

# **Einfluss von ABA auf frühe Embryogeneseprozesse**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

von Sigrun Senger

aus Halle

Gatersleben 2000

Gutachter:     1. Herr Prof. Dr. C. Wasternack  
                  2. Herr Prof. Dr. U. Wobus  
                  3. Herr PD Dr. E. Kranz

Datum der öffentlichen Verteidigung:     14.03.2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Aspekte der Samenentwicklung . . . . .	1
1.2. Aspekte der somatischen Embryogenese . . . . .	3
1.3. ABA und Samenentwicklung . . . . .	5
1.3.1. ABA-Biosynthese und ABA-Mutanten . . . . .	5
1.3.2. ABA-Akkumulation während der Samenentwicklung . . . . .	8
1.3.3. ABA-Effekte während der Samenentwicklung . . . . .	9
1.3.4. Strategien der ABA-Funktionsanalyse . . . . .	11
1.4. Zielstellung der Arbeit . . . . .	13
 <b>2. Material und Methoden</b>	 <b>14</b>
2.1. Material . . . . .	14
2.1.1. Pflanzenmaterial . . . . .	14
2.1.2. Vektoren zur Pflanzentransformation . . . . .	14
2.1.3. Bakterien . . . . .	14
2.1.4. Enzyme . . . . .	14
2.1.5. Antibiotika . . . . .	14
2.1.6. Pflanzenhormone und andere Wirkstoffe . . . . .	15
2.1.7. Antikörper und Konjugate . . . . .	15
2.1.8. Proteinmarker . . . . .	16
2.1.9. Andere Reagenzien und Kits . . . . .	16
2.1.10. Medien . . . . .	16
2.1.11. Puffer und Lösungen . . . . .	18
2.1.12. Andere Materialien und Geräte . . . . .	18
2.2. Methoden . . . . .	19
2.2.1. Anzucht- und Wachstumsbedingungen für Pflanzen . . . . .	19
2.2.2. Pflanzentransformation . . . . .	19
2.2.3. Pflanzenanzucht und –kultivierung . . . . .	19
2.2.4. Segregationsanalyse . . . . .	20
2.2.5. <i>in vitro</i> Kultivierung von Protoplasten . . . . .	20
2.2.5.1. Protoplastierung . . . . .	20
2.2.5.2. Somatische Embryogenese . . . . .	20
2.2.5.3. Bestimmung der Regenerationseffizienz . . . . .	21
2.2.5.4. Gewinnung von Zellkulturmaterial für biochemische Untersuchungen . . . . .	21

2.2.6. Samengewinnung . . . . .	21
2.2.7. Hitzeschock-Behandlung . . . . .	21
2.2.8. Proteinextraktion, -auftrennung und -nachweis . . . . .	22
2.2.8.1. Proteinextraktion . . . . .	22
2.2.8.2. Gelelektrophorese und Western Blot . . . . .	23
2.2.9. ABA-ELISA . . . . .	23
2.2.10. Chlorophyll- und Carotinoidanalyse . . . . .	24
2.2.11. Histologische Untersuchungen . . . . .	24
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1. Transgene Pflanzen mit stabiler konstitutiver scFv-Antikörperexpression . . .	25
3.2. Charakterisierung <i>in vitro</i> kultivierter Pflanzen des Wildtyps, der trans- genen Linien Np9-41/4 und RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten . .	29
3.2.1. Morphogenetische Charakterisierung . . . . .	29
3.2.2. Biochemische Charakterisierung . . . . .	30
3.3. Einfluss von ABA auf die Entwicklung somatischer Embryonen . . . . .	32
3.3.1. Morphogenetische Veränderungen somatischer Embryonen unter ABA-Mangelbedingungen . . . . .	32
3.3.2. Normalisierung ABA-defizienter Zellkulturen durch ABA- Komplementation . . . . .	39
3.4. Quantitative Charakterisierung der Entwicklung somatischer Embryonen . .	42
3.4.1. Regenerationseffizienz der <i>in vitro</i> Zellkulturen . . . . .	42
3.4.2. Zunahme der Embryomasse während der <i>in vitro</i> Kultivierung. . . . .	43
3.5. Entwicklungsabhängige Regulation der Transgenexpression . . . . .	46
3.5.1. Transgenexpression während der somatischen Embryogenese . . . . .	46
3.5.2. Gewebespezifische anti-ABA scFv-Akkumulation in Pflanzen . . . . .	48
3.6. Akkumulation von Stärke und Speicherproteinen in somatischen Embryonen . . . . .	49
3.7. Entwicklungsabhängige Induzierbarkeit kleiner Hitzeschockproteine in somatischen Embryonen . . . . .	50
3.8. ABA-Akkumulation während der somatischen Embryogenese . . . . .	54
3.9. Entwicklungsabhängige Regulation der Pigmentakkumulation während der somatischen Embryogenese . . . . .	58
3.10. Einfluss von ABA auf die Samenentwicklung . . . . .	60
3.10.1. Ultrastruktur reifer Samen des Wildtyps und ABA-defizienter Linien .	60
3.10.2. Frischgewichtsveränderung während der Samenentwicklung . . . . .	63

3.10.3. Entwicklungsabhängige Akkumulation von Reserveglobulinen, kleinen Hitzeschockproteinen hsp17 und Pigmenten während der Samenentwicklung . . . . .	64
3.10.4. ABA-Gehalt und scFv-Akkumulation während der Samenentwicklung .	66
<b>4. Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1. ABA-Gehalt und ABA-Effekt in frühen Embryogeneseprozessen . . . . .	69
4.2. Somatische Embryogenese als Experimentalsystem zur ABA-Funktionsanalyse . . . . .	69
4.3. Strategien der ABA-Funktionsanalyse - Bewertungskriterien der Embryoentwicklung . . . . .	70
4.4. ABA-Mangel durch Immunmodulation, Mutation und Fluridonbehandlung .	72
4.5. ABA-Mangel - Morphogenese, Ultrastruktur und Regenerationseffizienz somatischer Embryonen . . . . .	74
4.6. ABA-Mangel – biochemische Parameter somatischer Embryonen . . . . .	76
4.7. ABA-Applikation - ABA-Gehalt, Morphogenese, Ultrastruktur und Regenerationseffizienz somatischer Embryonen . . . . .	81
4.8. Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der ABA-Applikation . . . . .	83
4.9. ABA-Applikation - biochemische Parameter somatischer Embryonen . . . .	85
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABA	<i>cis,trans</i> -Abscisinsäure
<i>aba1</i>	ABA-Biosynthesemutante <i>aba1</i>
<i>aba2</i>	ABA-Biosynthesemutante <i>aba2</i>
<i>abi</i>	ABA-insensitive Mutante
ALP	Alkalische Phosphatase
BA	6-Benzylaminopurin
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin
CaMV	„cauliflower mosaic virus“, Blumenkohl-Mosaik-Virus
Da	Dalton
DAP	„day after pollination“, Tag nach der Befruchtung
DOXP	D-1-Deoxy-Xylulose-5-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“, Enzymimmuntest
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fv	„fragment variable“, variable Domäne des Antikörpermoleküls
FW	Frischgewicht
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
HS	Hitzeschock
hsp	„heat shock protein“, Hitzeschockproteine
IgG	Immunglobulin G
IPP	Isopentenylpyrophosphat
Kan	Kanamycin
KDEL	Lysin (K)-Asparaginsäure (D)-Glutaminsäure (E)-Leucin (L)-Peptid
mRNA	„messenger RNA“, Boten RNS
NAA	„naphthyl acetic acid“, Naphthyllessigsäure
n.b.	nicht bestimmt
Np	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphat buffered saline“, phosphatgepufferte Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure (RNS)
RT	Raumtemperatur
scFv	„single-chain Fv“, Einketten-Antikörperfragment
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
TG0	Primärtransformanden-Generation
TG1	Nachkommen der TG0
TG2	Nachkommen der TG1
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v	„volume“, Volumen
w	„weight“, Gewicht
WT	Wildtyp

## 1. Einleitung

Im Jahr 1963 wurde zum einen die Substanz Abscisin II aus jungen Baumwollfrüchten isoliert, die Abscission der Früchte von der Mutterpflanze bewirkte. Parallel wurde Dormin entdeckt, das die Knospenruhe der Buche förderte. Die chemische Struktur der beiden Substanzen war identisch. Seit 1967 wird diese Verbindung als Abscisinsäure (ABA) bezeichnet (Addicott und Carns 1983). Der ursprünglich beschriebenen Phytohormonfunktion bei Blattabfall und Knospenruhe konnten bald viele weitere hinzugefügt werden. Abscisinsäure kommt ubiquitär in der Pflanze vor und ist an der Regulation grundlegender physiologischer und entwicklungsbiologischer Prozesse beteiligt (Hetherington und Quatrano 1991, Davies 1995, Quatrano et al. 1997). Neben der Vermittlung der Reaktion auf Trockenstress durch Schließen der Spaltöffnungen (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 1997, Netting 2000) gehören auch die Anpassung an Kälte und hohe Salzkonzentrationen dazu (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki 1996, 2000, Tabaeizadeh 1998).

Weiterhin spielt ABA eine bedeutende Rolle bei der Samenentwicklung, die sowohl die Beeinflussung der Embryoentwicklung und –reifung als auch die Akkumulation von Speicherstoffen, insbesondere Speicherproteinen, die Ausbildung der Austrocknungstoleranz und der Samenruhe und die Verhinderung vorzeitiger Keimung einschließt (Kernode 1990, Black 1991, Rock and Quatrano 1995, McCarty 1995, Marion-Poll 1997, Leung and Giraudat 1998, Holdworth et al. 1999).

### 1.1. Aspekte der Samenentwicklung

Bevor auf die Funktion von ABA im Samen genauer eingegangen wird, soll die Samenentwicklung in Angiospermen kurz umrissen werden.

Die Embryogenese höherer Pflanzen erfüllt mehrere Funktionen. Zum ersten dient sie der Ausprägung der Meristeme und der Musterfestlegung für die spätere Pflanzenentwicklung, zum zweiten der Differenzierung der primären Pflanzengewebetypen. Außerdem werden spezielle Speicherorgane als Nährstoffreservoir für Samen- und Keimlingsentwicklung ausgebildet und die Grundlage für die Samenruhe geschaffen (Goldberg et al. 1994).

Der Lebenszyklus der Blütenpflanzen ist durch den Wechsel zwischen haploider (gametophytischer) und diploider (sporophytischer) Phase gekennzeichnet (West und Harada 1993, de Jong et al. 1993, Goldberg et al. 1994, Mordhorst et al. 1997). Die haploide Phase beginnt mit der Differenzierung von Pollen (männlicher Gametophyt) und Embryosack (weiblicher Gametophyt) nach vorangegangenen meiotischen und mitotischen Teilungen der Vorläufer-

zellen. Während der Befruchtung verschmilzt ein männlicher Gamet mit dem haploiden Kern der Eizelle, wodurch ein diploider Zygotenkern entsteht. Das Ergebnis der Verschmelzung des zweiten Pollenkerns mit den polaren Kernen der Zentralzelle des Embryosacks ist ein triploider Endospermkern. Aus dem Endospermkern und dem Rest des Embryosacks wird das sekundäre Endosperm gebildet, das der Ernährung des Embryos dient. Später wird dieses entweder in ein Speichergewebe umgewandelt, das der Embryo vor oder im Verlauf der Keimung aufbraucht oder es wird sekundär zurückgebildet. Nach der Befruchtung entwickelt sich aus der Zygote der Embryo. Die befruchtete Eizelle, deren Polarität durch die Lage im Embryosack festgelegt ist, teilt sich meistens asymmetrisch in eine kleine apikale und eine große basale Zelle. Aus der großen basalen Zelle entwickelt sich der Suspensor. Dieser dient bis zum Herzstadium dem Nährstofftransport in den Embryo durch Verankerung mit dem umgebenden Embryosack und dem Eizellengewebe. Die oberste Zelle des Suspensors, die Hypophyse, kann an der Bildung des Wurzelmeristems beteiligt sein (onograder oder Cruciferentyp, siehe Übersichtsartikel Mordhorst et al. 1997).

Aus der apikalen Zelle entwickelt sich der eigentliche Embryo. Durch weitere Teilungen entsteht ein globulärer Embryo. Ein wichtiges Ereignis in der Embryoentwicklung ist der Übergang vom globulären Stadium mit radialer Symmetrie zum Herzstadium mit bilateraler Symmetrie. In diesem Stadium werden die Positionen der Kotyledonen und der Embryoachse festgelegt. Nach ihrer Bildung entwickeln sich durch Zellteilungen und Zellelongation Torpedo- und Kotyledonenstadium.

Die eigentlichen morphogenetischen Ereignisse finden zeitlich im ersten Viertel der Samenentwicklung statt. Spätere Stadien der Embryogenese dienen der Akkumulation von Speicherstoffen und der Vorbereitung des Embryos auf die Samenruhe und –keimung (Bewley und Black 1994).

Der Einfluss des maternalen Gewebes während der Samenentwicklung ist nicht genau definiert (Kermode 1990). Bisher wurden keine maternalen Gene identifiziert, die Oogenese oder Musterbildung im frühen Embryo beeinflussen (de Jong et al. 1993). Es wird postuliert, dass der Sporophyt dazu dienen könnte, die Entwicklung des Embryos durch Nährstoffversorgung und räumliche Fixierung solange zu unterstützen, bis er vollausgebildet ist und genügend Reserven für eine erfolgreiche Keimung und nachfolgende Keimlingsentwicklung angereichert hat (Kermode 1990). Diesem Einfluss könnten sowohl genetische als auch biomechanische Faktoren zugrunde liegen, die an Musterbildung und Regulation der Zellexpansion beteiligt sind (Lindsey und Topping 1993).



Eine bedeutende Rolle spielt der Übergang zwischen embryonaler und postembryonaler Entwicklung, der speziesabhängig ist und bisher nicht genau definiert werden kann.

Die Samenentwicklung, -anzahl und -qualität sind abhängig sowohl von inneren Faktoren wie zum Beispiel Hormonen als auch von Umweltfaktoren wie Wasser, Temperatur, Nahrungs- und Lichtangebot.

Die Samenentwicklung lässt sich in drei Perioden einteilen. Während der ersten Periode finden Zellteilungen statt, Trockengewicht und Zellgröße sind gering. Im Verlauf der Zellexpansion, die charakteristisch für die zweite Periode ist, nimmt das Frischgewicht des gesamten Samens rapide zu und der Wassergehalt ist hoch. Danach steigt durch Akkumulation von Speicherstoffen das Trockengewicht des Samens, während sich das Frischgewicht kaum verändert. Die dritte Periode ist durch graduelle Reduktion des Wassergehaltes und damit durch Abnahme des Frischgewichtes gekennzeichnet. Gleichzeitig nimmt der Chlorophyllgehalt ab. In dieser Phase kommt es zur Ausprägung der Austrocknungstoleranz (Norton und Harris 1975, Kermode 1990).

## **1.2. Aspekte der somatischen Embryogenese**

Frühe Stadien zygotischer Embryonen sind in der Regel schwer zugänglich, sodass gezielte physiologische und zellbiologische Eingriffe technisch schlecht zu realisieren und zu analysieren sind. Außerdem müssen bei Untersuchungen zygotischer Embryonen immer maternale Einflüsse in Betracht gezogen werden. Aus diesen Gründen wurde u. a. der Etablierung und Untersuchung von somatischen Embryogenesesystemen viel Aufmerksamkeit gewidmet (Zimmermann 1993, Emons 1994, Dudits et al. 1995, Mordhorst et al. 1997).

Unter *in vitro* Bedingungen können sich somatische Embryonen entweder direkt ohne intermediäre Kallusbildung aus differenzierten somatischen Zellen auf der Oberfläche differenzierter Gewebe oder aus Protoplasten bzw. Mikrosporen entwickeln. Eine weitere Möglichkeit ist eine Embryobildung auf indirektem Weg über Kallus- oder Suspensionskulturen (Williams und Maheswaran 1986). In somatischen Embryogenesesystemen gelang es, tatsächlich Embryonen unabhängig von maternalen Einflüssen zur Entwicklung zu bringen. Dieser Fakt wird häufig als Beweis herangezogen, dass das maternale Gewebe keinen unmittelbaren Einfluss auf die Embryoentwicklung hat (Kermode 1990).

Somatische Zellen, die sich nach ihrer Dedifferenzierung zu Embryonen entwickeln können, werden als embryogene Zellen bezeichnet. Embryogenese-kompetente Zellen sind die begrenzte Zahl der Zellen (eines Explantats oder eines Kallusaggregates, der Protoplasten, Mikrosporen oder Suspensionszellen), die abhängig von den Gewebekulturbedingungen zur

Embryoentwicklung kommen. Im Verlauf der somatischen Embryogenese lassen sich unterschiedliche Prozesse unterscheiden. Die Dedifferenzierung der Zellen des Explantats wird häufig durch die Applikation hoher Auxinkonzentrationen eingeleitet. Die Embryoentwicklung selbst findet nach der drastischen Reduzierung der Hormonkonzentration statt. Daneben spielen andere Hormone wie Abscisinsäure und Cytokinine sowie osmotische Bedingungen, Nährstoffversorgung und Salzkonzentrationen eine bedeutende Rolle (Emons 1994).

Dedifferenzierung bedeutet, dass die Zellen ihre spezialisierte Funktion aufgeben und wieder teilungsaktiv werden. Für den Erfolg der Embryogenese ist wichtig, dass kleine cytoplasmareiche Zellen entstehen, die häufig das Ergebnis inäqualer Zellteilungen sind. Diese Form der Zellteilung ist aber keine notwendige Voraussetzung zur Bildung embryogener Zellen (Emons 1994). Nach einer Anzahl von Zellteilungen ohne Zellwachstum bilden sich globuläre vielzellige Strukturen. Embryogene Zellen sind in der Lage Nahrungsreserven zu akkumulieren. Eine ausgeprägte Zelladhäsion zwischen den Tochterzellen ermöglicht ihre interzelluläre Kommunikation. Der Aufbau der Zellwand ist wichtig für den kontrollierten Prozess der Zellelongation. Weitere Grundlagen sind die korrekte Festlegung der Zellteilungsebene und der Grad der Zellexpansion, der durch die Eigenschaften der Zellwand bestimmt wird (Taiz 1984, Fry 1986, 1993). Dabei könnten verschiedene Induktoren, unter anderem Pflanzenhormone wie Cytokinine und Auxine, eine Rolle spielen.

In einer Reihe von Systemen wurden morphologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt, um Übereinstimmungen und Unterschiede zwischen zygotischer und somatischer Embryogenese zu dokumentieren. Dabei wurde die somatische Embryogenese bei Möhren (*Daucus carota*) besonders intensiv untersucht (Zimmermann 1993). Die morphologische Entwicklung der somatischen Embryonen zu globulärem, Herz-, Torpedo- und Kotyledonenstadium ist der zygotischen Embryogenese vergleichbar. Neben der Übereinstimmung morphologischer Charakteristika wurden in somatischen und zygotischen Embryonen verschiedener Spezies wie zum Beispiel Möhre (*Daucus carota* L., Hatzopoulos et al. 1990, Wurtele et al. 1993, Higashi et al. 1998), Raps (*Brassica napus* L., Crouch 1982) und Baumwolle (*Gossypium hirsutum* L., Shoemaker et al. 1987) häufig ähnliche Proteinmuster nachgewiesen. Die samenspezifischen Speicherproteine der jeweiligen Spezies traten auch in somatischen Embryonen auf, meist jedoch zeitlich früher determiniert als in zygotischen Embryonen und in geringerer Menge (Crouch 1982, Shoemaker et al. 1987). Dodeman et al. (1998) berichteten von qualitativen Unterschieden in Proteinmustern zygotischer und somatischer Möhrenembryonen, obgleich morphologische Unterschiede nicht gefunden wurden.

Diese Unterschiede reflektieren zum einen die Bedeutung der Gewebekulturbedingungen für die Entwicklung somatischer Embryonen und zum anderen die biologische Variabilität. Zimmermann (1993) führte aus, dass in späten Stadien der somatischen Embryogenese die Synchronität häufig abnimmt, während in frühen Stadien vor allem in Protoplastenkulturen eine hohe Synchronität erzielt wird (Dudits et al. 1991). Toonen et al. (1994) zeigten, dass sich somatische Embryonen aus morphologisch unterschiedlichen Einzelzellen entwickeln können. Yasuda et al. (2000) bestätigten diese Ergebnisse und fanden zusätzlich, dass die Embryoentwicklung über verschiedene Zwischenstufen morphologischer Stadien ablaufen kann. Somatische Embryonen sind zumeist größer und vielzelliger als zygotische Embryonen (Mordhorst et al. 1997). Zellen somatischer Embryonen zeigten in Untersuchungen von Taylor und Vasil (1996) eine höhere Variabilität in der Organellenzusammensetzung als zygotische Embryonen, besaßen jedoch alle Charakteristika embryogener Zellen.

Auf einen weiteren entscheidenden Unterschied zwischen somatischer und zygotischer Embryogenese soll hier explizit hingewiesen werden. Im Gegensatz zur zygotischen Embryogenese gehen somatische Embryonen häufig nicht in den Zustand der Ruhe über. Ihre Entwicklung ist durch eine kontinuierliche Frischgewichtszunahme gekennzeichnet.

Aufgrund der aufgeführten Übereinstimmungen können somatische Embryogenesesysteme als Modell für die zygotische Entwicklung dienen. Da abgesehen von der Embryogeneseinduktion die Übereinstimmungen in frühen Stadien der somatischen und zygotischen Embryogenese am ausgeprägtesten sind, lassen Untersuchungen früher Stadien der somatischen Embryogenese Rückschlüsse auf frühe Entwicklungsprozesse während der zygotischen Embryogenese zu. Dadurch kann das Problem der schlechten Zugänglichkeit dieser Stadien umgangen werden. Größere Mengen an Material für biochemische Analysen können erzeugt werden. Außerdem findet die somatische Embryogenese unabhängig von maternalen Einflüssen statt. Wirkstoffe können exogen appliziert werden, um ihre Bedeutung für die Embryoentwicklungen zu untersuchen. Dabei sollte jedoch, soweit möglich, immer versucht werden, die Ergebnisse durch vergleichende Untersuchungen zygotischer Embryonen zu überprüfen.

### **1.3. ABA und Samenentwicklung**

#### **1.3.1. ABA-Biosynthese und ABA-Mutanten**

Im folgenden soll genauer auf die entwicklungsphysiologische Rolle von ABA während der Samenentwicklung eingegangen und die ABA-Biosynthese zuerst kurz umrissen werden.

Abscisinsäure ist ein Sesquiterpenoid, das in höheren Pflanzen durch Spaltung von C40-Epoxycarotinoidverbindungen entsteht. Ausgehend von Pyruvat und Glyceraldehyd-3-Phos-

phat (Lichtenthaler et al. 1997, Lichtenthaler 1999) wird in Chloroplasten D-1-Deoxy-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) gebildet (Arigoni et al. 1997). Über mehrere Zwischenschritte, deren Natur noch nicht vollständig aufgeklärt ist, entsteht Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP). Der weitere ABA-Biosyntheseweg ist eng mit der Carotinoidbiosynthese (Abb. 1) verknüpft, die durch Cunningham und Gantt (1998) zusammengefasst wurde.

Die Bildung des Phytohormons ABA geht von 9-*cis*-Neoxanthin aus, das aus Violaxanthin entsteht. Diese Verbindung wird durch eine 9-*cis*-Epoxy-carotinoid-Dioxygenase in zwei C20-Einheiten – Xanthoxin – gespalten. Durch Quin und Zeevaart (1999) wurde nachgewiesen, dass diese Reaktion der geschwindigkeitslimitierende Schritt der ABA-Biosynthese ist. Der Hauptweg der ABA-Synthese setzt sich mit der Bildung von ABA-Aldehyd aus Xanthoxin fort, woraus letztendlich ABA entsteht (Liotenberg et al. 1999, Cutler und Krochko 1999, Zeevaart 1999).

Die Reaktionsschritte bis zur Bildung des Xanthoxins finden in den Chloroplasten statt. Xanthoxin wird ins Cytosol transferiert und dort zu ABA umgewandelt (Liotenberg et al. 1999, Cutler und Krochko 1999).

Der Katabolismus von ABA beginnt zum überwiegenden Teil mit der Hydroxylierung zu 8'-Hydroxy-ABA, woraus spontan oder enzymatisch Phaseinsäure entsteht, die zu Dihydrophaseinsäure reduziert wird (Cutler und Krochko 1999). Die Bildung von ABA durch Konjugation, vor allem mit Glucose, ist die häufigste Form der Inaktivierung.

In den vergangenen Jahren wurden immer mehr ABA-defiziente und ABA-insensitive Mutanten verschiedener Spezies isoliert (Merlot und Giraudat 1997, Koornneef et al. 1998). ABA-insensitive Mutanten synthetisieren normale bis höhere Mengen an ABA (Koornneef et al. 1984), aber der Signalübertragungsweg von der Hormonperzeption zur Reaktion ist gestört. Die möglichen Signaltransduktionswege wurden durch Leung und Giraudat (1998), Himmelbach et al. (1998) sowie durch Grill und Himmelbach (1998) dargestellt und sollen in diesem Kontext nicht näher betrachtet werden.

Phänotypische Unterschiede bezüglich Aufhebung der Samenruhe und vorzeitiger Keimung sowie ungenügende Adaptation an Stressbedingungen insbesondere Trockenstress ermöglichten die Selektion ABA-defizienter Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (Koornneef und Jorna 1982), Kartoffel (Quarrie 1982), Tomate (Tal und Nevo 1973), Mais (Fong et al. 1983a) und *Nicotiana plumbaginifolia* (Rousselin et al. 1992, Marion-Poll et al. 1993). ABA-defiziente Mutanten weisen einen stark reduzierten ABA-Gehalt auf. Der Phänotyp korreliert mit der vorhandenen ABA-Menge (Tal und Nevo 1973, Neill und Horgan 1985) und ist durch exogene ABA-Gabe normalisierbar. ABA-defiziente Mutanten konnten zur Aufklärung der

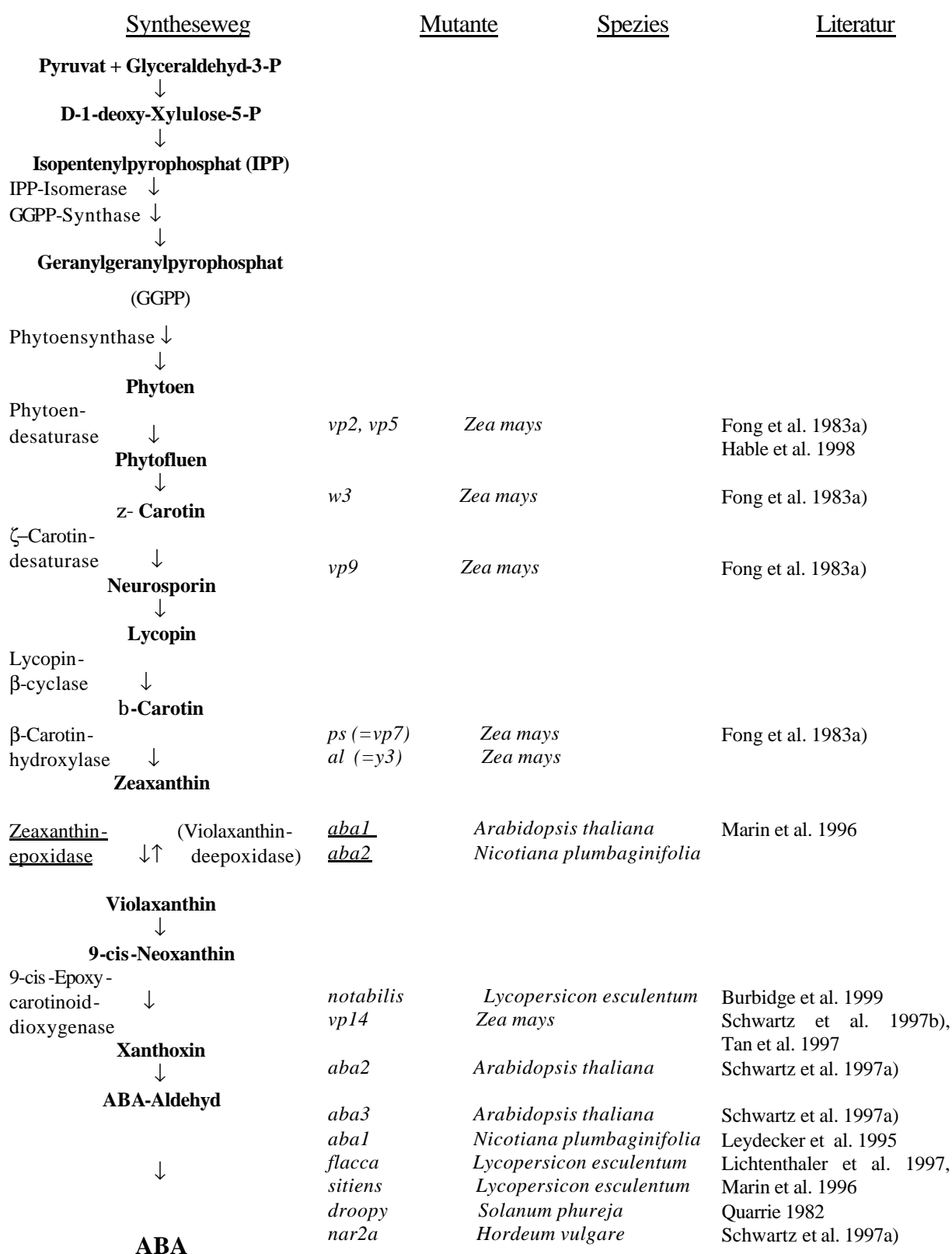


Abb. 1. ABA-Biosyntheseweg und bereits klonierte Enzyme nach Liotenberg et al. (1999). Darstellung der ABA-Biosynthesemutanten und der blockierten enzymatischen Schritte der Synthese.

