medien mit >5 g/l Mannose führten zu einer drastischen Reduktion der Entwicklung von transgenen Pflanzen.

Die stabile Integration des Transgens wurde mit *manA*-spezifischen Primern durch PCR- und Southern Blot-Analyse nachgewiesen.

Die Strategie bei der Kopplung des Deacetylasegens mit dem *nptII*-Gen hat zum Ziel, die Co-Transformation einer Pflanzenzelle mit verschiedenen T-DNAs zu ermöglichen (Komari et al. 1996). Dabei können diese in einem (Methode A) oder in zwei *Agrobacterien*stämmen (Methode B) enthalten sein. Durch Applikation der nicht-phytotoxischen Substanz *N*-Acethyl-phosphinothricin (*N*-Ac-pt) sterben solche Pflanzen ab, die das Deacetylasegen und das damit gekoppelt vererbte *nptII*-Gen besitzen. In 71% der Pflanzen, die aus Transformationen mit der Methode A hervorgingen, wurden sowohl das Kanamycinresistenz- als auch das Deacetylasegen nachgewiesen. Die entsprechende Rate bei der Methode B betrug 47%. Diese Co-Transferraten liefern eine gute Basis für die Trennung der verschiedenen T-DNAs im Genom und stellen den ersten Schritt zur Identifizierung markerfreier Pflanzen dar. Die

Herstellung der Induktorsubstanz in ausreichender Reinheit ist eine weitere Voraussetzung, die zukünftig zu lösen ist.