ABA-Biosynthese genutzt werden (Abb. 1). Die bekannten Mutanten weisen keine vollständige Blockade der ABA-Biosynthese auf. Durch Untersuchungen der ABA-defizienten Tomatenmutanten *flacca* und *sitiens* konnte die Existenz eines alternativen ABA-Biosyntheseweges über ABA-Alkohol nachgewiesen werden (Linforth et al. 1987, Taylor et al. 1988, Rock et al. 1991).

Da die *Nicotiana plumbaginifolia* Mutanten *aba1* und *aba2-1s* (*aba2*) in den Untersuchungen zur ABA-Funktion während der frühen somatischen Embryogenese eingesetzt wurden, sollen beide Mutanten näher charakterisiert werden. *aba2* wurde nach Insertionsmutagenese unter Verwendung des autonomen *Activator*-Transposons von Mais als frühkeimende Mutante isoliert (Marion-Poll et al. 1993). Die Nachkommenschaft zeigte verringerte Samenruhe, geringe Wuchshöhe sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber Wasserstress. Der ABA-Gehalt war stark verringert (Audran et al. 1998). Durch Marin et al. (1996) wurde das durch „Transposon-Tagging“ betroffene Gen kloniert und als Zeaxanthinepoxidase charakterisiert. Die Pflanzen enthielten erhöhte Mengen an Zeaxanthin. Durch Analyse der Protein- und mRNA-Muster konnte gezeigt werden, dass das Enzym hauptsächlich in Blättern, in geringerem Umfang aber auch in Wurzeln und Samen exprimiert wird. Während der Samenentwicklung wurden die höchsten mRNA-Mengen kurz vor Mitte der Samenentwicklung nachgewiesen (Audran et al. 1998). Durch Überexpression der Zeaxanthinepoxidase konnte die Samenkeimung verzögert werden. In Pflanzen mit antisense *ABA2* mRNA-Expression hingegen sank der ABA-Gehalt drastisch ab, und die Pflanzen zeigten einen mutantenähnlichen Phänotyp (Frey et al. 1999).

Auch die ABA-Biosynthesemutante *aba1* von *Nicotiana plumbaginifolia* konnte bezüglich des Defektes in der ABA-Synthese charakterisiert werden (Leydecker et al. 1995). In dieser Mutante ist die Biosynthese des Molybdäncofaktors der ABA-Aldehydoxidase gestört, sodass die Umwandlung von ABA-Aldehyd in ABA nicht katalysiert werden kann. Diese Pflanzen weisen wie *aba2* einen stark reduzierten ABA-Gehalt auf. Die Molybdäncofaktormutation beeinflusst neben ABA-Aldehydoxidase auch Xanthindehydrogenase. Für Nitratreduktase, die ebenfalls den Molybdäncofaktor zur Katalyse benötigt, wurde Überexpression nachgewiesen (Leydecker et al. 1995). Die Beeinflussung mehrerer Enzymaktivitäten durch diese Mutation erschwert die Interpretation der Daten in Bezug auf ABA-Mangeleffekte.

### 1.3.2. ABA-Akkumulation während der Samenentwicklung

Die Samenentwicklung ist ein komplex regulierter Prozess, bei dem verschiedene Hormone zusammenspielen (Evans 1994, Rock und Quatrano 1995). So verändern sich während

der unterschiedlichen Phasen der Samenentwicklung die Konzentrationen von Auxinen, Cytokinin, Gibberellinen und Abscisinsäure. Da im folgenden Erkenntnisse zur ABA-Funktion während der Embryogenese, Samenentwicklung und -reifung dargestellt werden sollen, wird zunächst die Veränderung der ABA-Konzentration während dieser Entwicklungsprozesse betrachtet.

In den meisten Geweben liegt der endogene ABA-Gehalt zwischen 10 und 50 ng g<sup>-1</sup> Frischgewicht entsprechend  $4 \times 10^{-8}$  bis  $2 \times 10^{-7}$  M (Walton und Li 1995). Wesentlich erhöhte ABA-Gehalte (bis  $10^{-6}$  M) wurden in sich entwickelnden Samen und ruhenden Knospen gefunden.

Im Verlauf der Samenentwicklung finden große Veränderungen des ABA-Gehaltes statt. Innerhalb weniger Tage steigt der Gehalt auf das 100fache an, um während Reifung und Austrocknung wieder auf geringere Werte zu fallen. An diesem Prozess können Synthese, Metabolismus und Import beteiligt sein (Walton und Li 1995).

Der starke Anstieg des ABA-Gehaltes erfolgt in der ersten Hälfte der Samenentwicklung (Rock und Quatrano 1995). In der Mitte der Samenentwicklung besitzen Samen sowohl einen hohen ABA-Gehalt als auch die höchste ABA-Sensitivität (Kermode 1990). Während des Überganges zu späteren Embryogenesestadien erreicht der ABA-Gehalt maximale Werte, wobei teilweise zwei Maxima beobachtet werden - eines maternalen und eines zygotischen Ursprungs. Finkelstein (1994) fand, dass maternale ABA für die Samenentwicklung notwendig ist. In reifenden und ruhenden Samen nehmen der ABA-Gehalt und die ABA-Sensitivität ab, das Austrocknungssignal kommt vom Embryo selbst (Karssen et al. 1983, Koornneef et al. 1989, Kermode 1990, Rock und Quatrano 1995). Ein ähnlicher Verlauf der ABA-Akkumulation wurde durch Imai et al. (1995) für *Nicotiana tabacum* beschrieben.

### 1.3.3. ABA-Effekte während der Samenentwicklung

Diese drastischen Änderungen der ABA-Menge lassen auf wichtige Funktionen des Hormons während der Samenentwicklung schließen. Eine Reihe von experimentellen Untersuchungen bestätigten diese Überlegungen.

ABA ist maßgeblich an der Induktion der Synthese und Akkumulation von Speicherproteinen beteiligt. Diese Funktion wurde durch Untersuchungen an isolierten Embryonen verschiedener Spezies belegt (Kermode 1990). Die Induktion der Speicherproteinsynthese und -akkumulation in isolierten unreifen Embryonen durch exogene ABA wurde für Sojabohne (*Glycine max* L., Ackerson 1984, Eisenberg und Mascarenhas 1985, Bray und Beachy 1985), Raps (*Brassica napus* L., Crouch und Sussex 1981, Finkelstein et al. 1985), Senf (*Sinapis alba* L., Fischer et al. 1987) und Luzerne (*Medicago sativa* L., Xu et al. 1990) gezeigt. Die Induzier-

barkeit und die dafür notwendige ABA-Konzentration hängen vom Entwicklungsstadium der isolierten Embryonen ab (Kermode 1990). Durch Applikation des ABA-Biosyntheseinhibitors Fluridon wurde die Speicherproteinsynthese in isolierten Embryonen von Luzerne (Xu und Bewley 1995) und Senf (Fischer et al. 1987) verhindert. Auch *in vivo* konnte eine Korrelation zwischen endogenem ABA-Gehalt und dem Beginn der Speicherstoffakkumulation hergestellt werden (Ackerson 1984, Finkelstein et al. 1985, Kermode 1990, Rock und Quatrano 1995). Für verschiedene ABA-defiziente Mutanten von *Arabidopsis thaliana* wurde kein Zusammenhang zwischen ABA-Defizienz und Speicherproteinsynthese gefunden (Zeevaart und Creelmann 1988). Samen transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen mit samenspezifisch immunmoduliertem ABA-Gehalt (Phillips et al. 1997) enthielten im Vergleich zum Wildtyp keine „protein bodies“ und weniger Ölkörper. Leps (1998) konnte zeigen, dass Embryonen von Pflanzen mit hohem Antikörpergehalt kaum Legumin mRNA akkumulierten.

In Samen ABA-defizienter Mutanten wurden geringere Mengen an LEA-Proteinen (late embryogenesis abundant) nachgewiesen (Merlot und Giraudat 1997). Auch für eine andere Gruppe von Proteinen, die Dehydrine, die vermutlich im Zusammenhang mit der Austrocknungstoleranz der Samen eine Rolle spielen, wurde eine ABA-abhängige Akkumulation der mRNA unabhängig von Wasserstress gefunden (Kermode 1990, Close 1996).

Die Regulation der Expression der entsprechenden Gene durch ABA fassten Skriver und Mundy (1990) sowie Busk und Pagès (1998) zusammen.

Nicht nur die Reserveprotein- sondern auch die Stärkeakkumulation wird in Samen durch ABA beeinflusst (Schussler et al. 1984).

Weiterhin spielt ABA eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung der Samenruhe und der Verhinderung vorzeitiger Keimung. Nachweise wurden durch *in vitro* Inkubation isolierter Embryonen in Gegenwart von ABA erbracht (Kermode 1990). Frühe und späte Stadien isolierter Rapsembryonen keimten gut unter *in vitro* Bedingungen, Embryonen mittlerer Stadien hingegen schlecht (Xu et al. 1990). Ähnliche Ergebnisse wurden für verschiedene andere Pflanzenarten erzielt (Kermode 1990). Der Einfluss von ABA auf die Ausbildung der Samenruhe und Verhinderung der Keimung konnte auch an ABA-defizienten und ABA-insensitiven Mutanten demonstriert werden (Rock und Quatrano 1995, Koornneef et al. 1998). Viviparie konnte ebenfalls durch samenspezifische Immunmodulation des ABA-Gehaltes durch Expression von anti-ABA Einzelketten-Antikörpern (scFv) erzeugt werden (Phillips et al. 1997).

Im Zusammenhang mit der Verhinderung der vorzeitigen Keimung wurde ein stabilisierender ABA-Einfluss auf die Zellwand (Schopfer und Plachy 1985) und die Verhinderung der



Keimwurzelelongation (Karssen 1976, Groot und Karssen 1992, Hilhorst und Downie 1995) gezeigt.

Während der Samenentwicklung finden hauptsächlich anabolische Prozesse statt. Die Hemmung reservemobilisierender Enzyme wie  $\alpha$ -Amylase, Malatsynthase und Isocitratlyase, sowie zellwandabbauender Enzyme wie Endo- $\beta$ -Mannanase durch exogene ABA wurde nachgewiesen (Kermode 1990).

Auch die Chlorophyllbiosynthese in Samen wird durch ABA beeinflusst. So fanden Le Page-Degivry et al. (1987) einen Zusammenhang zwischen ABA-Gehalt und Chlorophyllbiosynthese in Apfeln. Lichtenthaler und Becker (1970) postulierten einen ABA-Einfluss auf die Induktion der Thylakoidbildung und daraus resultierend eine verringerte Isoprenoidbiosynthese. Vivipare Samen immunmodulierter Pflanzen enthielten ebenfalls größere Mengen Chlorophyll als der Wildtyp (Phillips et al. 1997).

#### 1.3.4. Strategien der ABA-Funktionsanalyse

Zur Untersuchung der ABA-Funktion während der Embryogenese werden verschiedene Versuchstrategien eingesetzt. Dazu gehören Untersuchungen isolierter zygotischer Embryonen und somatischer Embryonen. Verglichen wurden Wildtyp, ABA-Biosynthesemutanten und transgene Pflanzen, in denen die Hormonfunktion durch Expression von Einzelketten-Antikörpern immunmoduliert wird. Diese Strategien liefern in unterschiedlichem Umfang Daten über die Embryoentwicklung und besitzen Vor- und Nachteile bezüglich ihrer Anwendbarkeit insbesondere auf frühe Stadien der Embryogenese.

Ein Ansatz ist die *in vitro* Kultur isolierter zygotischer Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Diese Methode erlaubt Variationen des Nährstoff- und Wirkstoffangebotes im Kulturmedium. Es können Aussagen zur Lebensfähigkeit der Embryonen, Speicherproteinakkumulation und zum Übergang zwischen Samenentwicklung und Keimung getroffen werden. Einflüsse des osmotischen Potentials des Kulturmediums, der ABA-Applikation oder eines ABA-Biosyntheseinhibitors können getestet werden (Fischer et al. 1987, Xu et al. 1990, Xu und Bewley 1995). Die Nachteile der Untersuchungen an isolierten zygotischen Embryonen liegen vor allem in der Materialverfügbarkeit. Weiterhin ist der ABA-Gehalt isolierter Embryonen niedriger als *in vivo*, sodass keine Aussagen zur Situation *in planta* gemacht werden können (Kermode 1990, Bewley und Black 1994).

Eine weitere Möglichkeit ist die Untersuchung der ABA-Funktion in somatischen Embryogenesensystemen. Dieser Ansatz sollte Ereignisse in frühen Stadien der Embryogenese simulieren können, da zwischen zygotischen und somatischen Embryonen in vielen Parametern

große Ähnlichkeiten festgestellt wurden (Zimmermann 1993). Auch somatische Embryonen synthetisieren und akkumulieren ABA (Hatzopoulos et al. 1990). Das System erlaubt sowohl die Applikation von Wirkstoffen als auch Mediummodifikationen wie zum Beispiel pH und Osmolarität. Die Embryoentwicklung kann unabhängig von maternalen Einflüssen verfolgt werden. Nachteil des Systems ist, dass trotz großer Ähnlichkeiten auch Unterschiede zur zygotischen Embryogenese bestehen. ABA-Gehalte in somatischen Embryonen sind geringer als in zygotischen Embryonen. Die Biosynthese einiger samenspezifischer Proteine (LEA) und die Reserveproteinakkumulation werden früher angeschaltet und die akkumulierten Mengen sind geringer (siehe auch 1.2.). Somatische Embryonen gehen nicht in einen Ruhezustand über. Obwohl gerade frisch isolierte Mesophyllprotoplasten eine hohe Synchronität zeigen (Dudits et al. 1991), nimmt diese im Verlauf der *in vitro* Kultivierung ab (Zimmermann 1993).

Wie bereits unter 1.3.2. beschrieben, konnten in den letzten Jahren zahlreiche ABA-defiziente Mutanten isoliert werden (Merlot und Giraudat 1997). Durch Untersuchungen definierter Mutanten wurde es möglich, die ABA-Funktion in Pflanzen unabhängig von exogener Wirkstoffapplikation bzw. Biosynthesehemmung durch Inhibitoren zu untersuchen (Koorneef et al. 1998). Als Nachteil der Mutanten ist zu werten, dass gewebespezifische Effekte nicht isoliert untersucht werden können, da der Mutanteneffekt in der ganzen Pflanze wirksam ist. Außerdem sind pleiotrope Effekte zu berücksichtigen, die auf das gestörte Hormonverhältnis zurückzuführen sind (Evans 1984). Der ABA-Gehalt in den defizienten Mutanten ist zwar stark reduziert, dennoch sind immer noch geringe ABA-Mengen vorhanden, die für die Steuerung ABA-regulierter Prozesse ausreichend sein könnten.

Durch die Applikation von ABA-Biosyntheseinhibitoren wie Fluridon kann ABA-Mangel erzeugt werden. Der Vorteil der biochemischen Beeinflussung unter Verwendung von ABA-Biosyntheseinhibitoren ist, dass Zeitpunkt und Dauer der Applikation wählbar sind (Kermode 1990). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Wirkung des Inhibitors, der frühe Schritte der Carotinoidbiosynthese hemmt, auch unspezifische Effekte wie Zerstörung der Chloroplasten im Licht sowie Stoffwechselveränderungen hervorruft (Zeevaart und Creelman 1988).

In jüngerer Zeit wurde durch die Möglichkeit der Immunmodulation eine neue Methode verfügbar. Dabei wird die Verfügbarkeit von ABA in der Zelle durch intrazelluläre Expression eines anti-ABA Einketten-Antikörpers (scFv), der das Phytohormon spezifisch bindet, blockiert (Artsaenko et al. 1995, Phillips et al. 1997). Durch Antikörperbindung wird ABA direkt inaktiviert, während in Mutanten oder nach ABA-Biosyntheseinhibitorapplikation Bio-

syntheseweg oder Funktion von Präkursoren beeinflusst werden (Artsaenko et al. 1999). Da die Expression des Antikörpers in transgenen Pflanzen unter die Kontrolle spezieller Promotoren gestellt werden kann, ist eine zeitliche und räumliche Veränderung der ABA-Verfügbarkeit in der Pflanze möglich. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt somit in der Möglichkeit der gezielten organ- und entwicklungsspezifischen Veränderung der ABA-Verfügbarkeit.

#### 1.4. Zielstellung der Arbeit

Ogleich die Regulation später Prozesse der Embryoentwicklung und -reifung durch ABA gut dokumentiert ist, sind ABA-Einflüsse in der frühen Embryogenese nicht bekannt. Da *in vitro* Embryogenese experimentellen Zugriff auf frühe Embryogenesestadien garantiert, liefert die direkte somatische Embryogenese von *Nicotiana plumbaginifolia* ein geeignetes Experimentalsystem zur Untersuchung der ABA-Funktion in frühen Prozessen der Embryodifferenzierung. Nach Zellteilungsinduktion durch hohe Auxin- und Cytokininkonzentrationen differenzieren *in vitro* kultivierte Mesophyllprotoplasten im moderaten Hormonregime ohne intermediäre Kallusbildung mit relativ hoher Synchronität zu somatischen Embryonen, die zu Ganz-Pflanzen regenerieren. Durch morphogenetische Kriterien und biochemische Parameter kann die Differenzierung zu definierten Embryostadien bei nativem ABA-Gehalt embryogenese-kompetenter Zellen des Wildtyps, bei artifiziellm ABA-Mangel oder nach exogener ABA-Applikation zu den Embryogenesesystemen vergleichend analysiert werden. Artifizieller ABA-Mangel embryogenese-kompetenter Zellen kann gentechnisch durch konstitutive Expression eines anti-ABA-Einzelketten-Antikörpers in transgenen *Nicotiana plumbaginifolia* Pflanzen erzeugt werden, ist genetisch in Zellen der ABA-Biosynthesemutanten von *Nicotiana plumbaginifolia aba1* und *aba2* fixiert oder kann biochemisch durch Applikation des ABA-Biosyntheseinhibitors Fluridon zur *in vitro* Embryogenese produziert werden. Die Effizienz der drei Versuchsstrategien zur artifiziellen Erzeugung von ABA-Mangel ist durch Bestimmung des endogenen ABA-Gehaltes in definierten Zellkulturstadien des Embryogenesesystems zu prüfen. Nach Applikation exogener ABA zu unterschiedlichen *in vitro* Systemen kann der Nachweis der ABA-Funktion durch Normalisierung der Embryodifferenzierung erbracht werden.

Parallele Parameterbestimmungen während der Samenentwicklung ermöglichen Analogieschlüsse zur Entwicklung zygotischer Embryonen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Pflanzenmaterial

*Nicotiana plumbaginifolia* cv. *Viviani* (Np) (Dr. A. Müller, Institut für Kulturpflanzenforschung und Pflanzengenetik (IPK) Gatersleben)

*Nicotiana plumbaginifolia aba1* Mutante (Leydecker et al. 1995) und *aba2-1s (aba2)* Mutante (Marion-Poll et al. 1993) (A. Marion-Poll, Institut National de la Recherche Agronomique Versailles, Frankreich)

#### 2.1.2. Vektoren zur Pflanzentransformation

**pGSGluc1** Spec<sup>r</sup> (Saito et al. 1990)

binärer Vektor Fragmente (*Hind* III) enthaltend aus den Vektoren:

**pRTRA7/3** (Artsaenko et al. 1995)

CaMV35S-Promotor – Leguminsignalpeptid – anti-ABA scFv – c-myc-tag – KDEL – CaMV35S Terminator

**pRTRA15** (Fiedler et al. 1997)

CaMV35S-Promotor – Leguminsignalpeptid – anti-Oxazolon scFv – c-myc-tag – KDEL – CaMV35S Terminator

#### 2.1.3. Bakterien

*Agrobacterium tumefaciens*-Stämme: pGV 2260 in C58C1 (Deblaere et al. 1985)  
EHA 101 in C58 (Hood et al. 1986)

#### 2.1.4. Enzyme

Cellulase “Onozuka R-10” (Serva, Heidelberg), 1%

Macerozym R-10 (Serva), 0,4%

Die Enzyme wurden in der angegebenen Konzentration in K3, 0,5M Saccharose gelöst. Die Enzymlösung wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2µm) und vor Gebrauch 1:1 (v/v) mit dem gleichen Medium verdünnt.

#### 2.1.5. Antibiotika

Ampicillin (Roth, Karlsruhe)

Stammlösung: 10mg ml<sup>-1</sup>, Endkonzentration: 100µg ml<sup>-1</sup>

Carbenicillin (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

Stammlösung:  $25\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $100\mu\text{g ml}^{-1}$

Betabactyl\* (Ticarcillin) (SmithKline Beecham, München)

Stammlösung:  $100\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $250\mu\text{g ml}^{-1}$

Kanamycin (Duchefa)

Stammlösung:  $10\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $50\mu\text{g ml}^{-1}$

Rifampicin (Duchefa)

Stammlösung:  $25\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $100\mu\text{g ml}^{-1}$

Spectinomycin (Duchefa)

Stammlösung:  $50\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $100\mu\text{g ml}^{-1}$  (Agro-Bakterien)

Alle Antibiotika wurden sterilfiltriert.

#### 2.1.6. Pflanzenhormone und andere Wirkstoffe

(RS)-*cis, trans* Abscisinsäure (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA)

Stammlösung:  $0,4\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $0,4\mu\text{g ml}^{-1}$  ( $1,5\mu\text{M}$ ), Lösungsmittel

(LM): Wasser, Anlösen in 1N NaOH

6-Benzylaminopurin (Sigma)

Stammlösung:  $0,4\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $1\mu\text{g ml}^{-1}$  (Blattscheiben), Endkonzentration für Zellkultur siehe 2.2.4., LM: Wasser, Anlösen in 1N HCl

$\alpha$ -Naphthylessigsäure (Sigma)

Stammlösung:  $0,4\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $0,1\mu\text{g ml}^{-1}$  (Blattscheiben), Endkonzentration für Zellkultur siehe 2.2.4., LM: Wasser, Anlösen in 2% KOH

Alle Hormone wurden sterilfiltriert.

Fluridon (1-Methyl-3-Phenyl-5(3-Trifluoromethyl)-Phenyl)4.(1.4)-Pyridinon (Duchefa)

Stammlösung:  $0,33\text{mg ml}^{-1}$ , Endkonzentration:  $0,33\mu\text{g ml}^{-1}$  ( $1\mu\text{M}$ ), LM: Dimethylsulfoxid (DMSO)

#### 2.1.7. Antikörper und Konjugate

anti-c-myc monoklonaler Antikörper 9E10 (Munroe und Pelham 1986)

anti-Maus IgG Antikörper (Kaninchen, Sigma)

anti-hsp17 Antikörper (Dr. R. Manteuffel, IPK Gatersleben)

anti-Tabakglobulin Antikörper (Dr. R. Manteuffel, IPK Gatersleben)

anti-Maus IgG-Peroxidase (POD) Konjugat (Sigma)

anti-Kaninchen-Peroxidase Konjugat (Serva)

anti-Maus IgG-Alkalische Phosphatase (ALP) Konjugat (Boehringer, Mannheim)

anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase Konjugat (Boehringer)

### 2.1.8. Proteinmarker

SeeBlue™ Pre-Stained Standard (Novex, San Diego, USA)

ChemiBlot™ Molecular Weight Markers (Chemicon International, Temecula, USA)

### 2.1.9. Andere Reagenzien und Kits

Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (Roth)

Bio-Rad Protein Assay (BioRad)

“ECL western blotting analysis system” (Amersham, Braunschweig)

Glycerol (Roth)

D-Mannitol (Serva)

Natriumhypochlorit (Roth)

Nitro Blue Tetrazolium (NBT)/ 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat, p-Toluidinsalz (BCIP) (Schleicher und Schüll, Dassel)

p-Nitrophenylphosphate (Boehringer)

Rinderserumalbumin (Biogene, Berlin)

Saccharose (GIBCO BRL, Paisley, UK)

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)

Tris HCl (GIBCO BRL)

Triton X-100 (Roth)

Tween 20 (Serva)

ZincFormal-Fixx (Life Science International, Frankfurt)

### 2.1.10. Medien

CPY-Medium: 0,1% Hefeextrakt, 0,5% Trypton, 0,5% Saccharose,  
2mM MgSO<sub>4</sub> (pH 7,2)

CBY-Medium: CPY, 2% Bactoagar

Murashige/Skoog-Flüssigmedium (MS-Flüssigmedium, Murashige und Skoog 1962):

4,405g l<sup>-1</sup> MS (Mikro- und Makroelemente inklusive Vitamine,  
Duchefa), 3% Saccharose (pH 5,8)

MS Festmedium: MS Flüssigmedium, 1% Agar (pH 5,8)

1/4 MS: 1/4 MS (Mikro- und Makroelemente), ohne Saccharose (pH 5,8)

OoW-Medium (modifiziertes MS-Medium, Tewes et al. 1991)

Zusammensetzung:	CaCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	661,0mg l <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	740,0mg l <sup>-1</sup>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0mg l <sup>-1</sup>
	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8mg l <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,3mg l <sup>-1</sup>

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6,2mg l <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3mg l <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	8,6mg l <sup>-1</sup>
KJ	0,8mg l <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	25,0µg l <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	25,0µg l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	250,0µg l <sup>-1</sup>
m-Inosit	100,0mg l <sup>-1</sup>
Thiamin-HCl	10,0mg l <sup>-1</sup>
Nicotinsäure	1,0mg l <sup>-1</sup>
Pyridoxin-HCl	1,0mg l <sup>-1</sup>

Succinat 1M, pH 5,8, sterilfiltriert:

Bernsteinsäure	118,0g l <sup>-1</sup>
KOH	112,0g l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	53,0g l <sup>-1</sup>

KNO<sub>3</sub> 1M, sterilfiltriert

0oW-Flüssigmedium: 3% Saccharose, 0,2 oder 0,4M Mannit, pH 5,8

0oW-Festmedium: 1% Saccharose, 1% Agar, 20mM Succinat,  
10mM KNO<sub>3</sub>, pH 5,8

K<sub>3</sub>-Medium (Nagy und Maliga 1976, modifiziert durch A. Tewes, IPK Gatersleben)

Zusammensetzung:	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	240,0mg l <sup>-1</sup>
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150,0mg l <sup>-1</sup>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	130,0mg l <sup>-1</sup>
	KNO <sub>3</sub>	2400,0mg l <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	250,0mg l <sup>-1</sup>
	CaCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	880,0mg l <sup>-1</sup>
	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8mg l <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,3mg l <sup>-1</sup>
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	3,0mg l <sup>-1</sup>
	MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	10,0mg l <sup>-1</sup>
	ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	2,3mg l <sup>-1</sup>
	KJ	77,0µg l <sup>-1</sup>
	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	25,0µg l <sup>-1</sup>
	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	25,0µg l <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	250,0µg l <sup>-1</sup>
	m-Inosit	100,0mg l <sup>-1</sup>
	Thiamin-HCl	10,0mg l <sup>-1</sup>
	Nicotinsäure	1,0mg l <sup>-1</sup>
	Pyridoxin-HCl	1,0mg l <sup>-1</sup>
	D-Xylose	250,0mg l <sup>-1</sup>
	Bromkresolpurpur	2,0mg l <sup>-1</sup>

K <sub>3</sub> -Flüssigmedium 1:	0,5M Saccharose
K <sub>3</sub> -Flüssigmedium 2:	3% Saccharose, 0,4M Mannit, pH 5,8 (vor Verwendung mit steriler 2% KOH eingestellt)

Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Die entsprechenden Hormone und Antibiotika sowie Succinat und KNO<sub>3</sub> wurden nach Abkühlung auf 60°C zugesetzt.

### 2.1.11. Puffer und Lösungen

Blocklösung:	Roti-Block (Roth), 1:10 (v/v ) mit Wasser verdünnt
Carbonatpuffer:	50mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 9,6
Globulinextraktionspuffer:	PBS-Puffer, 0,5M NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF
Phosphate gepufferte Saline (PBS):	8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150mM NaCl, pH 7,5
Proteinextraktionspuffer I:	50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (v/v) Mercaptoethanol, pH 7,6
Proteinextraktionspuffer II :	PBS-Puffer, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (v/v) Mercaptoethanol, pH 7,5
SDS-Probenpuffer:	10% Glycerol, 2% SDS, 5% Mercaptoethanol, 62,5mM Tris, Bromphenolblau
Sammelgelpuffer:	100ml: 6,06g Tris-HCl, 0,4g SDS, pH 6,8
SDS-Elektrophoresepuffer:	1l: 3,03g Tris-HCl, 1g SDS, 14,4g Glycerol, pH 8,4
Trenngelpuffer:	100ml: 18,16g Tris-HCl, 0,4g SDS, pH 8,8
Transferpuffer:	25mM Tris-HCl, 192mM Glycin, 20% Methanol, 0,1% SDS
Tris/Saline:	10mM Tris-HCl, 154mM NaCl
Tris/Saline/Triton:	20mM Tris-HCl, 154mM NaCl, 0,5% Triton
W5-Puffer:	125mM CaCl <sub>2</sub> , 154mM NaCl, 54mM KCl, 5,55mM Glukose, pH 5,8; autoklavieren

### 2.1.12. Andere Materialien und Geräte

ECL-Filme Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> (Amersham)  
 Filme (Fujichrome Velvia, Tokyo, Japan)  
 Filterpapier Gel Blotting Paper GB003 (Schleicher und Schüll)  
 Historesin (Leica, Heidelberg)  
 Mikrotiterplatten Falcon 3915 Pro-bind<sup>TM</sup> Assay Plate (Becton Dickinson, New Jersey, USA)  
 Nitrocellulose-Membranen BA 85 (Schleicher und Schüll)  
 Petrischalen (Greiner, Frickenhausen)  
 Sterilfilter (0,2µm, Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt)

Axioskop (Zeiss, Oberkochen), MC 80 Kamerazubehör  
 Cytoplast Telaval 31 (Zeiss)



ELISA Reader Dynatech MR 7000 (Dynex Technologies, Denkendorf)

Homogenisator RW 16 Basic (IKA Labortechnik, Stauffen)

Mikrotom (Leica)

Pflanzenkulturschrank Persival Scientific I-35LLVL (CLF Analytische Laborgeräte, Emersacker)

Wasserbad Haake W19/DC1 (Haake, Karlsruhe)

Zentrifugen: Biofuge Fresco (Heraeus, Osterode)

Biofuge 22R, Schwingrotor HAS 4.100 (Heraeus)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Anzucht- und Wachstumsbedingungen für Pflanzen

Pflanzenkulturschrank	21°C, 16h Licht
Pflanzenkulturraum	22°C, 16h Licht
Phytokammer	18°C, 16h Licht, 95% Luftfeuchtigkeit
Gewächshaus	16h Licht

### 2.2.2. Pflanzentransformation

Die Transformation von *Nicotiana plumbaginifolia* Wildtyp-Pflanzen erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer (Conrad et al. 1998). Blattstücke *in vitro* kultivierter Pflanzen wurden steril entnommen, 48h auf MS-Mediumplatten mit Naphthylessigsäure (NAA) und 6-Benzylaminopurin (BA) inkubiert und mit Agrobakterien, die das entsprechende Konstrukt enthielten, durch Benetzen infiziert. Die Agrobakterien wurden in 5-10ml CBY-Medium mit den entsprechenden Antibiotika für 48h (28°C, Schütteln) vorkultiviert und 1:50 in flüssigem MS-Medium verdünnt. Nach 48h Kokultivierung wurden die Blattstücke auf MS-Medium mit NAA, BA, Kanamycin (Kan) und Ticarcillin (Ti) transferiert. Nach 4 Wochen wurden die Explantate auf frisches Medium umgesetzt und bis zur Sprossbildung im Dunkeln im Pflanzenanzuchtraum gehalten. Die Wurzelbildung an Sprossen wurde durch Umsetzen auf hormonfreies Medium und durch Belichtung gefördert. Die Pflanzen wurden ins Gewächshaus oder in die Phytokammer überführt.

### 2.2.3. Pflanzenanzucht und -kultivierung

Samen der einzelnen Linien wurden in Natriumhypochlorit (12%, 1:5,6 verdünnt) 5min sterilisiert, mit ausreichend sterilem destilliertem Wasser gewaschen und auf ¼ MS-Platten mit oder ohne Antibiotikum ausgelegt. Die Keimung erfolgte im Pflanzenkulturschrank. Die Keimlinge wurden entweder auf modifiziertem MS-Medium (0oW siehe 2.1.10.) im Pflanzen-

anzuchtraum weiterkultiviert oder in der Phytokammer auf Erde angezogen.

#### **2.2.4. Segregationsanalyse**

Die Samen der TG1-Generation wurden einer Segregationsanalyse unterzogen. Dazu wurden die Samen der transgenen Linien wie unter 2.2.3. beschrieben auf Kan-haltigem Medium angekeimt und nach 8 Wochen die Segregation durch Bestimmung des Verhältnisses zwischen kanamycin-resistenten und kanamycin-sensitiven Keimlingen ermittelt.

#### **2.2.5. *in vitro* Kultivierung von Protoplasten**

(Protokoll A. Tewes, IPK Gatersleben)

##### **2.2.5.1. Protoplastierung**

An der Oberfläche verwundete Blätter *in vitro* kultivierter Pflanzen wurden 2h auf 15mM CaCl<sub>2</sub> inkubiert. Die Verdauung der Zellwände erfolgte 16h bei 21°C in Cellulase und Maze-rozym haltigem K<sub>3</sub>-Medium (0,5M Saccharose). Danach wurde die Zellsuspension 1h vorsichtig geschüttelt. Die Protoplasten wurden mittels eines Siebes (80µm) von unverdaulichem Blattmaterial getrennt und durch Zentrifugation (10min bei 76xg, 15°C) gesammelt. Die flotierenden Protoplasten wurden abgenommen und 2x mit W5-Puffer (10ml, 5ml) gewaschen. Die gereinigten Protoplasten wurden in K<sub>3</sub>-Medium (2mg l<sup>-1</sup> NAA, 1mg l<sup>-1</sup> BA) aufgenommen, gezählt (Thoma-Zählkammer) und je 6 ml Protoplastensuspension in einer Dichte von 7x10<sup>4</sup> Zellen ml<sup>-1</sup> ausplattiert.

##### **2.2.5.2. Somatische Embryogenese**

Nach 3 Tagen erfolgte eine 1:1 Verdünnung der *in vitro* kultivierten Protoplasten mit K<sub>3</sub>-Medium (0,02mg l<sup>-1</sup> NAA, 0,2mg l<sup>-1</sup> BA). Am 6. Tag der *in vitro* Kultivierung wurden die Zellen für den Mediaustausch in sterile Zentrifugenröhrchen überführt, der Überstand abpipettiert und die sedimentierten Zellen in frischem K<sub>3</sub>-Medium (0,02mg l<sup>-1</sup> NAA, 0,2mg l<sup>-1</sup> BA, 2mM Succinat) aufgenommen. Weitere Verdünnungen der *in vitro* Kultur mit 0oW-Medium (0,02mg l<sup>-1</sup> NAA, 0,2mg l<sup>-1</sup> BA, 10mM Succinat, 0,4M Mannit) erfolgten am 10. und am 14. Tag. 17 Tage nach Kulturbeginn wurde mit 0oW-Medium (0,02mg l<sup>-1</sup> NAA, 0,2mg l<sup>-1</sup> BA, 10mM Succinat, 0,2M Mannit) verdünnt. Das Verhältnis der Verdünnung der *in vitro* Zellkultur war abhängig von ihrem Entwicklungsstand. Die Überführung der Zellstrukturen auf Festmedium (0oW-Medium, 1mg l<sup>-1</sup> BA, 20mM Succinat, 10mM KNO<sub>3</sub>, 1% Saccharose) erfolgte bei guter Entwicklung der Kultur nach 21 Tagen der *in vitro*-Kultivierung. Bei ersten

Anzeichen von Ergrünung wurden die Strukturen auf hormonfreies Festmedium transferiert.

Allen Kulturen wurde Ticarcillin zugesetzt. Die transgenen Linien wurden in Gegenwart von Kanamycin kultiviert. Die Zugabe von ABA erfolgte ab 0., 3., 6. oder 10. Tag der *in vitro* Kultivierung. Der ABA-Biosyntheseinhibitor Fluridon wurde ab 10. Tag verwendet. Angaben im Text beziehen sich immer auf den jeweiligen Kulturtag, nicht auf Tage nach der Wirkstoffzugabe.

#### **2.2.5.3. Bestimmung der Regenerationseffizienz**

Zur Bestimmung der Regenerationseffizienz wurde am 21. Kulturtag die Anzahl globulärer Strukturen in 0,5ml der *in vitro* Zellkultur lichtmikroskopisch bestimmt. Die ermittelte Anzahl wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsregimes (siehe 2.2.5.2.) ins Verhältnis zur Ausgangszelldichte ( $7 \times 10^4$  Protoplasten  $\text{ml}^{-1}$ ) gesetzt. Die Regenerationseffizienz wurde in Prozent angegeben.

#### **2.2.5.4. Gewinnung von Zellkulturmaterial für biochemische Untersuchungen**

Protoplasten wurden nach dem 2. Waschschrift in W5-Puffer (siehe 2.2.5.1.) durch Zentrifugation gesammelt. Zellen am 3. Kulturtag wurden 1:1 mit W5-Puffer verdünnt und nach Zentrifugation bei 156xg gewonnen. Zellkulturmaterial nach 6, 10, und 14 Tagen der *in vitro* Kultivierung wurde durch Sedimentation erhalten. Globuläre Strukturen am 21. Kulturtag wurden durch Filtration vom Medium getrennt. Die Strukturen des 14. und 21. Kulturtag wurden 2x mit W5-Puffer gewaschen. Alle Proben wurden nach Frischgewichtsbestimmung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.6. Samengewinnung**

Zur Isolation von Samen unterschiedlicher Stadien wurden in ca. 2cm großen Blüten die Antheren entfernt. Nach 2 Tagen wurden die Blüten mit dem Pollen der gleichen Pflanze bestäubt (0 DAP). Samenkapseln wurden nach 4, 8, 12, 16, 20 und 24 DAP geerntet. Die Samen wurden in flüssigen Stickstoff überführt und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.7. Hitzeschock-Behandlung**

Mit Protoplasten und Zellkulturstadien wurden Hitzeschockexperimente durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss von ABA auf die Hitzeschockantwort getestet.

Protoplasten wurden, wie unter 2.2.5.1. beschrieben, isoliert und in K3-Medium ( $0,02\text{mg l}^{-1}$

NAA, 0,2mg l<sup>-1</sup> BA) aufgenommen. Folgende Proben wurden vorbereitet: frisch isolierte Protoplasten, Protoplasten 24h ohne ABA, 24h 1,5µM ABA und 21h ohne ABA + 3h 1,5µM ABA. Die Inkubation erfolgte im Pflanzenkulturschrank. Für die Stressbehandlung wurden die Proben 15min bei 41°C im Wasserbad, 3h bei 21°C im Pflanzenkulturschrank und 1,5h bei 41°C (Wasserbad) inkubiert.

Zum Nachweis der Hitzestressantwort in Abhängigkeit von der Entwicklung wurden Zellkulturproben differenter Entwicklungsstadien (3, 6, 10, 14 und 21 Tage der *in vitro* Kultivierung) wie folgt stressbehandelt: 15min 41°C (Wasserbad), 3h 21°C (Pflanzenkulturschrank), 3h 41°C (Wasserbad).

Der 21. Kulturtag wurde für die Untersuchung des Einflusses von ABA auf die Stressantwort gewählt. Die ABA-Behandlung erfolgte wie für Protoplasten und die Hitzestressbehandlung wie für Zellkulturstadien beschrieben.

In allen Fällen wurde eine unbehandelte Probe als Kontrolle mitgeführt.

## **2.2.8. Proteinextraktion, -auftrennung und -nachweis**

### **2.2.8.1. Proteinextraktion**

Alle zur Extraktion verwendeten Proben wurden mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert.

Blattmaterial wurde im Verhältnis 1:4 (w/v) mit Proteinextraktionspuffer I extrahiert, 30min geschüttelt und 8min 13700xg zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals extrahiert und Überstand 1 und 2 vereinigt.

Zellkulturmaterial wurde 1:1 (w/v) mit Proteinextraktionspuffer I extrahiert. Im weiteren wurde verfahren wie für Blattmaterial beschrieben.

Für den Nachweis von hsp17-Proteinen in Protoplasten wurden diese in SDS-Probenpuffer im Verhältnis von 1:3 (w/v) extrahiert, die Extrakte 30min geschüttelt, zentrifugiert (8min 13700xg) und 3min bei 100°C gekocht.

Für die Untersuchung der Akkumulation von hsp17, Tabakglobulinen und anti-ABA scFv während der Samenentwicklung wurden Samen unterschiedlicher Entwicklungsstadien im Verhältnis 1:10 (w/v) in Proteinextraktionspuffer II extrahiert.

Die Tabakglobulinextraktion erfolgte unter Verwendung des Globulinextraktionspuffers im Verhältnis 1:200 (w/v) unter Zusatz von PolyclarAT.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte erfolgte nach Bradford (1976).

### 2.2.8.2. Gelelektrophorese und Western Blot

Proteinlösungen entsprechender Konzentrationen (1-20µg) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 3min auf 100°C erhitzt. Die verschiedenen Proteinextrakte bestimmter Proteinkonzentration wurden elektrophoretisch auf einem 12,5%igen Polyacrylamidgel (Laemmli 1970) aufgetrennt und anschließend unter Verwendung von Transferpuffer elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde 4h bei Raumtemperatur mit Roti-Block-Lösung abgesättigt und anschließend kurz mit Tris/Saline ohne Triton gewaschen. Die Inkubationszeit für den primären Antikörper betrug 1h. Als primäre Antikörper wurden eingesetzt: anti-c-myc (Maus, Verdünnung: 1:40), anti-hsp17 (Maus bzw. Kaninchen, Verdünnung: 1:1000) und anti-Tabakglobulin (Kaninchen, Verdünnung 1:1000 für Samentabakglobulin). Die Antiserumverdünnung erfolgte in Tris/Saline 1% BSA, 0,5% Tween 20. Im Anschluß wurde die Membran 3x 10min in Tris/Saline/0,5% Triton und 1x 10min in Waschpuffer ohne Detergenz gewaschen. Für den Proteinnachweis mittels Chemilumineszenz wurden anti-Maus-POD (1:10000) oder anti-Kan-POD (1:3000 in Tris/Saline + 1% BSA + 0,05% Tween 20) als sekundäre Antikörper eingesetzt. Nach Wiederholung der Waschschrte wurde das markierte Protein mit Hilfe des ECL-Systems nach Entwicklung des Filmes nachgewiesen. Für den kolorimetrischen Nachweis wurden die entsprechenden ALP-Konjugate in Kombination mit dem Substrat NBT/BCIP verwendet.

Zur semiquantitativen Bestimmung des anti-ABA scFv-Gehaltes in Zellstrukturen differenter Entwicklungsstadien wurde gereinigter scFv (Conrad et al. 1998) zur Erstellung einer Eichkurve im linearen Konzentrationsbereich verwendet. Dabei wurde der Schwärzungsgrad des Signals auf dem Film unter Verwendung des TINA-Programms (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) zur Ermittlung der Eichkurve verrechnet und die entsprechenden scFv-Quantitäten der Probenextrakte interpoliert.

### 2.2.9. ABA-ELISA

Für die quantitative Bestimmung des ABA-Gehaltes wurde Probenmaterial im Verhältnis 1:50 mit 80%igem Aceton (Blätter, Samen) bzw. 1:4 mit 100%igem Aceton (Zellkulturmaterial) extrahiert. Die experimentelle Durchführung des ABA-ELISA ist bei Artsaenko et al. (1995) beschrieben. Zum Beschichten der Mikrotiterplatten wurde ein Kaninchen-anti-Maus IgG Antikörper, verdünnt 1:5000 in Carbonatpuffer, verwendet und die Platten 16h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser wurde der Maus anti-ABA monoklonale Antikörper 15-I-C5 (10µg ml<sup>-1</sup> verdünnt in PBS/0,5% Tween20) für 16h (4°C) zugegeben.

Die Platte wurde 3x mit Wasser gewaschen und anschließend Proben und definierte Konzentrationen einer Standard ( $\pm$ ) cis,trans-ABA-Lösung (1-50ng) sowie ABA-ALP-Konjugat (verdünnt 1:666 in PBS/0,5% Tween20) aufgetragen. Nach 16h (4°C) Inkubation wurde 3x mit Wasser gewaschen. Als Substrat für die Enzymreaktion wurde p-Nitrophenylphosphat ( $1\text{g l}^{-1}$  in Carbonatpuffer) in die Vertiefungen gegeben und nach 1h Inkubation bei 37°C die Absorption bei 405nm am Mikrotiterplattenmeßgerät Dynatech MR 7000 vermessen. Als Standard wurden Dreifachproben von 1-50ng ABA auf jeder Platte mitgeführt.

#### **2.2.10. Chlorophyll- und Carotinoidanalyse**

Blatt-, Samen- und Zellkulturmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und 100mg Homogenat im gefrorenen Zustand eingewogen. Zellkulturmaterial früher Stadien (0d – 21d) wurde direkt mit dem Extraktionsmittel homogenisiert. Extrahiert wurde mit 1ml (Blattmaterial), 0,6ml (Zellkulturmaterial) oder 0,4ml (Samenmaterial) Aceton (4°C, 100% +  $10\mu\text{M}$  KOH) in mehreren Extraktionsschritten. Die Extrakte wurden zentrifugiert (5min bei  $13700\times g$ , 4°C), die Überstände vereinigt und nochmals zentrifugiert (10min,  $13700\times g$ , 4°C). Die Chlorophyllgehaltsbestimmung erfolgte am Beckmann Spektrophotometer. Die Carotinoide wurden mittels HPLC aufgetrennt (Kruse et al. 1995).

#### **2.2.11. Histologische Untersuchungen**

Zur lichtmikroskopischen Evaluierung der Ultrastruktur von Zellstrukturen später Stadien der somatischen Embryogenese wurden embryogene Strukturen in ZincFormal Fixx (4h RT, davon 1h Vakuumentlüftung, 12h 4°C) fixiert. Danach wurden die Zellstrukturen in einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend bei 50%, jeweils 1h pro 10%-Stufe entwässert. Die Proben wurden anschließend nach Vorschrift des Herstellers in Historesin eingebettet. Die Schnitte (Dicke  $5\mu\text{m}$ ) wurden mit Toluidinblau gefärbt und anschließend im Lichtmikroskop analysiert und fotografiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Transgene Pflanzen mit stabiler konstitutiver scFv-Antikörperexpression

Durch Immunmodulation der ABA-Funktionen konnte in transgenen *Nicotiana tabacum* Pflanzen mit konstitutiver anti-ABA scFv-Antikörperexpression ein veränderter Phänotyp erzeugt werden (Artsaenko et al. 1995). Die transgenen Pflanzen zeigten typische ABA-Mangelsymptome. Sie welkten unter Gewächshausbedingungen, hatten kleinere wellige Blätter, wiesen gestörte Apikaldominanz auf und zeigten verändertes Seneszenzverhalten (Artsaenko 1996). An transgenen Pflanzen mit samenspezifischer Expression des anti-ABA scFv-Antikörpers wurden Anomalien der Samenentwicklung gepaart mit Viviparie während der späten Samenentwicklung nachgewiesen (Phillips et al. 1997). Pflanzen mit hoher konstitutiver anti-ABA scFv-Expression bildeten zum Teil keine Samen aus. Vermutlich war die Samenentwicklung vollständig gestört. Die Samenkeimung war ebenfalls beeinflusst (Artsaenko 1996).

Um den Einfluss von ABA auf frühe Prozesse der Embryogenese zu untersuchen, wurden transgene Pflanzen mit konstitutiver anti-ABA scFv-Expression erzeugt, die das Ausgangsmaterial für die Etablierung somatischer Embryogenese von *Nicotiana plumbaginifolia* bildeten. Für die Herstellung dieser transgenen Pflanzen wurde die Expressionskassette des Vektors pRTRA7/3 (Artsaenko et al. 1995) verwendet. Die gentechnisch veränderten Pflanzen wurden mit RAP bezeichnet. Dabei bewirkt der CaMV 35S-Promotor eine ubiquitäre Expression in allen Geweben. Die N-terminale Signalpeptidsequenz vor dem anti-ABA scFv-Strukturgen führt zum Transport des transgenen Proteins in das endoplasmatische Retikulum. Die C-terminale KDEL-Sequenz bewirkt als ER-Retentionssignal Akkumulation des Transgenproduktes im ER. Der c-myc-Tag wird zum Nachweis des Fremdproteins in der Pflanze genutzt.

Durch Western Blot Analysen von Proteinextrakten aus Blättern der Primärtransformanten (Tab. 1) konnte das anti-ABA scFv in allen Pflanzen nachgewiesen werden, wobei die Höhe der Expression variierte (Daten nicht gezeigt). Im Unterschied zu *Nicotiana tabacum* RAP-Pflanzen, in denen der anti-ABA scFv-Antikörperanteil am extrahierten Protein zwischen 0,4 und 6,8% betrug (Conrad und Fiedler 1998), akkumulierten *Nicotiana plumbaginifolia* Pflanzen (Primärtransformanten) maximal 1,3% anti-ABA scFv am extrahierten Protein. Transgene *Nicotiana plumbaginifolia* Pflanzen zeigten wie *Nicotiana tabacum* RAP-Pflanzen (Artsaenko et al. 1995) einen welkenden buschigen Phänotyp (Abb. 2). Pflanzen mit einem Fremdproteinanteil um 1% des extrahierten Proteins waren selbst unter Phytokammerbedingungen nur sehr schwer zu kultivieren und produzierten keine oder nur wenige Samen.

**Tab. 1.** Anzahl der transgenen Pflanzen in der TG0- (Primärtransformanten), TG1- und TG2-Generation. TG0- bzw. TG1-Linien stellen die Anzahl der Pflanzen dar, deren Samen zur Anzucht der Pflanzen der jeweils folgenden Generation verwendet wurden.

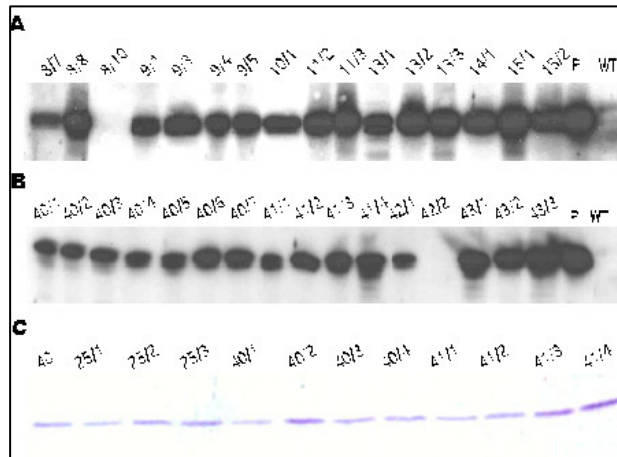
Transgene Pflanzen		RAP	Np9
Konstrukt		pRTRA7/3 (Artsaenko et al. 1995)	pRTRA15 (Fiedler et al. 1997)
Promotor		CaMV 35S	CaMV 35S
scFv-Antikörper		anti-ABA	anti-Oxazolone
TG0		110	45
TG1		116	29
	TG0-Linien	29	6
TG2		61	14
	TG1-Linien	2	2



**Abb. 2.** Phänotypischer Vergleich zwischen *Nicotiana plumbaginifolia* Wildtyp-Pflanze (WT) und transgener RAP-Pflanze (RAP). Die transgene Pflanze zeigt eine deutlich veränderte Apikaldominanz und kleinere wellige Blätter.

In der TG1-Generation konnten in einigen Fällen für die Nachkommen einer Primärtransformante ähnliche Expressionshöhen nachgewiesen werden, während andere Linien eine erhebliche Instabilität der Transgenexpression aufwiesen (Abb. 3). Für die Segregationsanalysen wurden 6 Linien der ersten Gruppe ausgewählt und durch Ermittlung des Verhältnisses von kanamycin-resistenten zu kanamycin-sensitiven Keimlingen 2 potentiell homozygote Pflanzen selektiert (Tab. 2).





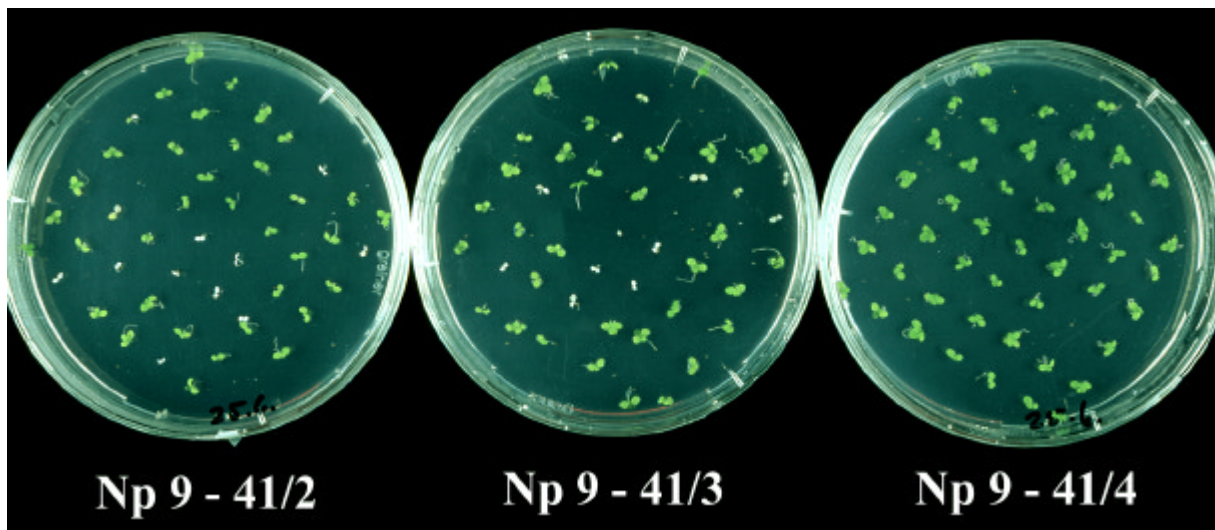
**Abb. 3.** Expressionsnachweis des Transgens in Pflanzen der TG1-Generation unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. **A, B:** Expression des anti-ABA scFv in Blättern der Nachkommen der Primärtransformanden RAP 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 40, 41, 42 und 43. Samenextrakte von anti-ABA scFv exprimierenden Pflanzen wurden als Positivkontrolle (P), Wildtyp Blattextrakte als Negativkontrolle (WT) verwendet. **C:** Expression des anti-Oxazolon scFv in Blättern von Nachkommen der Primärtransformanden 25, 40 und 41. Der Blattextrakt der Primärtransformante Np9-40 wurde als Positivkontrolle (40) verwendet. 15µg Protein pro Bahn wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung des monoklonalen anti-myc-Antikörpers und einem anti-Maus IgG-POD Konjugat (A, B) mittels Chemilumineszenz oder kolorimetrisch unter Verwendung eines anti-Maus IgG ALP-Konjugates (C).

Wie durch Western Blot Analyse von Blatt- und Zellkulturproteinextrakten nachgewiesen werden konnte, war die anti-ABA scFv Expression in Nachkommen der potentiellen Homozygoten RAP13/2 instabil. Der scFv-Gehalt in den einzelnen Pflanzen war sehr unterschiedlich. Der anti-ABA scFv-Gehalt nahm nach mehreren *in vitro* Kulturpassagen ab oder war nicht mehr nachweisbar. Entsprechende Zellkulturstadien der *in vitro* Embryogenese lieferten keine reproduzierbaren Daten der scFv-Akkumulation (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu erwies sich die Linie RAP40/7 als stabil. Der rekombinante Antikörper wurde sowohl in allen Nachkommen und allen *in vitro* kultivierten Pflanzen nach mehrmaliger Passage (Abb. 8) als auch in Zellkulturstadien der somatischen Embryogenese (3.5.1.) stabil akkumuliert. Deshalb wurde diese Linie für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Um durch Transgenexpression verursachte Effekte unabhängig von der spezifischen Antikörperaktivität zu erfassen, wurden transgene Pflanzen hergestellt, die einen Einzelketten-Antikörper gegen das nichtpflanzliche Hapten Oxazolon unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimierten. Analog dem anti-ABA scFv bestand die Expressionskassette aus CaMV 35S-Promotor, Signalpeptid, scFv-Sequenz, KDEL-ER-Retentionssignal und c-myc-Tag. Aus den überwiegend hochexprimierenden Primärtransformanden (Tab. 1) wurden

**Tab. 2.** Selektion potentiell homozygoter Pflanzen mittels Segregationsanalyse

Transgene Pflanzen	TG0-Pflanze	TG1-Pflanze/ Anzahl Samen/ <i>Segregation</i>				Potentielle Homozygote
			Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	
<b>RAP</b>	<b>13</b>	1 / 100 / 2,1:1	200 / 2,1:1			<b>13/2</b>
		2 / 100 / 95:1	300 / 4,9:1			
		3 / 100 / 3,6:1	200 / 3,3:1			
	<b>40</b>	1 / 100 / 2,6:1				<b>40/7</b>
		2 / 100 / 4,2:1				
		3 / 100 / 2,0:1	200 / 3,4:1			
		4 / 100 / 2,7:1	200 / 2,9:1			
		7 / 100 / -	300 / 46,5:1	100 / -		
		7/1 / 100 / -				
		7/2 / 100 / -				
<b>Np9</b>	<b>41</b>	1 / 100 / 2,2:1	100 / 4,2:1			<b>41/4</b>
		2 / 100 / 3,7:1	100 / 3,2:1			
		3 / 100 / 3,0:1	100 / 2,8:1			
		4 / 100 / -	100 / -			
		5 / 100 / -	100 / -			<b>41/5</b>



**Abb. 4.** Segregationsanalyse der transgenen Linie Np9-41. Die Samen der TG1-Generation spalten entweder im Verhältnis von 3:1 in kanamycin-resistente und kanamycin-sensitive Keimlinge auf (3 = 1 homozygot transgene Pflanzen + 2 heterozygot transgene Pflanzen, 1 = homozygot nicht transgene Pflanzen) oder die Keimlinge sind alle kanamycin-resistent und die TG1-Pflanze ist somit potentiell homozygot. Die Nachkommen der Pflanzen Np9-41/2 und 3 spalteten im Verhältnis 3:1 auf, während die Nachkommen der Pflanze Np9-41/4 alle kanamycin-resistent waren.

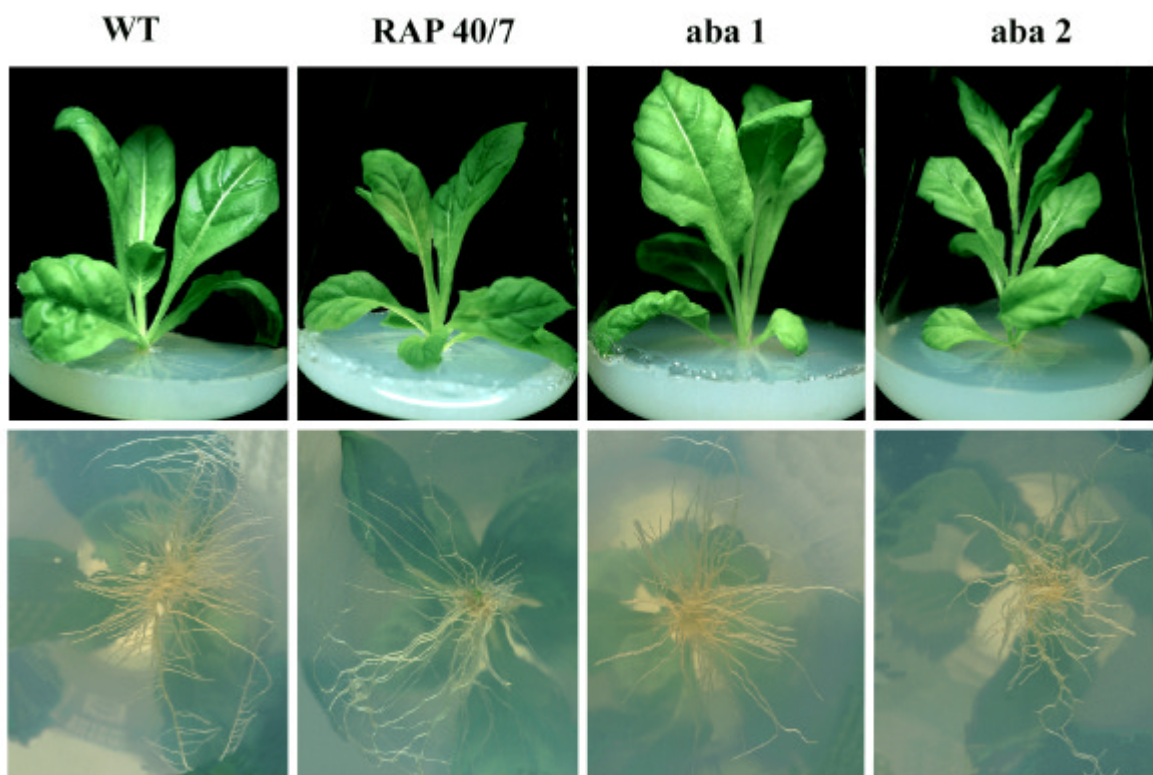
6 Linien für die Selektion homozygoter Linien eingesetzt und zwei potentiell Homozygote gefunden (Tab. 2, Abb. 4).

### 3.2. Charakterisierung *in vitro* kultivierter Pflanzen des Wildtyps, der transgenen Linien Np9-41/4 und RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten

#### 3.2.1. Morphogenetische Charakterisierung

Synchronität und Effizienz der Zelldifferenzierung während der somatischen Embryogenese hängen maßgeblich von der Qualität des Blattmaterials ab, das für die Isolierung von Protoplasten verwendet wird. Um möglichst homogenes Blattmaterial einsetzen zu können, wurden transgene Pflanzen der selektierten homozygoten Linien sowie des Wildtyps und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* steril unter *in vitro* Gewebekulturbedingungen angezogen und passagiert.

Steril ausgelegte Samen des Wildtyps keimten nach ungefähr 20 Tagen, während Samen der transgenen Linie RAP40/7 bereits nach 11 bis 12 Tagen und Samen der ABA-Biosynthesemutante *aba1* bzw. *aba2* nach 6-15 Tagen bzw. nach 8 Tagen keimten.



**Abb. 5.** Phänotypischer Vergleich zwischen *in vitro* kultivierten Pflanzen des Wildtyps, der transgenen Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* im Alter von 4 Wochen. Die anti-ABA-scFv exprimierende Linie zeigt wie auch *aba1* und *aba2* ein verändertes Wachstumsverhalten im Spross- und im Wurzelbereich, die Hauptwurzel fehlt.

*In vitro* kultivierte anti-Oxazonon scFv exprimierende Pflanzen der Linie Np9-41/4 unterschieden sich weder im Keimungsverhalten noch phänotypisch vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

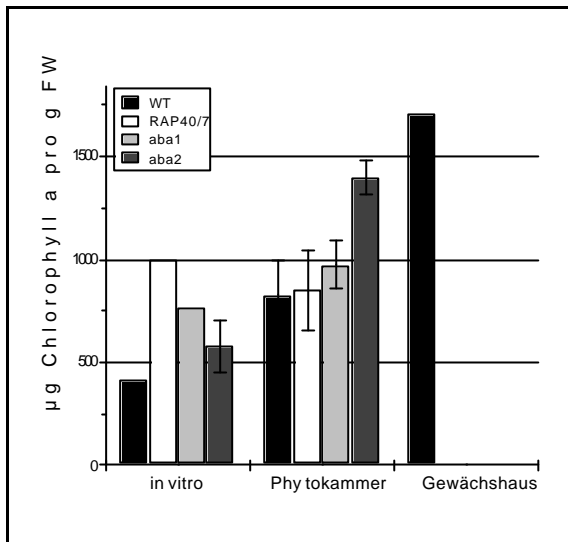
Im Gegensatz dazu zeigten transgene Pflanzen, die den anti-ABA scFv-Antikörper konstitutiv exprimierten, deutliche morphologische Veränderungen. Im Vergleich zum Wildtyp hatten sie kleinere Blätter, die Hauptwurzel fehlte. Nach etwa 4 Wochen begannen RAP40/7-Pflanzen aus dem Rosettenstadium auszuwachsen (Abb. 5). Während *aba1*-Pflanzen in abgeschwächter Form einen ähnlichen Phänotyp wie RAP-Pflanzen aufwiesen, war dieser bei *aba2* Pflanzen noch deutlicher ausgeprägt.

### 3.2.2. Biochemische Charakterisierung

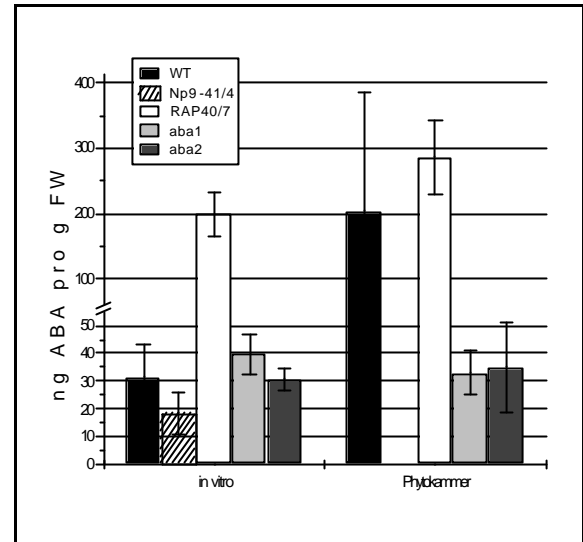
Der Phänotyp der Pflanzen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten ließ Differenzen im Pigmentgehalt im Vergleich zum Wildtyp vermuten. Die Bestimmung der Chlorophyll- und Carotinoidgehalte mittels HPLC-Analyse bestätigte diese Beobachtung. Blätter der Pflanzen der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* sowie der transgenen Linie RAP40/7 enthielten deutlich höhere Mengen an Chlorophyll a als der Wildtyp (Abb. 6). Unter Phytokammerbedingungen produzierten *aba1* und *aba2* große Mengen Chlorophyll a, während sich Wildtyp- und RAP40/7-Pflanzen kaum unterschieden. Ähnliche Tendenzen waren auch für die Carotinoidgehalte nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Wie bereits durch Marin et al. (1996) gezeigt, war der Zeaxanthinanteil am Gesamtcarotinoid-Gehalt in *aba2*-Pflanzen hoch und betrug unter allen Anzuchtbedingungen zwischen 24 und 51%.

Weiterhin wurde das Pflanzenmaterial durch Bestimmung des ABA-Gehaltes charakterisiert. Die ABA-Gehalte in Blättern *in vitro* kultivierter Pflanzen des Wildtyps, der Kontrolllinie Np9-41/4 und der ABA-defizienten Mutanten waren nicht signifikant unterschiedlich, während Pflanzen der transgenen Linie RAP40/7, wie bereits von Artsaenko et al. (1995) für RA-Pflanzen nachgewiesen, deutlich höhere ABA-Mengen akkumulierten. Unter Phytokammerbedingungen enthielten Blätter der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* geringere ABA-Mengen als der Wildtyp wie bereits von Marin et al. (1996) und Leydecker et al. (1995) gezeigt. Den höchsten ABA-Gehalt wiesen Blätter der transgenen Linie RAP40/7 auf (Abb. 7).

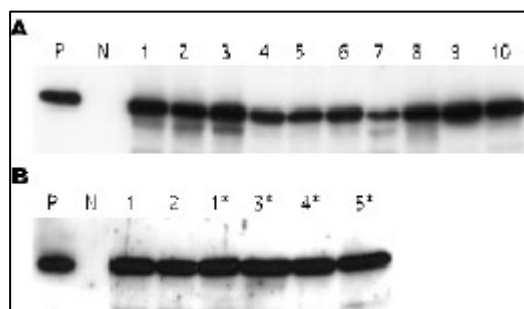
Das anti-ABA scFv bzw. anti-Oxazonon scFv wurde in allen für die somatische Embryogenese eingesetzten *in vitro* Pflanzen der Linie RAP40/7 bzw. Np9-41/4 stabil exprimiert. Der scFv-Gehalt in Blättern *in vitro* kultivierter Pflanzen wurde nach jeder Kulturpassage mittels Western Blot Analyse kontrolliert (Abb. 8).



**Abb. 6.** Vergleichende Analyse des Chlorophyll a Gehaltes von Wildtyp, anti-ABA scFv exprimierender Linie (RAP40/7) und ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* unter *in vitro* oder Phytokammerbedingungen



**Abb. 7.** Vergleichende Analyse des ABA-Gehaltes in Blättern von Wildtyp-, Np9-41/4-, RAP40/7-, *aba1* und *aba2*-Pflanzen unter *in vitro* oder Phytokammerbedingungen



**Abb. 8.** Expression des anti-ABA scFv bzw. anti-Oxazolon scFv in Blättern *in vitro* kultivierter Pflanzen. **A:** Nachweis der stabilen anti-ABA scFv-Akkumulation in verschiedenen *in vitro* kultivierten Pflanzen der Linie RAP40/7. **B:** Nachweis der stabilen anti-Oxazolon scFv-Akkumulation in verschiedenen *in vitro* kultivierten Pflanzen der Linie Np9-41/4. Die 2. Kulturpassage ist mit (\*) gekennzeichnet. 15µg Protein pro Bahn wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Samenextrakte anti-ABA scFv exprimierender Pflanzen wurden als Positivkontrolle (P), Wildtyp Blattextrakte als Negativkontrolle (N) verwendet. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung des monoklonalen anti-myc-Antikörpers und einem anti-Maus IgG-POD-Konjugat durch Chemilumineszenz.

### 3.3. Einfluss von ABA auf die Entwicklung somatischer Embryonen

#### 3.3.1. Morphogenetische Veränderungen somatischer Embryonen unter ABA-Mangelbedingungen

ABA-Mangel wurde in *in vitro* kultivierten Zellen durch drei unterschiedliche Versuchsstrategien erzeugt. Erstens wurde durch intrazelluläre Expression des anti-ABA scFv die ABA-Funktion gentechnisch in transgenen Zellen immunmoduliert. Zweitens wurden die *Nicotiana plumbaginifolia* ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* eingesetzt. Drittens wurde der ABA-Biosyntheseinhibitor Fluridon zur Erzeugung von ABA-Defizienz in Wildtypkulturen verwendet.

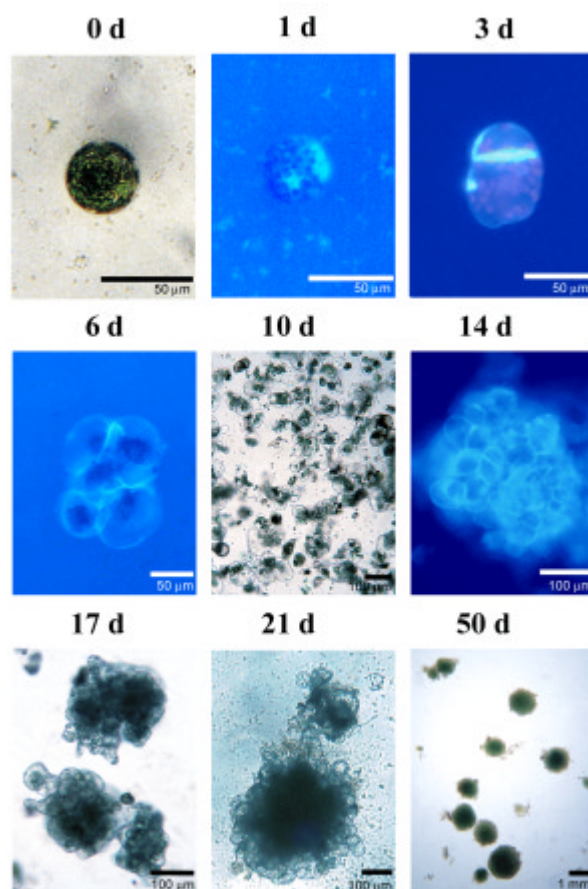
Mesophyllprotoplasten der transgenen Linien RAP40/7 und Np9-41/4 und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* wurden zur Entwicklung somatischer Embryonen unter identischem Nährstoff- und Hormonregime wie Protoplasten des Wildtyps *in vitro* kultiviert und der Verlauf der Embryoentwicklung vergleichend analysiert. Die dokumentierten morphologischen Charakteristika resultieren aus der Bonitierung von 50 Wildtypkulturansätzen, die als Kontrollen mitgeführt wurden, 18 Kulturansätzen der transgenen Linie RAP40/7 und 17 bzw. 18 der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2*. Die Entwicklung der Protoplasten der transgenen Linie Np9-41/4 zu somatischen Embryonen wurde in 11 Kulturansätzen untersucht.

In Übereinstimmung mit dem durch Borisjuk et al. (1998) beschriebenen somatischen Embryogenesesystem für *Nicotiana plumbaginifolia* regenerierten *in vitro* kultivierte Mesophyllprotoplasten des Wildtyps in den ersten 1 – 2 Tagen nach ihrer Isolierung die Zellwand und wiesen bereits am dritten Tag zahlreiche inäquale Zellteilungen auf (Abb. 9). Bis zum 6. Kulturtag bildeten sich 4 - 8 zellige Strukturen. Dabei wurde die Transition differenzierter somatischer Zellen zu teilungsaktiven embryogenen Zellen durch die anfänglich hohen Auxin- und Cytokininkonzentrationen im Kulturmedium induziert. Nach Transfer der Zellkultur zu niedrigeren Hormonkonzentrationen entwickelten sich um den 10. Tag präglobuläre Zellstrukturen, aus denen dichte globuläre Embryoide hervorgingen (14d). Bereits nach 21 Tagen der *in vitro* Kultivierung ließen sich dichte Einzelstrukturen mit protodermartigem Abschluss finden. Nach Überführung der Zellkultur auf Festmedium entwickelten sich dichte abgeschlossene Strukturen (Abb. 11), die über ein Sprosstadium zu Ganz-Pflanzen regenerierten. Durch histologische Untersuchungen der Zellstrukturen (Abb. 12) konnte gezeigt werden, dass globuläre Embryoide (50d) embryogene Zentren enthielten, die von geordneten Zellstrukturen umgeben waren. Obgleich im Zellkultursystem zahlreiche Protoplasten direkt zu globulären Embryoiden differenzierten, traten auch einige differenzierte Strukturen auf, die



mehr als ein embryogenes Zentrum enthielten. Demzufolge trat neben vorrangig direkter somatischer Embryogenese auch sekundäre Embryoentwicklung an bereits geformten embryogenen Strukturen auf (Daten nicht gezeigt). Zellstrukturen wurden auch elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurde das Gewebekulturmateriale in ERL (Epoxy Resin Low Viscosity) Epoxidharz eingebettet und mit Uranylacetat und Bleiacetat kontrastiert. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass embryogene Zentren von kleinvolumigen Zellen in gerichteter Anordnung umgeben waren, die viele Amyloplasten enthielten (Abb. 13 A1, A2). In embryogenen Zentren wurde Xylemdifferenzierung gefunden (Abb. 13 A3).

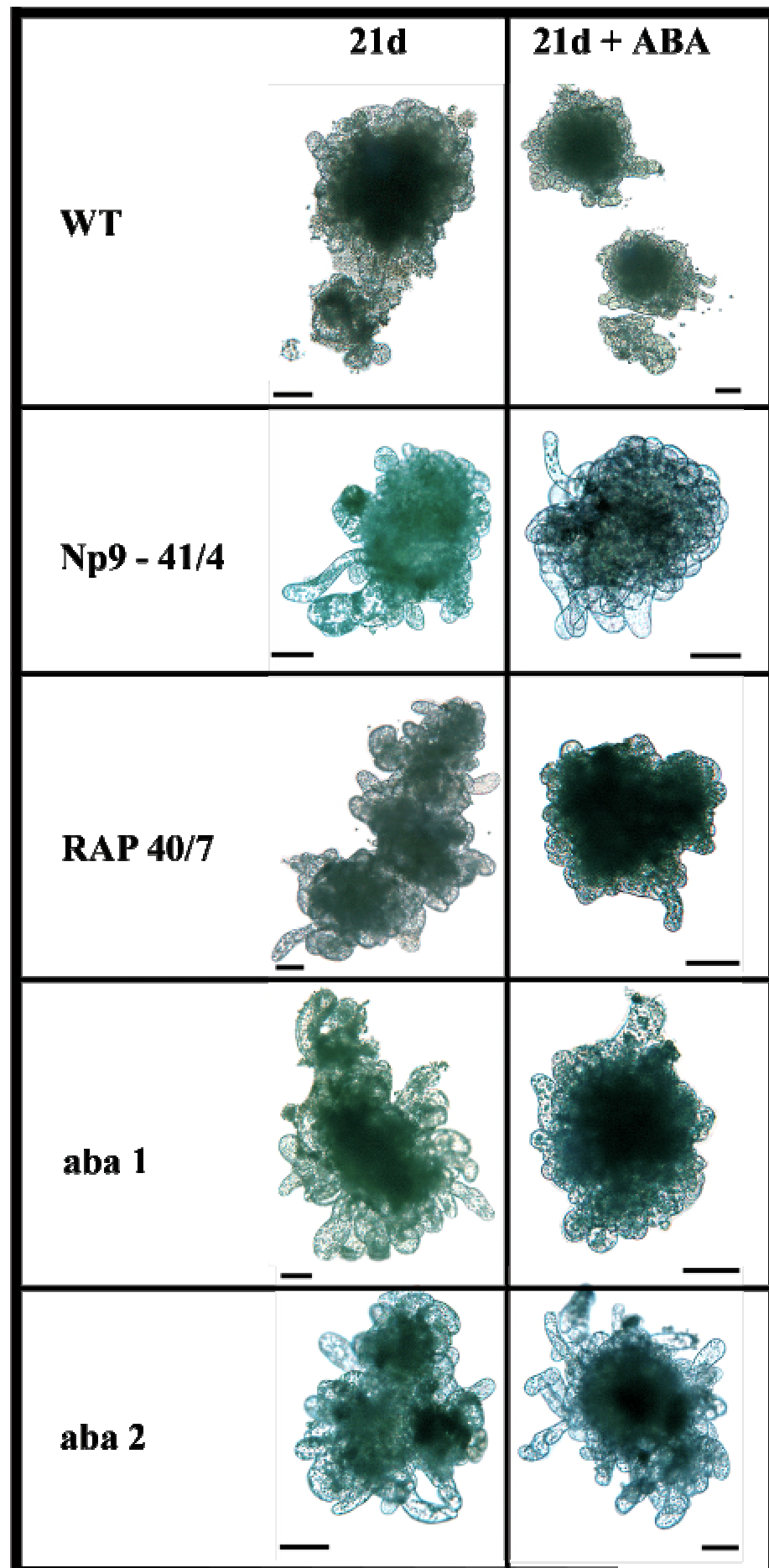
Die somatischen Embryonen der anti-Oxazon scFv exprimierenden Kontrolllinie entwickelten sich morphogenetisch ähnlich wie der Wildtyp (Abb. 10). Die *in vitro* Zellkultur der Linie Np9-41/4 war jedoch insgesamt heterogener als die Wildtypkultur, da vermehrt abnorme und abgestorbene Zellen auftraten.



**Abb. 9.** Entwicklung somatischer Embryonen in der Wildtyp *in vitro* Zellkultur.

**0d** – Protoplasten; **1d** – beginnende Zellwandregeneration; **3d** – Zweizellstadium; **6d** – 8-Zellstadium; **10d** – präglobuläre Strukturen; **14d**, **17d**, **21d** – Differenzierung zu kompakten Strukturen, Ausbildung globulärer Embryonen; **50d** – globuläre Strukturen mit Protoderm.

Zellkulturstadien des 3., 6. und 14. Kulturtages behandelt mit dem Zellwandfarbstoff Calcofluor White (Sigma, 0,1%), fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

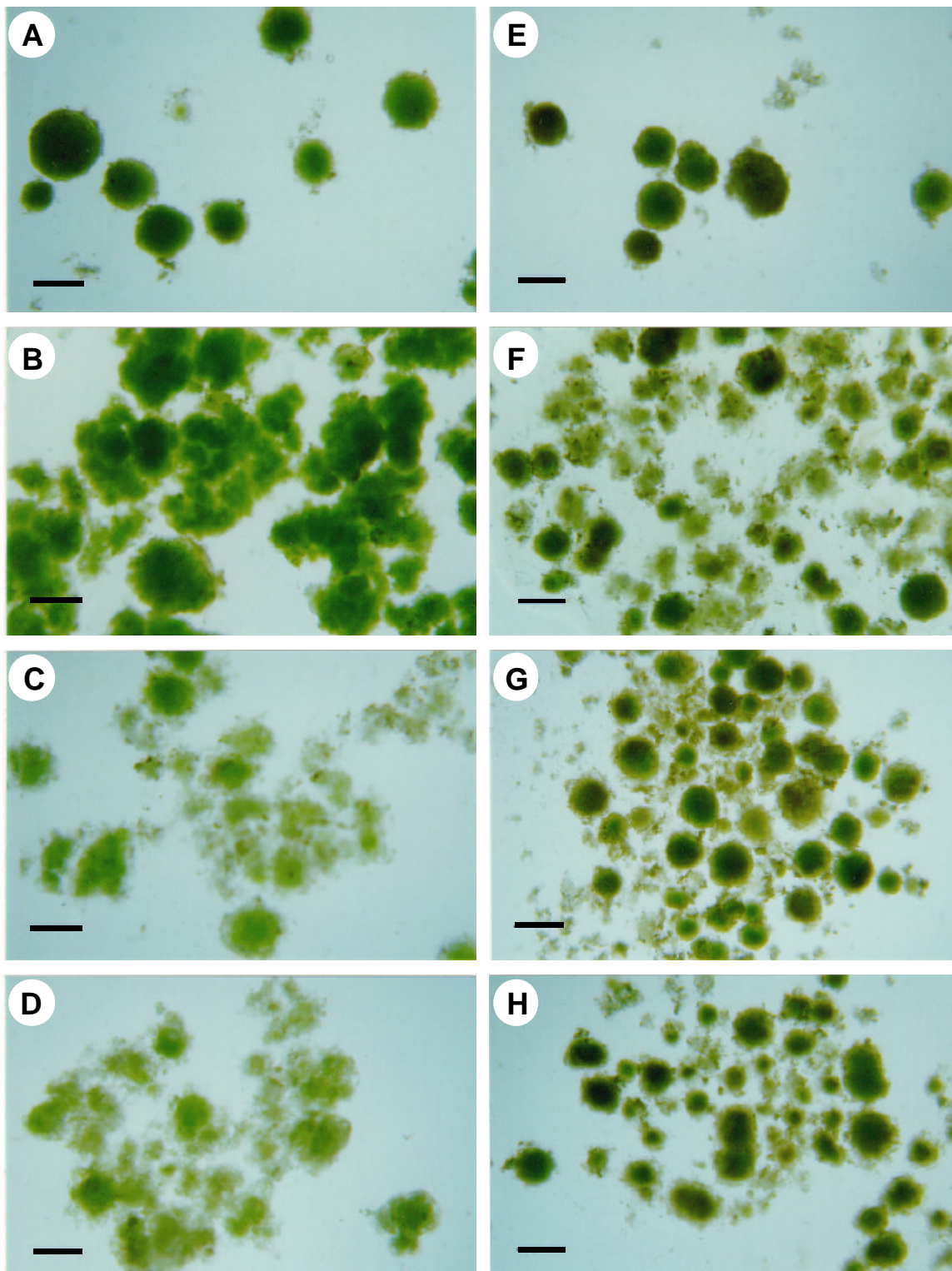




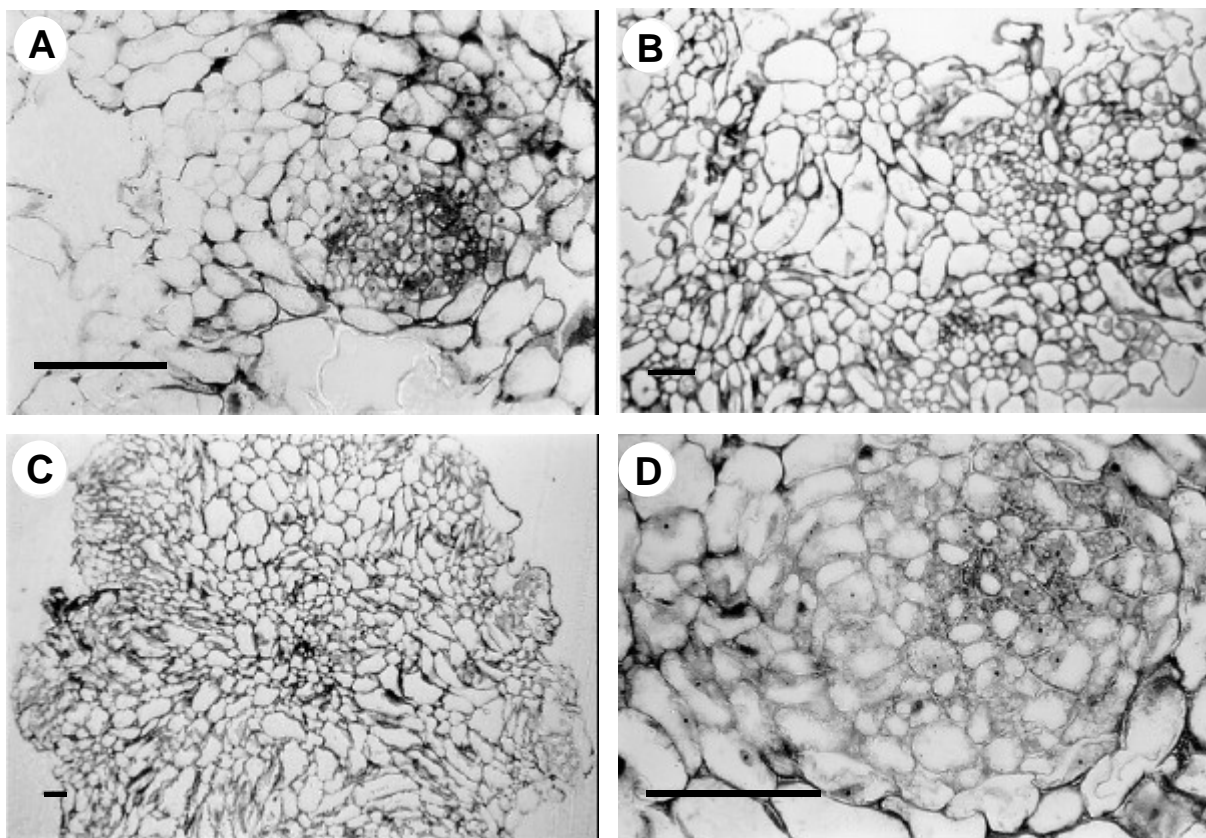
**Seite 34: Abb. 10.** Morphogenetische Analyse der Entwicklung somatischer Embryonen des Wildtyps, der anti-Oxazolon scFv-Antikörper exprimierenden Kontrolllinie Np9-41/4, der anti-ABA scFv exprimierenden Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2*. Verglichen werden Zellstrukturen des 21. Tages der *in vitro* Kultivierung mit und ohne ABA-Komplementation (+ABA). Wildtyp- und Np9-41/4-Strukturen weisen kompakte Strukturen auf unabhängig von ABA-Behandlung. Im Gegensatz dazu sind die Zellstrukturen der Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* locker, zeigen zahlreiche phyllopodium-artige Auswüchse und liegen in größeren Verbänden vor. Nach ABA-Komplementation treten deutlich kompaktere Einzelstrukturen auf.

*In vitro* kultivierte Mesophyllprotoplasten der transgenen Linien RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* entwickelten bis zum 10. Tag der somatischen Embryogenese dem Wildtyp vergleichbare Zellstrukturen. Ab dem 10. Tag der *in vitro* Kultivierung wurden jedoch morphologische Veränderungen der Zelldifferenzierung bonitiert. Sowohl im RAP40/7- als auch im *aba1*- und *aba2*-System (Abb. 10) traten die Zellstrukturen meist nicht einzeln, sondern in ungeordneten kettenförmigen Verbänden auf und setzten sich aus großvolumigen, abnorm geformten Zellen zusammen. Um den 21. Kulturtag lagen Zellstrukturen vor, die nicht durch Protoderm abgeschlossen waren, sondern phyllopodium-ähnliche Auswüchse besaßen. Derartige Zellaggregate konnten noch um den 50. Kulturtag beobachtet werden (Abb. 11). Die Zytologie der Zellstruktur vermittelt den Eindruck von losen ungeordneten Zellverbänden aus großen unförmigen Zellen (Abb. 12). Diese Strukturen enthielten nur sehr vereinzelt embryogene Zentren, die im Gegensatz zum Wildtyp von Zellen in ungerichteter Anordnung umgeben waren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellstrukturen zeigten ebenfalls nur wenige embryogene Zentren in vorrangig kallösen Zellmassen. Embryogene Zellen waren stärker vakuolisiert als in embryogenen Zentren des Wildtyps. Die kallösen Zellen enthielten große Vakuolen, wenige Amyloplasten und zahlreiche Peroxysoomen (Abb. 13 B1, B2).

Alle homozygoten transgenen Linien wurden aufgrund ihrer Kanamycinresistenz selektiert. Um abzusichern, dass sich nur transgene Zellen in der *in vitro* Kultur entwickelten, wurde die *in vitro* Kultivierung der transgenen Linien auf kanamycin-haltigem Medium durchgeführt. Adäquate Kontrollen mit Wildtypzellkulturen waren nicht möglich, da Applikation gleicher Antibiotikumkonzentration zur Hemmung der Zellteilungen führte (Daten nicht gezeigt). Da die transgene Kontrolllinie Np9-41/4 wie die immunmodulierte Linie RAP40/7 kanamycin-resistent war, wurde sie als Kontrolle von Kanamycineffekten auf die Entwicklung somatischer Embryonen gewertet. In Np9-41/4-Kulturen verlief die somatische Embryogenese in der Gegenwart von Kanamycin ähnlich dem Wildtyp (Abb. 10).

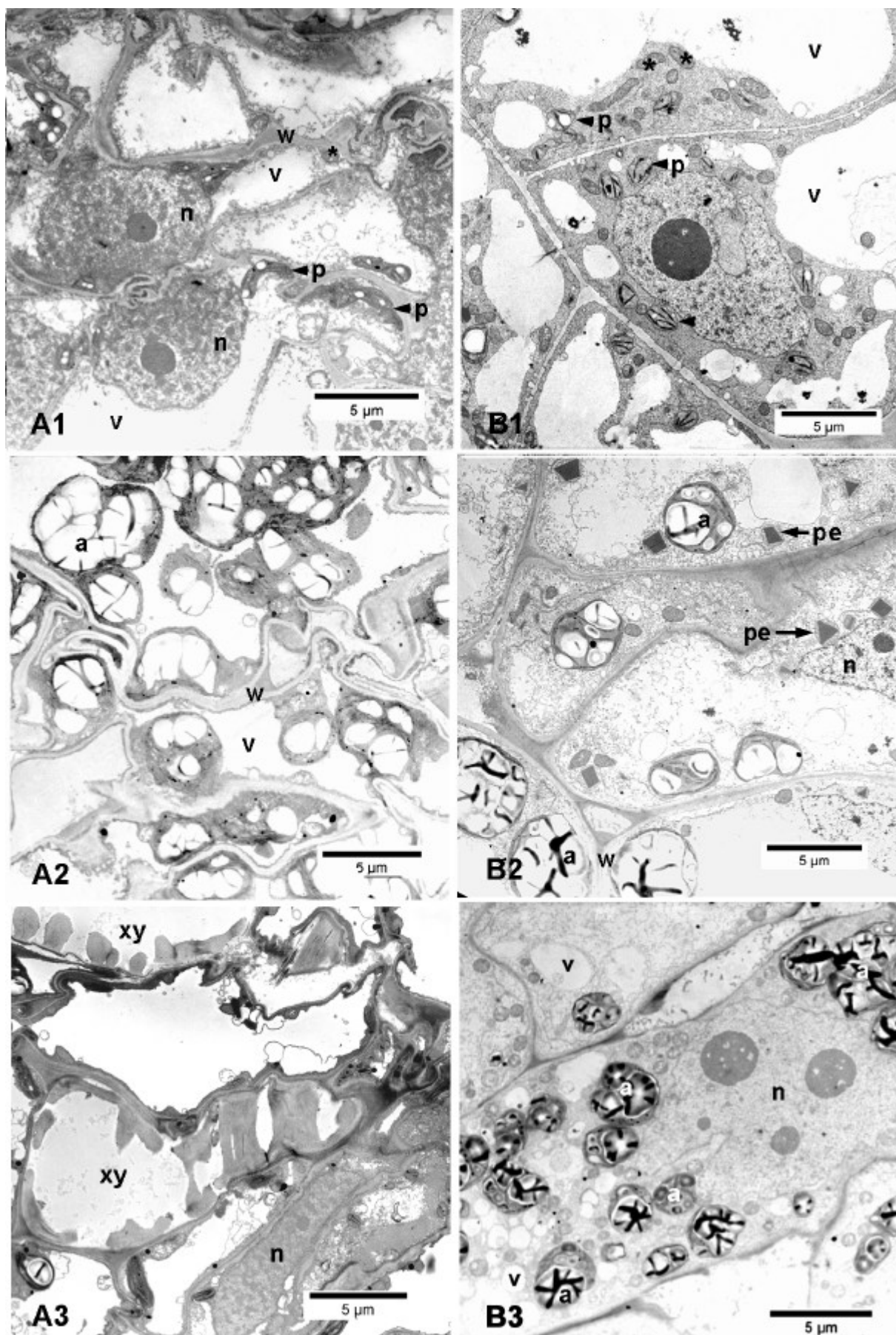


**Abb. 11.** Morphogenetischer Vergleich von Zellstrukturen am 50. Tag der *in vitro* Kultivierung. A: Wildtyp dichte globuläre Strukturen mit protoderm-ähnlichem Abschlussgewebe; B: RAP40/7, C: *aba1* und D: *aba2* – lose durchscheinende kettenförmig angeordnete Strukturen; E: Wildtyp+ABA – keine Unterschiede zu den korrespondierenden nichtbehandelten Stadien; F: RAP40/7, G: *aba1* und H: *aba2* komplementiert mit ABA – Strukturen dem Wildtyp vergleichbar. ABA-Konzentration 1,5µM ab 10. Kulturtag, Balken = 1mm



**Abb. 12.** Zytologie der Zellkulturstadien am 50. Tag der *in vitro* Kultivierung. A: Wildtyp – dichte Struktur mit embryogenem Zentrum, B: Wildtyp + 1  $\mu$ M Fluridon - große unorganisierte Kalluszellen, C: RAP40/7 - Merkmale von ABA-Defizienz, vergleichbar dem Fluridon-behandelten Wildtyp, große unförmige Zellen in kettenförmigen unorganisierten Zellstrukturen, D: RAP40/7 + 1,5  $\mu$ M ABA - dichtere Zell-anordnung, embryogenes Zentrum. Balken = 100  $\mu$ m.

Durch Zugabe des ABA-Biosyntheseinhibitors Fluridon zu *in vitro* Wildtypkulturen sollte ebenfalls ABA-Mangel erzeugt werden. Fluridonapplikation erfolgte ab 10. Kulturtag. Die ersten morphogenetischen Veränderungen wurden bereits am 14. Tag der Zellkultur sichtbar. Die Zellstrukturen setzten sich aus großen unförmigen Zellen zusammen und zeigten phyllo-podium-artige Auswüchse. Im weiteren Zellkulturverlauf wurden komplexe Verbände aus großen unförmigen Zellen in ungerichteter Anordnung beobachtet (Abb. 12). Da DMSO zur Lösung von Fluridon Verwendung fand und andere Autoren Förderung von Zellteilung und Kallusbildung durch 0,2-7% DMSO zeigten (Hahne und Hoffmann 1984, Srinivasan und Vasil 1986, Qureshi et al. 1989), wurde in Kontrollversuchen getestet, ob das Lösungsmittel die Zelldifferenzierung beeinflusst. DMSO (0,1% Endkonzentration) hatte keinen Einfluss auf die somatische Embryoentwicklung (Daten nicht gezeigt). Die verwendete Fluridonkonzentration wurde in Vorversuchen ermittelt. Bereits durch Applikation von 1  $\mu$ M Fluridon konnten ABA-Mangeleffekte in der Zelldifferenzierung beobachtet werden, die in etwa den Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie und der ABA-Biosynthesemutanten vergleichbar waren (Abb. 12). Höhere Fluridonkonzentrationen führten zur Ausbildung abnormer Strukturen und zum vorzeitigem Absterben der Kulturen (Daten nicht gezeigt).





**Seite 38: Abb. 13.** Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellstrukturen somatischer Embryonen am 50. Tag der *in vitro* Kultur. Wildtyp – A1: kleine cytoplasmareiche embryogene Zellen, A2: Zellen aus dem Grundkallus mit vielen Amyloplasten, A3: höher differenzierte Struktur mit Xylemelementen. RAP40/7 – B1: embryogene Zellen, stärker vakuolisiert als embryogene Wildtypzellen, B2: große aberante Zellen aus dem Grundkallus mit Peroxysomen und wenigen Amyloplasten, B3: RAP40/7+ABA Zellen im Grundkallus mit Amyloplasten. Als Grundkallus werden Strukturen bezeichnet, die das embryogene Zentrum umgeben. ABA (1,5µM) wurde ab 10. Kulturtag appliziert. n – Nukleus, v – Vakuole, w – Zellwand, p – Plastid, a – Amyloplast, pe – Peroxysom, \* – Mitochondrium, xy – Xylem

Der morphogenetische Vergleich der somatischen Embryogenese des Wildtyps und immunmodulierter Linie oder ABA-Biosynthesemutanten zeigt deutlich, dass ABA-Mangel in frühen Stadien der Embryogenese die Ausbildung globulärer Strukturen beeinträchtigt. Der Zeitpunkt der ABA-Wirkung ist zwischen dem 10. und 14. Tag der *in vitro* Kultivierung zu fixieren. Zwischen den Zellstrukturen der immunmodulierten Linien, der ABA-defizienten Mutanten und fluridonbehandelter Wildtypkulturen sind kaum phänotypische Unterschiede feststellbar. Somit hat die Immunmodulation der ABA-Funktionen einen vergleichbaren Effekt wie genetisch oder durch ABA-Biosyntheseinhibitor verursachte ABA-Defizienz.

### 3.3.2. Normalisierung ABA-defizienter Zellkulturen durch ABA-Komplementation

Die morphogenetischen Unterschiede in der Entwicklung somatischer Embryonen in Wildtyp- und ABA-defizienten Zellkulturen indizierten, dass ABA-Mangel Prozesse der frühen Embryogenese beeinflusst. Daher sollte untersucht werden, ob Komplementierung des Kulturmediums mit ABA zur Normalisierung der Embryoentwicklung der immunmodulierten Linie und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* unter *in vitro* Kulturbedingungen führte. Außerdem sollten der optimale Zeitpunkt der ABA-Applikation und die optimale ABA-Konzentration für die Komplementation der Defekte bestimmt werden.

Die Entwicklung der somatischen Embryonen der transgene Linie RAP40/7 sowie der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* konnte durch ABA-Applikation [ $1,5 \times 10^{-6}$  M ( $\pm$ ) ABA] zum Kulturmedium normalisiert werden.

Dabei war der Zeitpunkt der ABA-Applikation entscheidend für die normalisierende Wirkung von ABA auf die Embryodifferenzierung während der *in vitro* Zellkultur. Wurden die Zellkulturmedien am Tag 0 oder 3 der *in vitro* Kultivierung mit ABA supplementiert, trat eine Hemmung der Zellteilungsaktivität auf. Die Entwicklung ging nicht über das 2 - 8 Zellstadium hinaus. ABA-Applikation am 6. Kulturtag bewirkte Entwicklung wildtypähnlicher Embryonen bei geringer Regenerationseffizienz (Daten nicht gezeigt). Eine Normalisierung der Entwicklung somatischer Embryonen der transgenen anti-ABA scFv exprimierenden

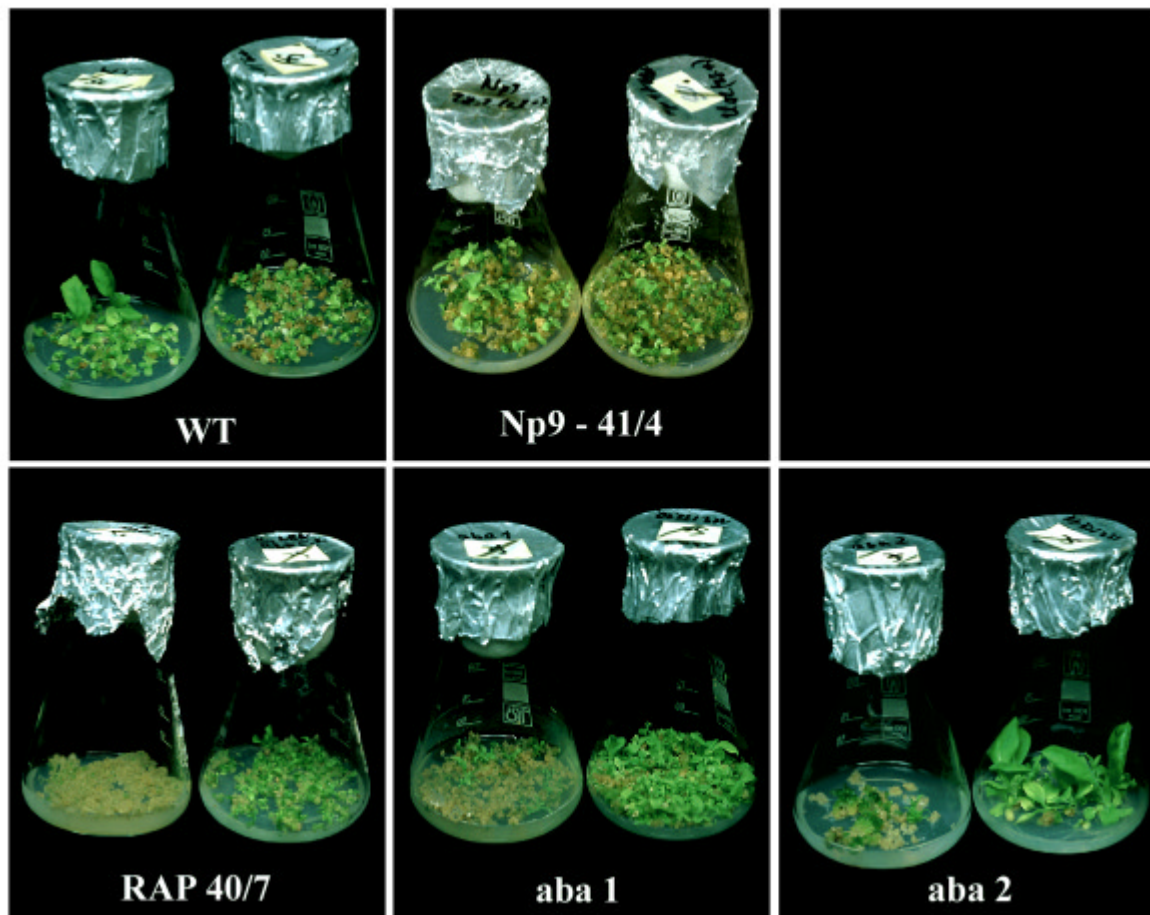
Linie und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* mit wildtypähnlicher Regenerationseffizienz (Tab. 3) wurde durch ABA-Komplementierung ab 10. Tag der *in vitro* Kultivierung erreicht. Eine Konzentration von  $1,5 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $\pm$ )-ABA erwies sich als optimal. Bei 10fach höheren ABA-Konzentrationen traten verstärkt abnormale Strukturen auf, das Wachstum somatischer Embryonen wurde gehemmt (Daten nicht gezeigt).

In Zeit und Konzentration optimal ABA-behandelte Zellstrukturen wiesen morphologische Charakteristika des Wildtyps auf (Abb. 10, 11). Der morphogenetische Effekt von exogen applizierter ABA wurde zwischen dem 17. und 21. Kulturtag deutlich sichtbar. Zellstrukturen der Linie RAP40/7 und der Mutanten *aba1* und *aba2*, die unter diesen Kulturbedingungen differenzierten, bildeten weniger phyllopodium-artige Auswüchse. Später wurden die embryogenen Strukturen kompakter und waren aus kleinvolumigen Zellen in gerichteter Anordnung zusammengesetzt, wie für die anti-ABA scFv exprimierende Linie RAP40/7 gezeigt werden konnte (Abb. 12). Außerdem traten in den somatischen Embryogenesesystemen der transgenen Linie RAP40/7 und der Mutanten *aba1* bzw. *aba2* vermehrt Einzelstrukturen auf, die durch protoderm-ähnliches Gewebe abgeschlossen wurden (Abb. 11).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich embryogene Zentren der immunmodulierten Linie nach ABA-Applikation nicht von unbehandelten Zellstrukturen unterschieden (Daten nicht gezeigt). Kallöse Strukturen wurden jedoch durch kleine Zellen gebildet, die im Vergleich zu unbehandelten Zellstrukturen der transgenen Linie weniger Vakuolen hatten und wie die Kalluszellen des Wildtyps größere Mengen Amyloplasten enthielten (Abb. 13 B3). Im Vergleich zu unbehandelten Strukturen wurden nach ABA-Behandlung keine Peroxysomen gefunden.

Die Entwicklung globulärer Strukturen erfolgte nicht synchron in der ABA-behandelten *in vitro* Zellkultur. Neben differenzierten globulären Strukturen traten intermediäre Zellstrukturen mit bereits gerichteter Zellanordnung auf.

Die ABA-Komplementierung von Wildtypkulturen führte zur geringfügig beschleunigten Entwicklung differenzierter globulärer Embryonen (Daten nicht gezeigt). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ABA-Applikation von Wildtypkulturen keine Veränderungen der Ultrastruktur im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (Abb. 17) bewirkte (Daten nicht gezeigt). In späteren Stadien war jedoch ein wachstumshemmender Effekt des Phytohormons zu verzeichnen (Abb. 14), der zu einem Wachstumsstopp führte. Die Kultur verbräunte; Blattregeneration wurde nicht oder nur vereinzelt beobachtet.



**Abb. 14.** Vergleich der Regeneration des Wildtyps und der Kontrolllinie Np9-41/4, der anti-ABA scFv exprimierenden Linie RAP40/7 und der ABA-defizienten Mutanten *aba1* und *aba2*. A: Wildtyp +/-ABA – Hemmung der Weiterentwicklung globulärer Strukturen zu Pflanzen durch ABA, B: Np9-41/4 +/-ABA – wie Wildtyp, C: RAP40/7 +/-ABA – Förderung der Regeneration durch ABA-Komplementierung, D: *aba1*, E: *aba2* jeweils +/-ABA – wildtyp-ähnliche Regeneration durch ABA-Komplementierung. Alternierend; linker Kolben ohne ABA, rechter Kolben nach ABA-Komplementierung ab 10. Tag.

Durch Komplementierung des Zellkulturmediums mit  $1,5 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $\pm$ )-ABA, beginnend am 10. Tag der *in vitro* Kultur, wurde eine Normalisierung der Embryoentwicklung erreicht. Zellstrukturen der transgenen Linie RAP40/7 und der ABA-defizienten Mutanten *aba1* bzw. *aba2* differenzierten zu kompakten Embryonen, die zeitgleich wie Wildtypembryonen zu Ganzpflanzen regenerierten. Überoptimale ABA-Konzentrationen in Wildtypzellkulturen führten dagegen zur Hemmung von Wachstum und Regeneration der Embryonen.

### 3.4. Quantitative Charakterisierung der Entwicklung somatischer Embryonen

#### 3.4.1. Regenerationseffizienz der *in vitro* Zellkulturen

Die Entwicklung somatischer Embryonen in den unterschiedlichen Systemen wurde nicht nur durch morphogenetische Bonitierung sondern auch durch Bestimmung der Regenerationseffizienz und der Embryomasse (3.4.2.) charakterisiert.

Die Regenerationseffizienz wurde ermittelt, um Unterschiede im Regenerationsverhalten der *in vitro* Kulturen zu erfassen. Dazu wurde am 21. Kulturtag die Anzahl der differenzierten Zellstrukturen bestimmt und zur Anzahl der Protoplasten ins Verhältnis gesetzt, mit der die *in vitro* Zellkultur gestartet wurde (vgl. 2.2.5.1.). Die Regenerationseffizienz ist somit der prozentuale Anteil Protoplasten, die bis zum 21. Kulturtag zu Zellstrukturen differenzierten. Der 21. Kulturtag wurde für die Bestimmung gewählt, da sich die Zellkulturen noch im Flüssigmedium befanden und zu diesem Zeitpunkt eine visuelle Auswertung ermöglichten. Außerdem garantierten Zellpassagen im Flüssigmedium die konstante Anzahl von Zellstrukturen pro Verdünnungsschritt. Bei Passagierung von Zellstrukturen auf Festmedium war dieses nicht gewährleistet. Die Anzahl differenzierter Zellstrukturen am 21. Kulturtag variierte zwischen den individuellen Kulturansätzen. Darüber hinaus wurde eine Abhängigkeit von der untersuchten Linie ermittelt (Tab. 3).

Die Regenerationseffizienz der untersuchten *in vitro* Zellkulturen des Wildtyps, der transgenen Linien und der ABA-Biosynthesemutanten lag zwischen 4 und 18,6%. Im Durchschnitt entwickelten sich in Wildtypzellkulturen mehr Protoplasten zu embryogenen Strukturen als in den *in vitro* Kulturen der transgenen Linien Np9-41/4 bzw. RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten.

Die durchschnittliche Regenerationseffizienz unbehandelter und ABA-behandelter Wildtypkulturen unterschied sich kaum. Nach ABA-Behandlung entwickelten sich in zwei Ansätzen weniger und in zwei anderen mehr embryogene Strukturen. Das Regenerationsverhalten in Wildtypzellkulturen wurde bis zum 21. Kulturtag offenbar nicht durch ABA-Applikation beeinflusst. Die ABA-behandelten RAP40/7- und Np9-41/4-Zellkulturen enthielten im Durchschnitt geringfügig weniger differenzierte Strukturen als die korrespondierenden unbehandelten Kulturen. Im Gegensatz dazu wirkte sich die Präsenz von ABA in *aba1*-Zellkulturen positiv auf das Regenerationsverhalten aus. Die Regenerationseffizienz ABA-behandelter *aba1*-Kulturen erreichte wildtypähnliche Werte.

Die Applikation des ABA-Biosyntheseinhibitors Fluridon zu Wildtyp- und Np9-41/4-Zellkulturen führte zur Verringerung der Anzahl differenzierter Zellstrukturen.



**Tab. 3.** Regenerationseffizienz des Wildtyps, der transgenen Linien und der ABA-Biosynthesemutanten am 21. Kulturtag. Die Regenerationseffizienz wurde aus dem Verhältnis der Protoplastenanzahl zu Kulturbeginn und der Anzahl differenzierter Strukturen am 21. Kulturtag ermittelt. Sie ist in Prozent angegeben. Die Regenerationseffizienzen wiesen erhebliche Unterschiede in den individuellen Ansätzen eines Kultursystems auf.

Linie	Kulturtag und Behandlung		
	21d	21d+ABA	21d+Flur
<b>WT</b>	18,6%	13,9%	
	12,7%	11%	10,2%
	7,5%	8,1%	5,7%
	10,5%	13,5%	
	9,5%		
<b>Mittelwert</b>	<b>11,8%</b>	<b>11,6%</b>	<b>8,0%</b>
<b>Np9-41/4</b>	8,9%	8,5%	5,1%
	7,3%	6,5%	6,7%
	9,9%	7,7%	7,1%
<b>Mittelwert</b>	<b>8,7%</b>	<b>7,6%</b>	<b>6,3%</b>
<b>RAP40/7</b>	4,4%	4,8%	
	12,7%	13%	
	13,5%	10,5%	
<b>Mittelwert</b>	<b>10,2%</b>	<b>9,4%</b>	
<b>aba1</b>	8,1%	11,1%	
	10%	13,4%	
<b>Mittelwert</b>	<b>9,05%</b>	<b>12,25%</b>	

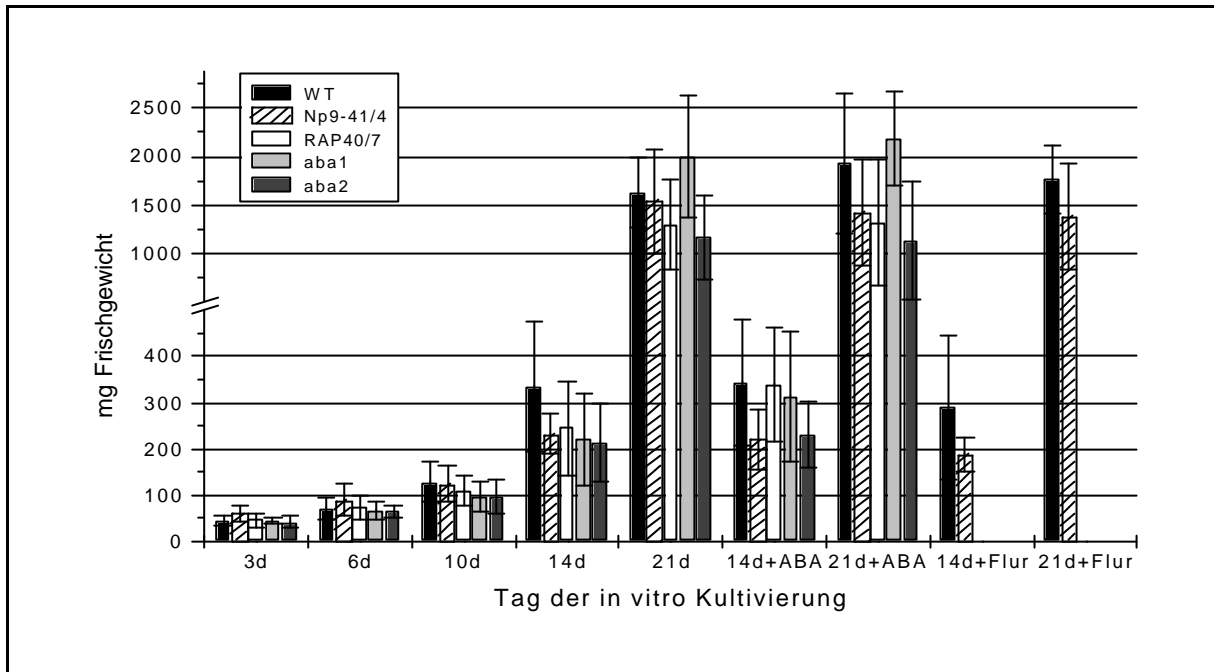
Die Ermittlung der Regenerationseffizienz machte deutlich, dass das Regenerationsverhalten von mehreren Faktoren abhing. Zum einen wurde die Entwicklung differenzierter Strukturen durch ABA-Mangel negativ beeinflusst. Zum anderen bewirkte die Akkumulation eines scFv-Antikörpers in den Zellen eine Erniedrigung der Regenerationseffizienz. Die ABA-Applikation zu *in vitro* Zellkulturen der transgenen anti-ABA scFv exprimierenden Linie RAP40/7 beeinflusste die Qualität nicht aber die Quantität der Entwicklung somatischer Embryonen.

### 3.4.2. Zunahme der Embryomasse während der *in vitro* Kultivierung

Während der somatischen Embryogenese entwickelten sich aus Protoplasten embryogene mehrzellige Strukturen. Da dieser Prozess mit der Zunahme der Masse der Zellstrukturen einherging, kann die Entwicklung der Zellstrukturen in den untersuchten Systemen durch Bestimmung des Frischgewichtes verfolgt werden. Das Frischgewicht wurde auf die zu Beginn der Kultivierung eingesetzte Zellzahl bezogen und eine Regenerationseffizienz von 100% angenommen.

Im Verlauf der somatischen Embryogenese nahm das Frischgewicht der Embryonen aller untersuchten Linien zu (Abb. 15). Bei Einsatz gleicher Anzahl an Protoplasten für die *in vitro* Zellkultur traten bis zum 6. Kulturtag keine signifikanten Unterschiede im Frischgewicht der

Zellstrukturen der unterschiedlichen Systeme auf. Danach zeigte das Wildtypembryogenesensystem den größten Anstieg der Embryonenmasse und war den anderen Systemen bis zum 14. Kulturtag überlegen. Zwischen dem 14. und 21. Tag wiesen die Kulturen der ABA-Biosynthesemutante *aba1* den größten Frischgewichtszuwachs auf, während für *aba2* und RAP40/7 die geringste Massezunahme bis zum 21. Kulturtag gefunden wurde.



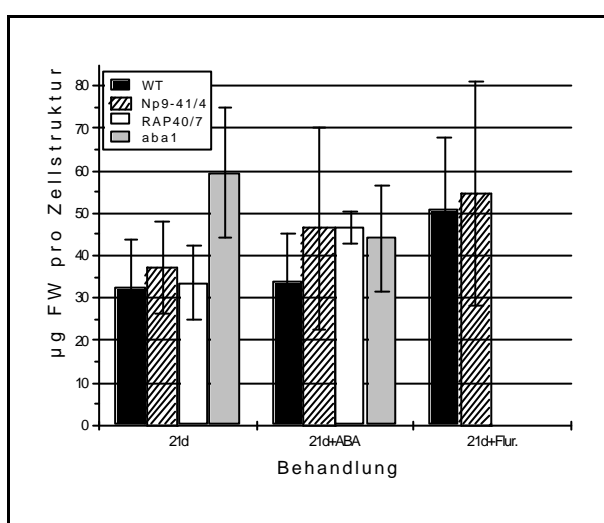
**Abb. 15.** Frischgewichtszunahme somatischer Embryonen während der *in vitro* Kultivierung. Frischgewichte wurden pro Zellkulturaliquot bestimmt. Die dargestellten Werte beziehen sich auf die am Tag 0 eingesetzte Zellzahl. Der Berechnung wurde eine Regenerationseffizienz von 100% zugrundegelegt.

Der Einfluss der ABA-Komplementation auf die Entwicklung der Zellstrukturen wurde auch durch Veränderung des Frischgewichtes widerspiegelt. Nach Mediumkomplementation mit ABA war das Frischgewicht am 21. Kulturtag von Wildtyp- und *aba1*-Kulturen höher als von unbehandelten Zellkulturen. ABA-behandelte Kulturen der transgenen Linie Np9-41/4 hatten im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen ein geringeres Frischgewicht, während RAP40/7 und *aba2* keine signifikanten Frischgewichtsdifferenzen in Abhängigkeit von der ABA-Applikation aufwiesen.

Die Behandlung von Wildtypkulturen mit dem ABA-Biosyntheseinhibitor Fluridon führte im Vergleich zu allen anderen Kulturen zu geringerem Frischgewicht am 14. Kulturtag. Bis zum 21. Kulturtag stieg das Frischgewicht stark an und erreichte höhere Werte als die korrespondierende unbehandelte Zellkultur. Das Frischgewicht von Np9-41/4-Kulturen war nach Fluridonbehandlung geringfügig niedriger als in unbehandelten oder ABA-komplementierten Kulturen.

Da die tatsächliche Regenerationseffizienz weit unter 100% lag und sowohl vom untersuchten System als auch von den applizierten Wirkstoffen abhing (Tab. 3), korrelierte die Frischgewichtsentwicklung nur bedingt mit den morphogenetischen Beobachtungen.

Auf der Basis der tatsächlichen Regenerationseffizienzen der untersuchten Systeme (Tab. 3) konnte die Masse des einzelnen Embryonen am 21. Kulturtag berechnet werden (Abb. 16). In diesem Bezugssystem spiegelt sich der Einfluss des Immunmodulations-, des Mutations- oder Fluridon-bedingten ABA-Mangels auf das Frischgewicht realistischer wider. Zellstrukturen der ABA-Biosynthesemutante *aba1* hatten ein signifikant höheres Frischgewicht im Vergleich zu Wildtyp-, Np9-41/4- und RAP40/7-Zellstrukturen.



**Abb. 16.** Kalkulation der Embryomasse am 21. Tag der *in vitro* Kultur auf Basis der realen Regenerationseffizienz (Tab. 3). Die Berechnung der dargestellten Mittelwerte erfolgte unter Einbeziehung der Regenerationseffizienz in Form der am 21. Kulturtag tatsächlich vorhandenen globulären Strukturen und der Frischgewichte der Kulturen, deren Regenerationseffizienz bestimmt wurde.

Während sich die Masse von Wildtypembryonen durch ABA-Behandlung nicht veränderte, wiesen *aba1*-Embryonen eine deutlich verringerte Masse auf. Die Zellstrukturen der transgenen Linien RAP40/7 und Np9-41/4 hatten eine erhöhte Masse.

Fluridonbehandlung führte in Wildtyp- und Np9-41/4-Zellkulturen zu einer deutlichen Zunahme der Masse der Einzelstrukturen.

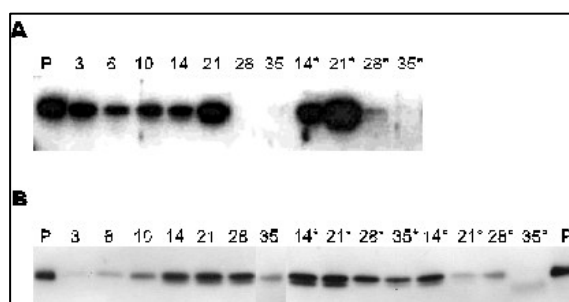
Der Einfluss von ABA-Defizienz wird sowohl bei Betrachtung der Masse der Zellstrukturen der ABA-defizienten Mutante *aba1* als auch der fluridonbehandelten Wildtyp- und Np9-41/4-Kontrollkulturen sichtbar. Die Frischgewichtsdaten korrelieren mit der Zellmorphogenese während der Embryoentwicklung. Die großen ungeordneten Zellverbände von *aba1*-Zellkulturen wiesen im Vergleich zu den kompakten Einzelstrukturen nach ABA-Komplementation wesentlich höhere Frischgewichte auf. Fluridonbehandlung von Wildtyp- und Np9-41/4-Zellkulturen führte zu *aba1*-vergleichbaren Zellstrukturen und auch diese hatten im Vergleich zu unbehandelten Kulturen erhöhtes Frischgewicht. In RAP40/7-Zellkulturen war die Korrelation zwischen ABA-Defizienz und Frischgewicht nicht eindeutig herzustellen, da das Frischgewicht der Zellstrukturen nach ABA-Behandlung größer war.

### 3.5. Entwicklungsabhängige Regulation der Transgenexpression

#### 3.5.1. Transgenexpression während der somatischen Embryogenese

Da die Stärke der Immunmodulation vom anti-ABA scFv-Gehalt in den transgenen Zellen abhängt, wurde die Akkumulation des Transgens in unterschiedlichen Stadien der somatischen Embryogenese mittels Western Blot Analyse untersucht.

Die Akkumulation des anti-ABA scFv konnte in allen untersuchten Stadien der *in vitro* Zellkulturen der konstitutiv exprimierenden Linie RAP40/7 nachgewiesen werden. Mittels Western Blot Analysen wurden Proteinextrakte definierter Zellkulturstadien aus 6 unabhängigen Kulturansätzen überprüft. Nicht in jedem Falle konnten alle Stadien eines individuellen Kulturansatzes untersucht werden. Die Menge des transgenen Proteins variierte in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Zellstrukturen. Während frisch isolierte Protoplasten nur geringe Antikörpermengen aufwiesen, wurden in *in vitro* Zellkulturstadien bis 21. bzw. 28. Kulturtag steigende Mengen des Antikörpers akkumuliert. In Zellkulturstadien der Kulturstage 28 bis 65 verringerte sich die exprimierte Antikörpermenge, nahm jedoch zum Zeitpunkt der Pflanzenregeneration wieder zu (Daten nicht gezeigt). Die anti-ABA scFv-Akkumulation in Abhängigkeit vom Zellkulturstadium wird in Abb. 17 (A) gezeigt.



**Abb. 17.** scFv-Expression der transgenen Linien während der somatischen Embryogenese. **A:** Expression des anti-ABA scFv-Antikörpers unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in Zellkulturstadien der transgenen Linie RAP40/7 während der *in vitro* Kultivierung. **B:** Expression des anti-Oxazolon scFv unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in Zellkulturstadien der transgenen Kontrolllinie Np9-41/4. Elektrophoretische Auftrennung von 5µg (A) bzw. 1µg (B) Proteinextrakt der Kulturstage 3, 6, 10, 14, 21, 28 und 35 pro Bahn. Samenextrakte anti-ABA scFv exprimierender Pflanzen wurden als Positivkontrolle (P) verwendet. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der anti-ABA scFv bzw. anti-Oxazolon scFv mit Hilfe des anti-myc Antikörpers und des anti-Maus IgG POD Konjugates nachgewiesen. ABA-Behandlung (1,5µM ab 10. Kulturtag) ist mit (\*), Fluridonbehandlung (1µM ab 10. Kulturtag) mit (°) gekennzeichnet.

Offenbar ist die Transgenakkumulation außerordentlich anfällig gegenüber Störungen im Zellkulturverlauf. Zwischen dem 14. und 28. Kulturtag variierte die akkumulierte Antikörpermenge zwischen den individuellen Kulturansätzen stark. In Zellkulturstadien einiger Kulturen wurden große Mengen des Transgens akkumuliert, während in Zellkulturstadien anderer Kulturansätze kein Antikörper nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

ABA-Behandlung der RAP40/7-Kultur ab 10. Tag der *in vitro* Kultivierung beeinflusste die Akkumulation des anti-ABA scFv. Auch hier wurden Unterschiede zwischen den individuellen Kulturansätzen gefunden. Nach ABA-Applikation nahm die Menge des Antikörpers bis zum 21. Kulturtag stark zu. In späteren Zellkulturstadien wurden geringere Mengen des anti-ABA scFv nachgewiesen. Im Vergleich zu unbehandelten korrespondierenden RAP40/7-Zellkulturstadien akkumulierten ABA-behandelte Zellstrukturen am 14. Kulturtag geringere oder annähernd identische Mengen des Antikörpers, zwischen dem 21. und 65. Kulturtag größere und zum Zeitpunkt der Regeneration geringere Antikörpermengen (Daten nicht gezeigt).

Die anti-ABA scFv-Akkumulation konnte auch in Blättern regenerierter Pflanzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die semiquantitative Analyse der scFv-Akkumulation in den Zellstrukturen eines Kulturansatzes ergab einen anti-ABA scFv-Anteil von 0,17% (Protoplasten) bis zu etwa 2% (21d+ABA) des extrahierten Proteins (Tab. 4).

**Tab. 4.** Prozentualer Anteil des anti-ABA scFv-Gehaltes am extrahierten Protein von Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie RAP40/7. 1,5µM ABA wurden ab 10. Kulturtag appliziert.

Tag der <i>in vitro</i> Kultivierung	Akkumulation des anti- ABA scFv in % extrahiertes Protein
0d	0,17
3d	0,5
6d	1,2
10d	1,7
21d	1
21d +ABA	2,05

Das anti-Oxazolon scFv wurde in allen untersuchten Zellkulturstadien der Kontrolllinie Np9-41/4 akkumuliert (Abb. 17B). Die Akkumulation des rekombinanten anti-Oxazolon scFv verlief vergleichbar der anti-ABA scFv-Akkumulation. Bis zum 21. Tag wurden steigende Mengen des anti-Oxazolon scFv angereichert. Die Akkumulation blieb bis zum 28. Kulturtag auf diesem hohen Niveau und fiel zum 35. Kulturtag wieder ab.

Im Gegensatz zur anti-ABA scFv-Akkumulation traten bis zum 21. Kulturtag kaum Schwankungen zwischen den individuellen Kulturansätzen bzw. in Abhängigkeit von der ABA-Behandlung auf. Am 35. Kulturtag akkumulierten ABA-behandelte Zellkulturstadien höhere Antikörpermengen.

Fluridonbehandlung führte zur verringerten Akkumulation des anti-Oxazon Antikörpers ab dem 21. Kulturtag. Am 35. Tag der *in vitro* Kultivierung konnte kein Antikörper nachgewiesen werden.

Durch die Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die anti-ABA scFv- bzw. anti-Oxazon scFv-Akkumulation obgleich vom Zustand der Zellkultur abhängig, vorrangig entwicklungsabhängig reguliert wurde.

### 3.5.2. Gewebespezifische anti-ABA scFv-Akkumulation in Pflanzen

Der anti-ABA scFv-Antikörper wurde in Pflanzen der Linie RAP40/7 in nahezu allen Geweben exprimiert. Die höchste Akkumulation des Transgens wurde in sich entwickelnden Geweben gefunden (Abb. 18).

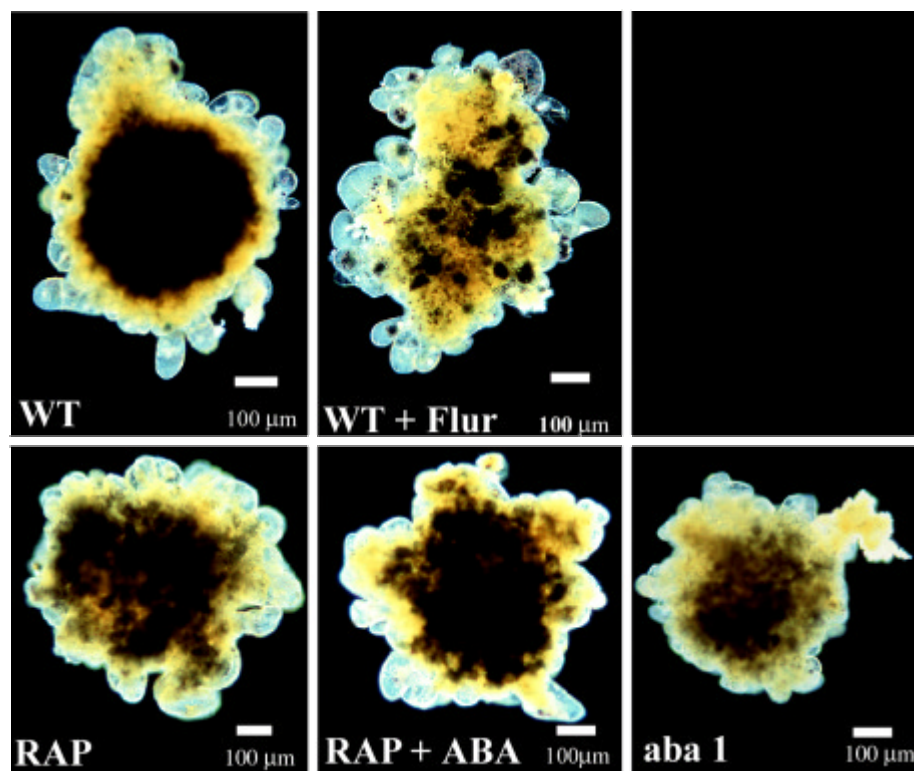


**Abb. 18.** Akkumulation des anti-ABA scFv in Geweben transgener Pflanzen der Linie RAP40/7. Alle Proben stammten von einer vollständig entwickelten Pflanze zu Blühbeginn. Getestet wurden junge (jB), mittlere (mB) und alte (aB) Blätter, unterschiedliche Entwicklungsstadien der Blüte (B1 – 8mm, B2 – 15mm, B3 – 25mm, B4 – vollentwickelte Blüte, S1 – S3 – Blüten 1-3 Tage nach Bestäubung), Haupt- (Hw) und Nebenwurzel (Nw) sowie der Stängel (St). 10µg Proteinextrakt pro Bahn wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Samenextrakte anti-ABA scFv exprimierender Pflanzen wurden als Positivkontrolle (P), Wildtyp Blattextrakte als Negativkontrolle (N) verwendet. Im Western Blot wurde die scFv durch anti-myc Antikörper und anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat mittels Chemilumineszenz nachgewiesen.

So zeigten sowohl Blütenstadien unterschiedlicher Entwicklung als auch Nebenwurzeln die höchste Akkumulation, während in jungen und mittleren Blättern im Stängel und in der Hauptwurzel geringere Antikörpermengen nachgewiesen wurden. In alten Blättern wurde das anti-ABA scFv nicht akkumuliert.

### 3.6. Akkumulation von Stärke und Speicherproteinen in somatischen Embryonen

Im Verlauf der Samenentwicklung werden Reservestoffe wie Stärke, Proteine und Öle gespeichert. Da ABA die Akkumulation von Reservestoffen beeinflusst (Kermode 1990), wurde der Stärkeakkumulation in Abhängigkeit von ABA-Mangel untersucht.



**Abb. 19.** Stärkeakkumulation in somatischen Embryonen des 21. Tages der *in vitro* Kultivierung. Wildtyp – dichte globuläre Struktur mit hohem Stärkeanteil in den zentralen Zellen, Wildtyp behandelt mit 1μM Fluridon – geringe Stärkemenge, RAP40/7 – Zellstruktur mit deutlich verringerter Stärkeakkumulation im Vergleich zum Wildtyp, kleine Amyloplasten, RAP40/7+ABA (1,5μM, ab Tag 10) – vermehrte Stärkeakkumulation im Zentrum des Embryos, *aba1*: Zellstruktur mit geringer Speicherspeicherung. Zellstrukturen wurden in einem Eisessig/Ethanol-Gemisch (1:3) fixiert, Quetschpräparate mit Lugol'scher Lösung behandelt und mikroskopisch im Dunkelfeld analysiert.

Stärkeakkumulation konnte in Zellstrukturen des 21. Kulturtages nachgewiesen werden (Abb. 19). Dabei zeigten die immunmodulierte Linie RAP40/7 und die ABA-Biosynthesemutante *aba1* Differenzen in der Speicherstoffakkumulation im Vergleich zum Wildtyp. Während das kompakte Zentrum des Wildtypembryos, charakterisiert durch kleinvolumige Zellen, in diesem Stadium große Mengen an Stärke akkumulierte, enthielten Strukturen der transgenen Linie RAP40/7 wesentlich geringere Stärkemengen. Dagegen wiesen Strukturen der transgenen Linie, die in Gegenwart von ABA kultiviert wurden, verstärkte Speicherung

auf. Stärkeakkumulation wurde auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Zellstrukturen des Wildtyps und der transgenen Linie RAP40/7 am 50. Kulturtag nachgewiesen (vgl. Abb. 13). In diesem Entwicklungsstadium waren Amyloplasten jedoch nicht in Zellen embryogener Zentren lokalisiert. Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie enthielten weniger Amyloplasten als der Wildtyp und RAP40/7 nach Normalisierung durch ABA. Diese Beobachtung bestätigte eine Normalisierung der morphogenetischen Entwicklung von Zellstrukturen der immunmodulierten Linie durch ABA-Komplementation auf ultrastrukturellem Niveau.

Dass ABA-Mangel tatsächlich für die verringerte Stärkeakkumulation verantwortlich war, wurde auch durch Untersuchung von Zellstrukturen der ABA-Biosynthesemutante *aba1* und des fluridonbehandelten Wildtyps des 21. Kulturtages gezeigt. In beiden Fällen konnten geringere Stärkemengen nachgewiesen werden.

Speicherproteinakkumulation wurde in Zellstrukturen aller untersuchten Linien ab 10. Kulturtag gefunden (Daten nicht gezeigt). Nach ABA-Komplementation der ABA-defizienten Linien deutet sich eine Verschiebung des Untereinheitenmusters des Legumins an. In Wildtyp und ABA-komplementierten Zellstrukturen wird vorrangig die größere Untereinheit des Legumins gebildet (Daten nicht gezeigt).

### **3.7. Entwicklungsabhängige Induzierbarkeit kleiner Hitzeschockproteine in somatischen Embryonen**

Die Induzierbarkeit und Expression kleiner Hitzeschockproteine während der somatischen Embryogenese wurden aus zwei Gründen untersucht. Zum einen werden kleine Hitzeschockproteine konstitutiv in späten Stadien der Samenentwicklung exprimiert und sind deshalb für Embryonen in Reifestadien typisch (Wehmeyer et al. 1996, Waters et al. 1996). Zum anderen wurden für somatische Embryonen HSP-Expressionsmuster gefunden, die für bestimmte Entwicklungsstadien charakteristisch sind (Zimmermann et al. 1989, Györgyey et al. 1991).

Die Expression der kleinen Hitzeschockproteine hsp17 wurde in verschiedenen Stadien der somatischen Embryogenese durch Hitzestress induziert und die Stressantwort vergleichend analysiert. Außerdem wurden ABA- bzw. Fluridon-Einfluss auf die Stressantwort getestet. Die Stressinduktion erfolgte für Protoplasten bzw. differenzierte Zellstrukturen wie unter 2.2.8. beschrieben.

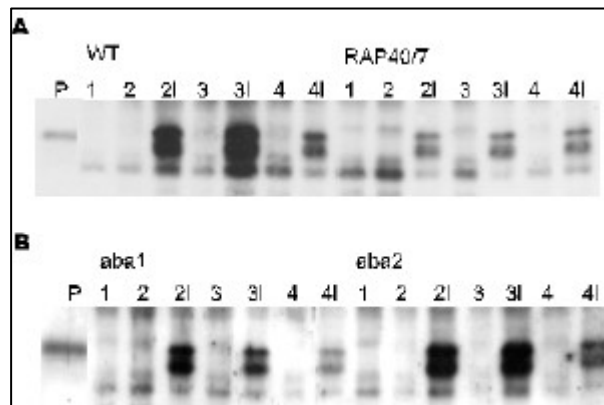
Wildtypprotoplasten zeigten eine hohe Induzierbarkeit der hsp17-Proteine durch Hitzestress (Abb. 20). Während eine kurzzeitige ABA-Behandlung der Protoplasten (3h) zu einer



erhöhten Induzierbarkeit der kleinen Hitzeschockproteine führte, konnten nach längerer ABA-Behandlung (24h) nur geringe hsp-Mengen nach Hitzestress nachgewiesen werden.

*In vitro* kultivierte Protoplasten der ABA-Biosynthesemutanten zeigten eine ähnlich hohe bzw. erhöhte Stressantwort, die durch ABA-Behandlung reduziert wurde.

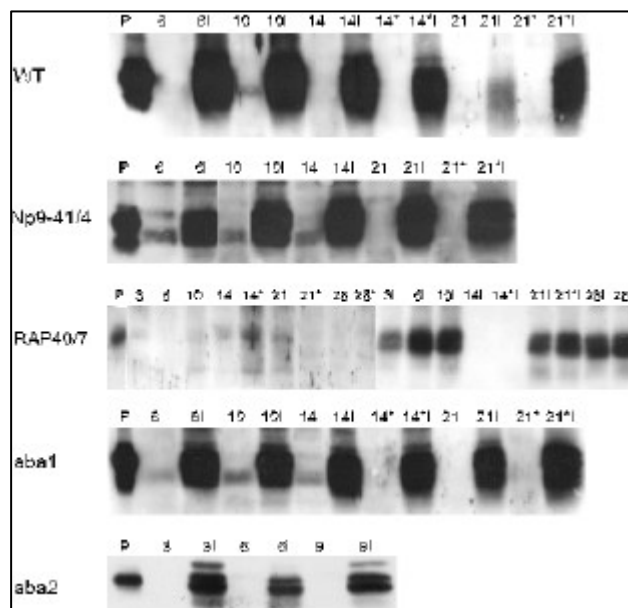
Protoplasten der transgenen Linie RAP40/7 wiesen nach Stressoreinfluss die geringsten Mengen an hsp17 auf. Eine Abhängigkeit der Stressantwort von der ABA-Behandlung wurde nicht gefunden.



**Abb. 20.** Einfluss von ABA auf die hitzestressinduzierte hsp17-Expression in Protoplasten. A: Wildtyp, RAP40/7, B: *aba1*, *aba2*. Proben: 1 – frischisolierte Protoplasten, 2 – Protoplasten 24h *in vitro* Kultur, unbehandelt, 3 – Protoplasten 21h *in vitro* Kultur unbehandelt + 3h 1,5μM ABA, 4 – Protoplasten 24h *in vitro* Kultur 1,5μM ABA. Die hitzeschockinduzierten Proben sind mit (i) gekennzeichnet. 20μl eines Laemmli-Extraktes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Ein hsp17 angereicherter Extrakt einer Hitzestress-behandelten Tomatensuspensionskultur (Dr. zur Nieden, IPB Halle) wurde als Positivkontrolle (P) eingesetzt. hsp17 wurde mit Hilfe eines anti-hsp17-Antikörpers und eines anti-Maus IgG POD-Konjugates mittels Chemilumineszenz nachgewiesen.

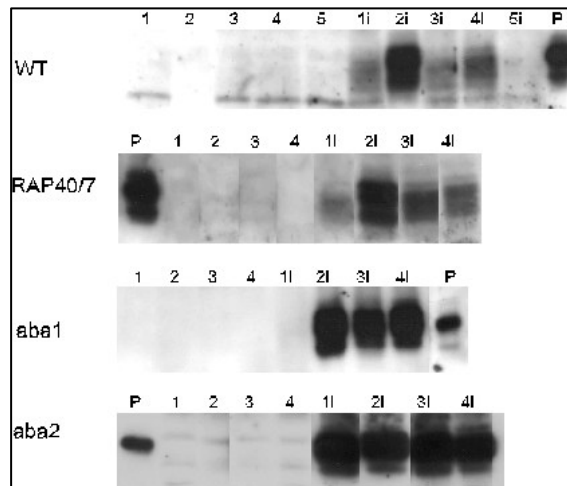
Die Induzierbarkeit der hsp17-Expression durch Hitzestress veränderte sich im Verlauf der Zellkultur (Abb. 21) nur geringfügig. Während der *in vitro* Kultivierung des Wildtyps stieg die akkumulierte Menge der hsp17-Proteine nach Hitzestressbehandlung bis zum 10. Kulturtag an und nahm bis zum 21. Kulturtag ab. Zellstrukturen der anti-Oxazolon scFv exprimierenden Kontrolllinie Np9-41/4 akkumulierten bis zum 21. Kulturtag steigende hsp17-Mengen nach Stressbehandlung. Ein entwicklungsabhängiger Anstieg der hsp17-Expression nach Stressorbehandlung war in Zellkulturstadien der ABA-Biosynthesemutante *aba1* nachzuweisen, wenn auch weniger deutlich. hsp17 konnte in den Zellkulturstadien des 3., 6., 10. und 21. Kulturtages der transgenen Linie RAP40/7 durch Hitzestress induziert werden. Stressbehandlung von Zellkulturstadien des 14. Kulturtages führte nicht zu hsp17-Expression.

Nach ABA-Behandlung ab 10. Kulturtag zeigten Kulturstadien des 21. Kulturtages bis auf Np9-41/4 eine erhöhte hsp17-Induzierbarkeit nach Stressoreinfluss.



**Abb. 21.** Entwicklungsabhängige Regulation der Induzierbarkeit von hsp17 während der somatischen Embryogenese. Wildtyp, Np9-41/4, RAP40/7, *aba1*, *aba2*. Getestet wurden Zellkulturstadien des 3., 6., 10., 14., 21. und 28. (nur RAP40/7) Kulturtages. 15µg (RAP40/7) bzw. 20µg (WT, Np9-41/4, *aba1*, *aba2*) Proteinextrakt pro Bahn wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Hitzestressinduzierte Proben sind mit (i) gekennzeichnet, ABA-behandelte Proben mit (\*). Ein hsp17 angereicherter Extrakt einer Hitzestress-behandelten Tomatensuspensionskultur (Dr. zur Nieden, IPB Halle) wurde als Positivkontrolle (P) mitgeführt. hsp17 wurde mit Hilfe eines anti-hsp17-Antikörpers und eines anti-Maus IgG POD-Konjugates mittels Chemilumineszenz nachgewiesen.

Der Einfluss von ABA auf die Stressantwort von Zellkulturstadien des 21. Kulturtages wurde detaillierter untersucht (Abb. 22). Obgleich individuelle Kulturansätze nach Phytohormonapplikation graduelle Unterschiede in der Stressantwort aufwiesen, bewirkte ABA aber in jedem Fall eine reproduzierbare Veränderung der Hitzeschockinduzierbarkeit. Am 21. Kulturtag exprimierten Zellstrukturen des Wildtyps, der transgenen Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutante geringe Mengen hsp17 nach Hitzestressbehandlung, während in Zellstrukturen der ABA-Biosynthesemutanten *aba2* größere Mengen nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 22.** Einfluss von ABA und Fluridon auf die Stressinduktion der hsp17-Expression in Zellstrukturen des 21. Kulturtages. Wildtyp, RAP40/7, *aba1*, *aba2*, 1 – unbehandelt, 2 – ABA-Gabe ab 10. Kulturtag, 3 – 3h 1,5µM ABA, 4 – 24h 1,5µM ABA, 5 – Fluridon-Gabe ab 10. Kulturtag. 5µg (*aba1*), 10µg (WT) bzw. 20µg (RAP40/7, *aba2*) Proteinextrakt pro Bahn wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Hitzeschockbehandelte Proben sind mit (i) gekennzeichnet. Ein hsp17 angereicherter Extrakt einer Hitzestress-behandelten Tomatensuspensionskultur (Dr. zur Nieden, IPB Halle) wurde als Positivkontrolle (P) eingesetzt. hsp17 wurde mit Hilfe eines anti-hsp17-Antikörpers und eines anti-Maus IgG POD-Konjugates mittels Chemilumineszenz nachgewiesen.

ABA-Behandlung von 3h oder 24h führte in Wildtyp- und RAP40/7-Kulturstadien zu keiner signifikanten Änderung der hsp17-Expression nach Hitzeschock. Kulturstadien der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* reagierten mit gesteigerter und *aba2* mit gleichbleibender oder verringerter hsp17-Akkumulation auf Hitzeschock nach 3h bzw. 24h Inkubation in ABA-haltigem Medium.

Die ABA-Komplementierung des Kulturmediums ab dem 10. Tag hatte nach Hitzestress einen drastischen Anstieg der exprimierten hsp17-Menge in Zellstrukturen, des Wildtyps, der Linie RAP40/7 und *aba1* zur Folge. Im Gegensatz dazu war in ABA-komplementierten Zellstrukturen der Linie *aba2* weniger hsp17 nachweisbar (Abb. 22).

In Wildtypkulturen, die mit dem ABA-Biosyntheseinhibitor Fluridon behandelt wurden, konnten durch Hitzestress die kleinen Hitzeschockproteine nicht oder nur in geringen Mengen induziert werden.

In allen Kontrollproben ohne Hitzestress einschließlich frischisolierter Protoplasten konnte keine hsp17-Expression nachgewiesen werden. Die anti-ABA scFv-Expression der Linie

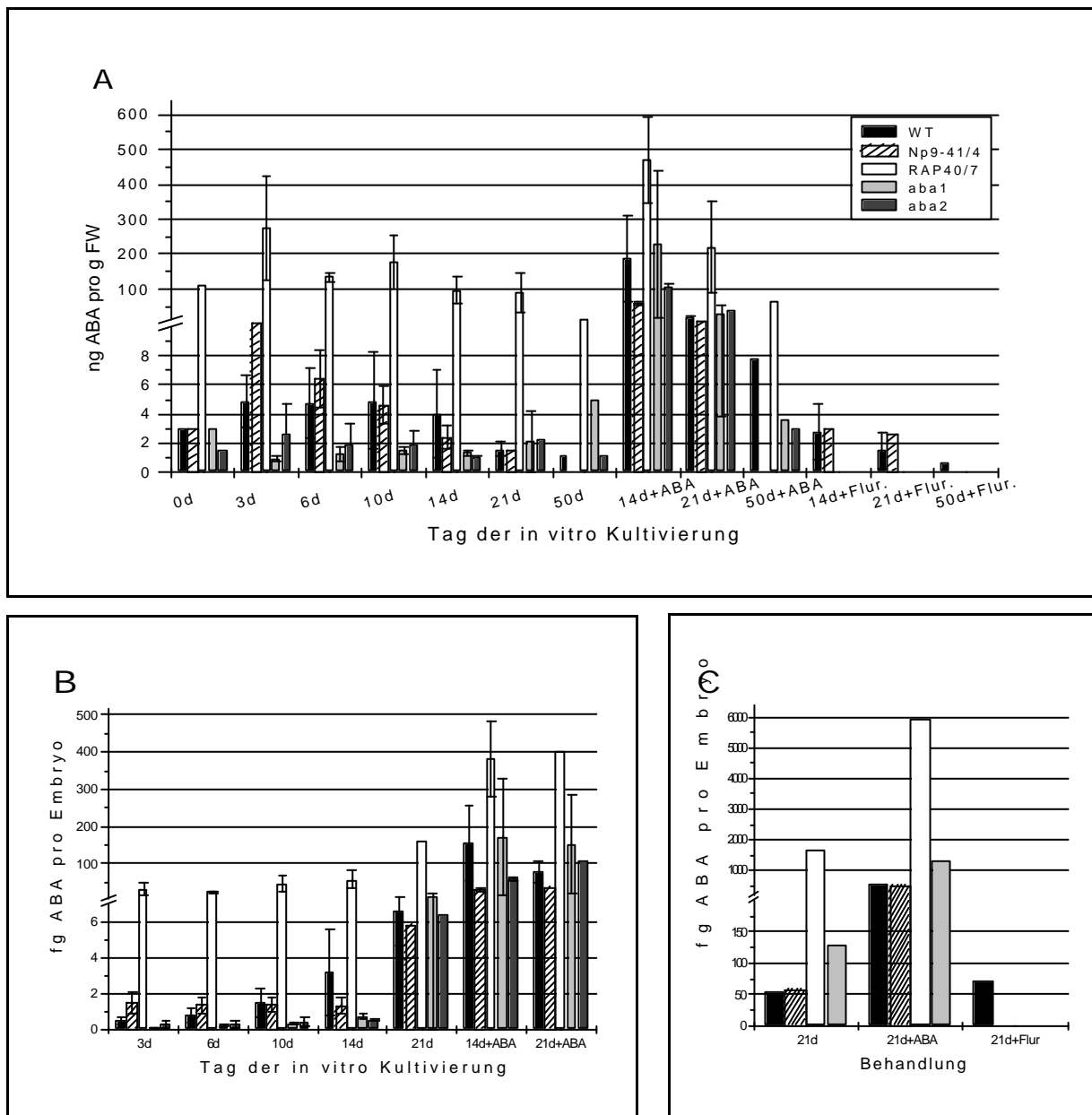
RAP40/7 wurde durch Hitzestress nicht verändert (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit Zimmermann et al. (1989) konnte durch Untersuchungen der Stressantwort in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium somatischer Embryonen gezeigt werden, dass die Induzierbarkeit der hsp17-Synthese entwicklungsabhängig reguliert wurde. Die ABA-Applikation sowohl zu Protoplasten als auch zu Zellkulturstadien des 21. Kulturtages führte zu einer Veränderung der Stressantwort, wobei Protoplasten wesentlich sensitiver auf die Phytohormongabe reagierten. Die verringerte hsp17-Induzierbarkeit in Protoplasten nach langzeitiger ABA-Behandlung korrelierte mit der Hemmung der Zellteilung und -differenzierung, die nach ABA Komplementierung des Kulturmediums ab Tag 0 beobachtet wurde. Die erhöhte Induzierbarkeit der kleinen Hitzeschockproteine am 21. Kulturtag nach ABA-Behandlung war ein weiterer Hinweis, dass ABA die Embryoentwicklung auf biochemischem Niveau beeinflusst.

### 3.8. ABA-Akkumulation während der somatischen Embryogenese

Durch Bestimmung der ABA-Akkumulation in Zellstrukturen unterschiedlicher Kulturstadien sollte der ABA-Gehalt in Abhängigkeit von der somatischen Embryoentwicklung ermittelt werden. Daraus war abzuleiten, inwieweit Korrelationen zwischen den beobachteten morphogenetischen Veränderungen der immunmodulierten Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* und ihrem endogenen ABA-Gehalt bestehen. Außerdem sollte der Einfluss der ABA-Komplementation auf die ABA-Gehalte der Strukturen in den behandelten Kulturen analysiert werden.

Die im ELISA ermittelten ABA-Mengen aus Zellkulturextrakten wurden auf g Frischgewicht bezogen (Abb. 23A). Da bei dieser Kalkulation die Zunahme des Frischgewichtes des Einzelembryos keine Berücksichtigung fand, bezogen sich die so ermittelten Werte auf unterschiedliche Embryonenzahlen. Deshalb waren auf dieser Basis nur begrenzt Aussagen möglich. Die ABA-Menge pro g Frischgewicht schien im Verlauf der *in vitro* Kultivierung abzunehmen oder sich nur unwesentlich zu verändern (Abb. 23A). Deutliche Unterschiede im ABA-Gehalt bestehen jedoch zwischen Wildtyp und den ABA-Biosynthesemutanten inklusive der transgenen Linie RAP40/7. Während Zellstrukturen der ABA-Biosynthesemutanten signifikant niedrigere ABA-Gehalte als der Wildtyp aufwiesen, waren diese in RAP40/7-Zellstrukturen wesentlich höher als in Wildtypzellstrukturen. Drastische Erhöhung des ABA-Gehaltes wurde für alle Proben nach Applikation des Phytohormons erhalten.

Um einen realen Bezug zwischen ABA-Menge und Zellstruktur in der somatischen Embryogenese herzustellen, wurden die ABA-Gehalte pro Einzelembryo kalkuliert (Abb. 23B). Die Kalkulation erfolgte unter Verwendung der ermittelten Frischgewichte (vgl. Abb. 15) bei Annahme einer 100%igen Regenerationseffizienz, d.h. jeder *in vitro* kultivierte Protoplast differenzierte zu einer embryogenen Zellstruktur. Da die tatsächliche Regenerationseffizienz aus technischen Gründen nicht für alle Stadien bestimmt wurde, jedoch kleiner 100% war, konnte auch durch diese Kalkulation nur der Trend, nicht aber der absolute ABA-Gehalt pro Zellstruktur erfasst werden.



**Abb. 23.** ABA-Akkumulation während der somatischen Embryogenese. A: ABA-Gehalte in ng pro g Frischgewicht, B: ABA-Gehalt pro Zellstruktur bei 100%iger Regenerationseffizienz, C: ABA-Gehalt pro Zellstruktur kalkuliert auf Basis der realen Regenerationseffizienz (Tab. 3)

Im Verlauf der somatischen Embryogenese des Wildtyps nahm der ABA-Gehalt kontinuierlich zu. Während der ABA-Gehalt in *in vitro* Zellkulturen der ABA-Biosynthesemutanten und der transgenen Linien bis zum 14. Kulturtag nur geringfügig anstieg, konnten am 21. Kulturtag drastisch erhöhte ABA-Mengen nachgewiesen werden. Demzufolge findet während der Entwicklung und Differenzierung vom Protoplasten zur embryogenen Zellstruktur ABA-Synthese statt.

Zwischen den ABA-Gehalten von Wildtypstrukturen und anti-Oxazolon scFv exprimierender Np9-41/4-Strukturen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Die Zellstrukturen der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* bzw. *aba2* enthielten in frühen Stadien bis zum 14. Kulturtag signifikant geringere Mengen ABA als der Wildtyp. *aba1*- bzw. *aba2*-Zellstrukturen akkumulierten zwischen 20 und 27,5% bzw. 17 und 52% des ABA-Gehaltes von entsprechenden Wildtypstrukturen, vom 14. bis zum 21. Kulturtag hingegen vergleichbare ABA-Mengen wie der Wildtyp.

Die anti-ABA scFv exprimierende Linie RAP40/7 produzierte in allen Stadien signifikant mehr ABA als der Wildtyp. So enthielten Zellstrukturen am 3. Kulturtag 61x mehr ABA. Bis zum 14. Kulturtag fiel das Verhältnis der ABA-Gehalte von Wildtyp- und RAP40/7-Zellstrukturen auf 1:18. Am 21. Tag der *in vitro* Kultivierung akkumulierten RAP40/7-Strukturen jedoch wieder 24x mehr ABA als der Wildtyp.

Die ABA-Komplementierung der Zellstrukturen ab 10. Tag der *in vitro* Kultivierung führte in allen untersuchten Kulturen zu einem signifikanten Anstieg des ABA-Gehaltes ab 14. Kulturtag. Dabei war der ABA-Gehalt von Zellstrukturen des Wildtyps und *aba1* vergleichbar, während Np9-41/4- und *aba2*-Zellstrukturen nur etwa ein Fünftel bzw. ein Drittel der ABA-Mengen enthielten. Nach ABA-Behandlung akkumulierten RAP40/7-Zellstrukturen am 14. Kulturtag 2,5x mehr ABA als entsprechende Wildtypstrukturen. In Kulturen der ABA-Biosynthesemutante *aba1*, der transgenen Linie RAP40/7 und Np9-41/4 blieben die ABA-Gehalte bis zum 21. Kulturtag auf diesem hohen Niveau, während sie bei korrespondierenden Wildtypstrukturen auf etwa die Hälfte sank. In *aba2*-Zellstrukturen nahm die akkumulierte ABA-Menge zwischen dem 14. und 21. Tag zu.

Nach ABA-Gabe waren die Unterschiede zwischen ABA-behandelten Kulturen des Wildtyps und der transgenen Linie RAP40/7 geringer als in unbehandelten Kulturen. ABA-behandelte RAP40/7-Kulturen akkumulierten 2,5x (14d) bzw. 5,2x (21d) mehr ABA in Zellstrukturen als der Wildtyp.

Während die Applikation des Biosyntheseinhibitors Fluridon zu Wildtypkulturen nur eine geringfügige Erniedrigung des ABA-Gehaltes bewirkte (Abb. 23A), wurden in RAP40/7-

Zellstrukturen nach Fluridonbehandlung drastisch verringerte ABA-Gehalte gefunden (Daten nicht gezeigt). Dieser Fakt spricht dafür, dass Fluridon als ABA-Biosyntheseinhibitor während der *in vitro* Zellkultur wirkte und ABA-Mangel verursachte.

Die Kalkulation des ABA-Gehaltes von Zellstrukturen auf der Basis einer 100%igen Regenerationseffizienz der Systeme zeigte, dass die ABA-Akkumulation in Zellstrukturen aller untersuchten Linien entwicklungsabhängig reguliert wurde. Da die tatsächliche Regenerationseffizienz aber wesentlich geringer als 100% war und von der untersuchten Linie, dem individuellen Kulturansatz und der ABA- bzw. Fluridonbehandlung abhing, konnte nur auf Basis der ermittelten Regenerationseffizienz (vgl. Tab. 3) der tatsächliche ABA-Gehalt der Zellstrukturen kalkuliert werden. Aus technischen Gründen konnten Regenerationseffizienzen allerdings nur für den 21. Kulturtag bestimmt werden. Die in Abbildung 22C dargestellten Werte wurden aus der Zahl der Zellstrukturen pro g Frischgewicht auf der Basis der realen Regenerationseffizienz berechnet. Aufgrund der Abhängigkeit der Regenerationseffizienz von den oben beschriebenen Faktoren wurden nur die Kulturen mit experimentell ermittelten Regenerationseffizienzen in die Kalkulation einbezogen.

Bereits die Bonitierung der Zellmorphogenese dokumentierte, dass *aba1*-Zellstrukturen wesentlich größer sind als Wildtypstrukturen. Analog verhielten sich Frischgewichtszunahme (Abb. 16) und ABA-Gehalte pro Embryo (Abb. 23C). Der ABA-Gehalt der *aba1*-Zellstrukturen lag 2,5x höher im Vergleich zum Wildtyp. RAP40/7-Zellstrukturen enthielten 30x mehr ABA als der Wildtyp.

Nach ABA-Behandlung akkumulierten *aba1*-Zellstrukturen am 21. Kulturtag signifikant mehr ABA als der Wildtyp. Die Unterschiede zwischen den akkumulierten ABA-Mengen in Wildtyp- und RAP40/7-Zellstrukturen nach ABA-Behandlung waren ebenfalls größer als auf Basis einer 100%igen Regenerationseffizienz kalkuliert.

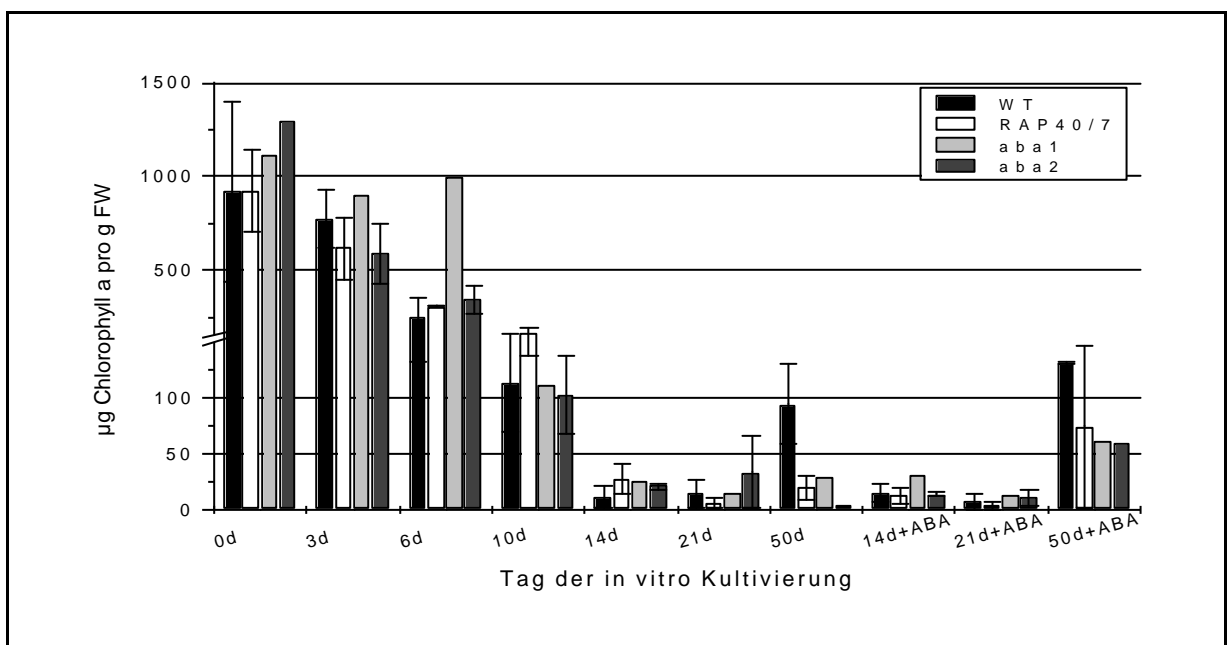
Fluridonbehandlung von Wildtypzellkulturen hatte keinen Einfluss auf die akkumulierte ABA-Menge.

Während der somatischen Embryogenese akkumulierten Kulturstadien der ABA-defizienten Mutanten bis zum 14. Kulturtag geringere Mengen und in späteren Stadien vergleichbare ABA-Mengen wie der Wildtyp. In Zellstrukturen der immunmodulierten Linie wurden deutlich höhere ABA-Mengen nachgewiesen. Die Zugabe von ABA führte zur signifikanten Erhöhung des ABA-Gehaltes in allen Strukturen.

### 3.9. Entwicklungsabhängige Regulation der Pigmentakkumulation während der somatischen Embryogenese

Unterschiedliche Stadien der somatischen Embryogenese wurden mittels HPLC-Analyse auf ihren Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt untersucht. Die Zeaxanthin-, Neoxanthin- und Violaxanthin-Gehalte waren dabei von besonderem Interesse, da diese Pigmente neben ihrer Funktion in der Lichtabsorption für die Photosynthese auch Vorstufen der ABA-Biosynthese sind. Dabei war zu prüfen, ob Carotinoid- und Chlorophyllakkumulation zur Charakterisierung der Morphogenese der Zellstrukturen während der somatischen Embryogenese herangezogen werden können.

Die entwicklungsabhängige Regulation der Pigmentakkumulation in unterschiedlichen Zellkulturstadien der somatischen Embryogenese wird am Beispiel des Chlorophylls a (Abb. 24) demonstriert. Protoplasten enthielten die größten Mengen Chlorophyll a. Im Verlauf der *in vitro* Protoplastenkultur der untersuchten Linien nahm der Gehalt an Chlorophyll a pro g Frischgewicht der Zellkultur ab. Wildtyp- und *aba2*-Zellstrukturen enthielten am 21. Kulturtag größere Mengen Chlorophyll a, während in Strukturen identischer Kulturstadien der transgenen Linie RAP40/7 und der ABA-defizienten Mutanten der Chlorophyll a-Gehalt weiter abnahm. Der Chlorophyll a-Gehalt von Wildtypzellstrukturen stieg bis zum 50. Kulturtag deutlich an. *aba1*- und RAP40/7-Zellstrukturen akkumulierten zwischen dem 21. und 50. Kulturtag nur geringfügig mehr Chlorophyll a, in *aba2*-Zellstrukturen nahm der Chlorophyll a-Gehalt ab.



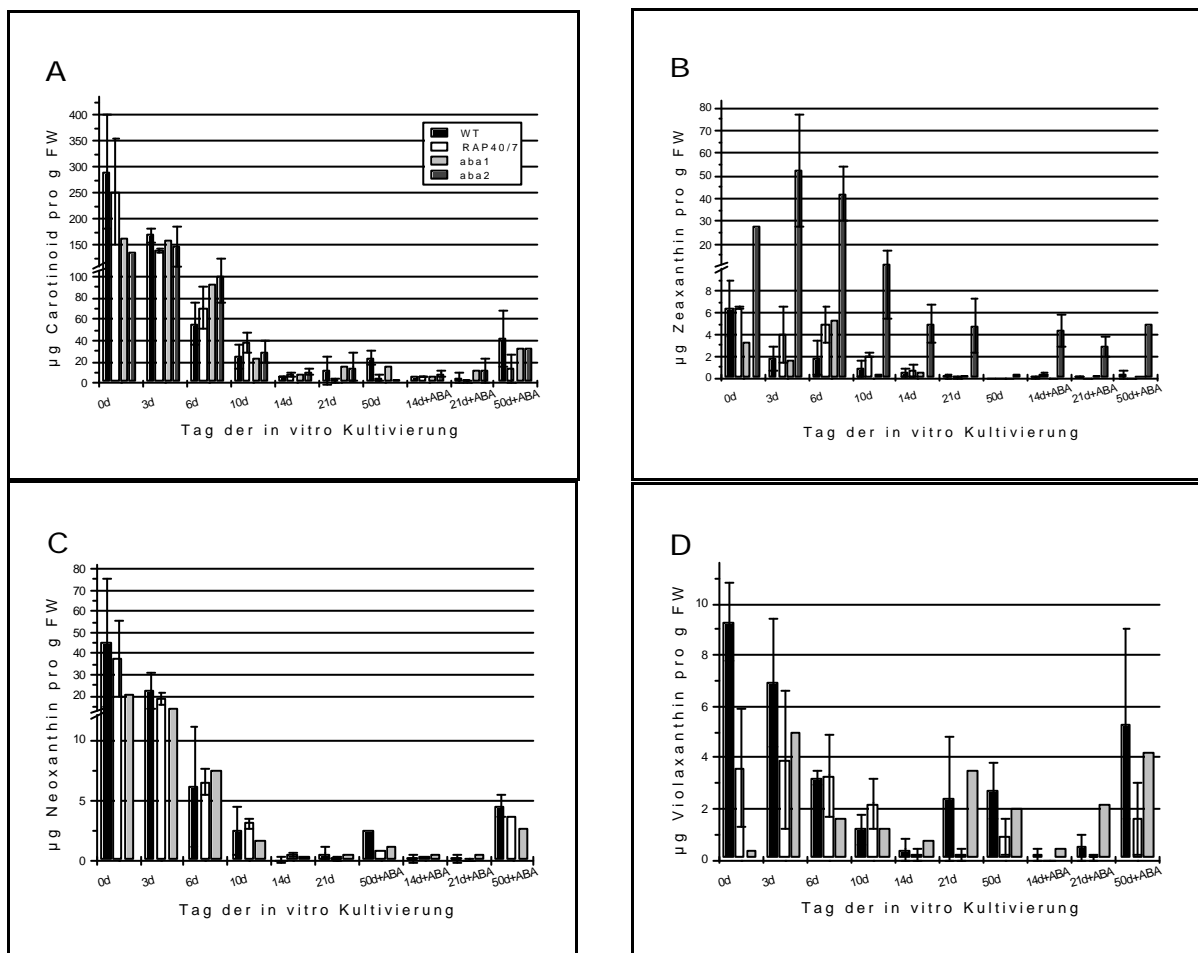
**Abb. 24.** Entwicklungsabhängige Regulation des Chlorophyll a-Gehaltes während der somatischen Embryogenese



Signifikante Unterschiede im Chlorophyll a-Gehalt wurden nach ABA-Komplementierung für ABA-defiziente Linien gefunden. Globuläre Strukturen des Wildtyps enthielten am 50. Kulturtag unabhängig von der ABA-Behandlung vergleichbare Mengen an Chlorophyll a. In ABA-komplementierten Zellstrukturen der immunmodulierten Linie und der ABA-Biosynthesemutanten wurden dagegen deutlich höhere Chlorophyllgehalte im Vergleich zu unbehandelten korrespondierenden Kulturen gefunden.

Wird jedoch der Chlorophyllgehalt wie unter 3.8. beschrieben auf den Einzelembryo bezogen, stieg in allen untersuchten Linien der Gehalt an Chlorophyll a in den Zellstrukturen zum 21. Kulturtag wieder an (Daten nicht gezeigt). Dieser Anstieg kann als Hinweis auf stattfindende Differenzierungsprozesse gewertet werden.

Im Verlauf der *in vitro* Kultivierung zeigte der Gesamtcarotinoidgehalt in den Zellstrukturen einen dem Chlorophyll a-Gehalt vergleichbaren Trend (Abb. 25A).



**Abb. 25.** Entwicklungsabhängige Regulation des Carotinoidgehaltes während der somatischen Embryogenese.

A: Gesamtcarotinoid, B: Zeaxanthin, C: Neoxanthin, D: Violaxanthin

Analysen des Zeaxanthin-Gehaltes pro g Frischgewicht (Abb. 25B) ergaben für Wildtyp, RAP40/7 und *aba1* eine leichte Erhöhung nach der Protoplastierung im Vergleich zu Blättern

der *in vitro* Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Während der somatischen Embryogenese nahmen die Zeaxanthin-Mengen ab. In Wildtyp, RAP40/7 und *aba1* wurden nur geringe Zeaxanthin-Mengen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu betrug der Zeaxanthin-Gehalt in *aba2*-Zellstrukturen 20 bis 48% des Gesamtcarotinoid-Gehaltes.

Neoxanthin (Abb. 25C) konnte nur in Wildtyp-, RAP40/7- und *aba1*-Zellstrukturen nachgewiesen werden. Der Neoxanthin-Gehalt erreichte maximale Werte zu Beginn der *in vitro* Kultur, sank bis zum 14. Kulturtag, um danach wieder anzusteigen. Zwischen den untersuchten Linien waren keine signifikanten Unterschiede im Neoxanthin-Gehalt festzustellen.

Von den untersuchten Carotinoiden schwankte der Gehalt an Violaxanthin (Abb. 25D) in allen untersuchten Linien am stärksten. In *aba2*-Zellstrukturen wurde Violaxanthin nicht nachgewiesen.

Mit Ausnahme von *aba2* wurden nach ABA-Behandlung in allen Zellstrukturen des 50. Kulturtages größere Mengen Neoxanthin und Violaxanthin als in den unbehandelten Kulturen gefunden.

Im Vergleich zu *in vitro* kultivierten Pflanzen (Abb. 6) wiesen Pflanzenregenerate der Zellkulturen keine Unterschiede im Pigmentgehalt auf (Daten nicht gezeigt).

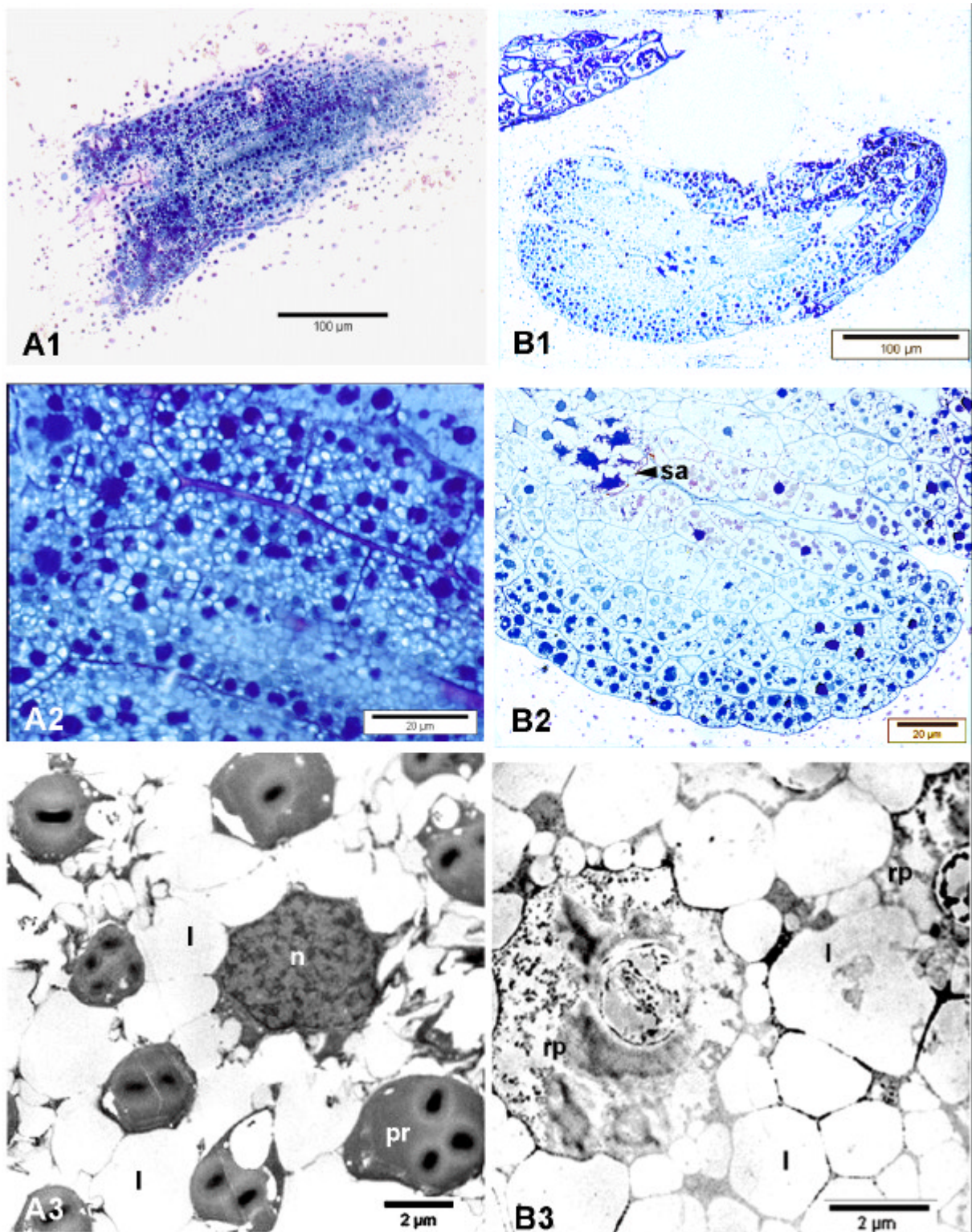
Die Pigmentgehaltanalysen zeigten, dass die Pigmentakkumulation entwicklungsabhängig reguliert wird. Normalisierung der Embryoentwicklung in Zellkulturen der ABA-defizienten Mutanten und der immunmodulierten Linie durch exogene ABA konnte auch anhand der Pigmentzusammensetzung gezeigt werden, da nach ABA-Behandlung am 50. Kulturtag vergleichbare Pigmentgehalte wie in Wildtypzellstrukturen nachgewiesen wurden.

### **3.10. Einfluss von ABA auf die Samenentwicklung**

#### **3.10.1. Ultrastruktur reifer Samen des Wildtyps und ABA-defizienter Linien**

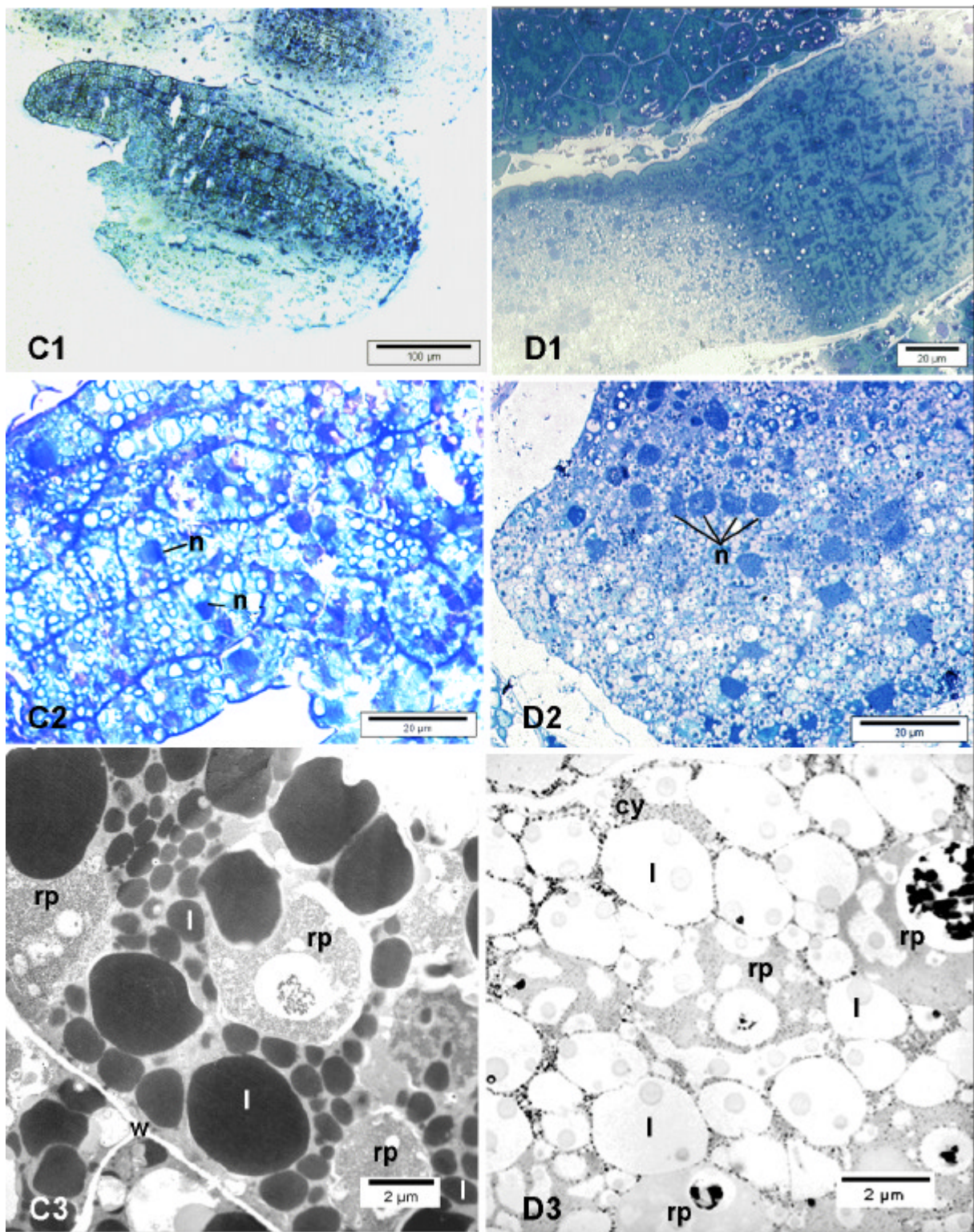
Um Unterschiede in der Embryoentwicklung des Wildtyps, der transgenen Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* nachzuweisen, wurde die Ultrastruktur der Samen analysiert.

Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass vor allem das Auftreten und die Verteilung der typischen Speicherorganellen für Reserveproteine („protein bodies“) in Embryogewebe verschieden war (Abb. 26). Während in Embryonen des Wildtyps in allen Geweben „protein bodies“ gefunden wurden, enthielten Embryonen der immunmodulierten Linie RAP40/7 nur in den äußeren Zellschichten normal ausgebildete „protein bodies“ (Abb. 26a). In inneren Zellschichten des Embryos traten hingegen nur „protein body“-Relikte auf. Embryonen der ABA-Biosynthesemutante *aba1* hatten keine oder nur Relikte von „protein bodies“ (Abb. 26b). Auffällig war das Vorkommen vieler Lipidvakuolen, deren



**Abb. 26a.** Ultrastruktur von zygotischen Embryonen des Wildtyps und der transgenen Linie RAP40/7. A: Wildtyp, 1: Embryo – Übersicht, „protein bodies“ verteilt über den gesamten Embryo, 2: „protein bodies“ in Zellen des Wildtypembryos, 3: Keimblattausschnitt– Embryo enthält normal ausgebildete „protein bodies“. B: RAP40/7, 1: Embryo – Übersicht, nur in äußeren Zellschichten normal ausgebildete „protein bodies“, in inneren Zellschichten „protein bodies“ stark degeneriert, 2: Anschnitt von Kotyledonen mit Sprossapex, 3: degenerierter „protein body“ in inneren Zellschichten des Embryos. 1, 2 – lichtmikroskopische Aufnahmen, Schnitte mit Azur-II-Methylenblau gefärbt, 3 – elektronenmikroskopische Aufnahmen. n – Nukleus, pr – „protein body“, rp – „protein body“-Relikte, l – Lipidvakuole, I – Lipidvakuole, sa – Sprossapex





**Abb. 26b.** Ultrastruktur von zygotischen Embryonen der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2*. C: *aba1*, 1: Embryo – Übersicht, keine „protein bodies“ im gesamten Embryo, 2: Anschnitt eines Keimblattes, 3: Keimblattausschnitt – „protein body“-Relikte, Lipidvakuolen mit veränderter Kontrastierung. D: *aba2*, 1: Embryo mit angrenzendem Endosperm, keine „protein bodies“ im gesamten Embryo, 2: Ausschnitt aus Keimwurzel – „protein bodies“ am stärksten degeneriert, 3: Zellen der Keimwurzel – stark degenerierte „protein bodies“. 1, 2 – lichtmikroskopische Aufnahmen, Schnitte mit Azur-II-Methylenblau gefärbt, 3 – elektronenmikroskopische Aufnahmen. rp – „protein body“-Relikte, l – Lipidvakuole, w – Zellwand, cy – Cytoplasma

Kontrastierung sich von Lipidvakuolen der Samen aller anderen untersuchten Linien unterschied. In Samen der ABA-Biosynthesemutante *aba2* waren „protein bodies“ im ganzen Embryo degeneriert, am stärksten jedoch in der Keimwurzel.

Die Untersuchungen belegen, dass ABA nicht nur die Reserveproteinakkumulation (Ackerson 1984, Kermode 1990, Phillips et al. 1997, Leps 1998) sondern auch die Bildung von „protein bodies“ beeinflusst.

### 3.10.2. Frischgewichtsveränderung während der Samenentwicklung

Unter Verwendung von Gewächshauspflanzen und Pflanzenmaterial aus der Phytokammer wurde durch Frischgewichtsanalysen der Samen verschiedener Entwicklungsstadien die Abhängigkeit der Samenentwicklung von den Kulturbedingungen der Pflanze dokumentiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Samenentwicklung durch ABA-Mangel beeinflusst wird (Tab. 5). Unter Gewächshausbedingungen war die Samenreifung nach 16 - 20 Tagen abgeschlossen, während die Samen unter Phytokammerbedingungen 24 Tage von der Bestäubung bis zur Reife benötigten.

**Tab. 5.** Analyse der Frischgewichte von Samen während der Samenentwicklung. WT (G) wurde im Gewächshaus kultiviert, alle anderen Pflanzen in der Phytokammer (PK). Das Frischgewicht wird in µg pro Samen angegeben. Die Samenanzahl pro Kapsel wurde durch Zählung von mindestens 3 Kapseln unterschiedlicher Pflanzen ermittelt.

Linie	Samenanzahl pro Kapsel	Tag nach Befruchtung					
		4DAP	8DAP	12DAP	16DAP	20DAP	24DAP
WT (G)	1227	5,5	22	30,4	17,7	n.b.	n.b.
WT (PK)	1227	n.b.	11,5	30,2	27,4	27,7	22
RAP40/7	817	6,0	18,7	28,7	26,6	31,8	26,3
<i>aba1</i>	452	4,6	14,4	16,8	24,1	29,4	27,7

Die Bestimmung der Anzahl Samen pro Kapsel ergab, dass der Wildtyp die größte Zahl an Samen bildete. Die Samenkapseln der transgenen Linie RAP40/7 enthielten deutlich weniger Samen als der Wildtyp. Die geringsten Samenzahlen pro Kapsel wurden für die ABA-Biosynthesemutante *aba1* gefunden. *aba2* konnte nicht in die Analysen einbezogen werden, da es nicht zur Ausreifung der Samen kam und nur sehr kleine nahezu samenlose Kapseln gebildet wurden.

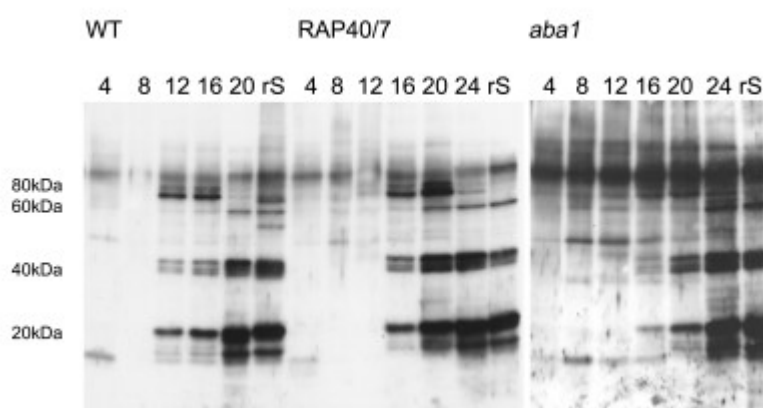
Das Frischgewicht der Samen von Gewächshauspflanzen des Wildtyps nahm bis zum 12. Tag nach der Bestäubung zu und fiel dann bis zum 16. Tag wieder ab. Samen der Wildtyppflanzen, die in der Phytokammer kultiviert wurden, erreichten ebenfalls bis zum 12. Tag

nach der Bestäubung ihr höchstes Frischgewicht, das jedoch erst nach dem 20. Tag deutlich abnahm. Verglichen mit dem Wildtyp hatten Samen der Linie RAP40/7 und *aba1* ein deutlich höheres Frischgewicht am 20. und 24. Tag.

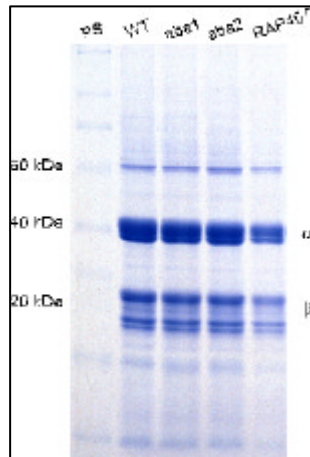
### 3.10.3. Entwicklungsabhängige Akkumulation von Reserveglobulinen, kleinen Hitzeschockproteinen hsp17 und Pigmenten während der Samenentwicklung

Die entwicklungsabhängige Akkumulation von Reserveglobulinen, von kleinen Hitzeschockproteinen hsp17 und von Pigmenten wurde in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen der Pflanzen, der untersuchten Linie und vom Samenstadium analysiert.

Akkumulation der Reserveglobuline konnte in reifenden Wildtypsamen 12 Tage nach der Bestäubung nachgewiesen werden (Abb. 27). Im Verlauf der Samenreife nahm die akkumulierte Reserveproteinmenge zu. In Samen der transgenen Linie RAP40/7 traten erst im Entwicklungsstadium 16 Tage nach Bestäubung Tabakglobuline auf, deren Menge bis zur Samenreife anstieg. *aba1*-Samen akkumulierten 16 und 20 Tage nach der Bestäubung geringere Reserveglobulinmengen als RAP40/7-Samen. Maximale Akkumulation wurde erst in reifen Samen erreicht. Unterschiede im Verlauf der Reserveglobulinakkumulation könnten auf die Wachstumsbedingungen der Pflanzen (Wildtyp Gewächshaus, RAP40/7 und *aba1* Phytokammer) zurückzuführen sein. Verglichen mit dem Wildtyp enthielten reife Samen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten *aba2* deutlich geringere Reserveglobulinmengen (Abb. 28). Diese Differenzen wurden durch Analyse der Proteinextrakte im ELISA bestätigt (Daten nicht gezeigt).

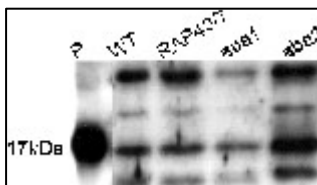


**Abb. 27.** Akkumulation der Reserveglobuline in reifenden Tabaksamen. Reserveglobulinakkumulation in Samenstadien des Wildtyps, der Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutante *aba1*. 5µg Protein (pro Bahn) der Samenstadien 4, 8, 12, 16, 20, 24 DAP (nur RAP40/7 und *aba1*) und reifer Samen (rS) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nachweis der Tabakglobuline unter Verwendung von anti-Tabakglobulin-Antikörper und anti-Kan IgG POD Konjugat mittels Chemilumineszenz.



**Abb. 28.** Akkumulation der Reserveglobuline in reifen Samen. 15 µl eines Laemmli-Extraktes wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung nachgewiesen. PS – Proteinstandard (SeeBlue™ Pre-Stained Standard).  $\alpha$ ,  $\beta$  – Polypeptidketten die Untereinheiten des 12S-Reserveproteins des Tabaks bilden.

Die entwicklungsabhängige konstitutive Expression der kleinen Hitzeschockproteine hsp17 im Samen konnte erst in Entwicklungsstadien kurz vor der Reife (20 DAP WT, 24 DAP RAP40/7, *aba1*) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die einzelnen Linien exprimierten die Proteine in unterschiedlichen Mengen. Samen von *aba1* enthielten die geringsten, *aba2* die höchsten Mengen an hsp17 (Abb. 29).



**Abb. 29.** Vergleichende Analyse der hsp17-Akkumulation in reifen Samen. Nach elektrophoretischer Auftrennung von 5 µg Protein pro Bahn wurde hsp17 unter Verwendung von anti-hsp17-Antikörper und anti-Kan IgG POD Konjugat mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Ein hsp17 angereicherter Extrakt einer Hitzestress-behandelten Tomatensuspensionskultur (Dr. zur Nieden, IPB Halle) wurde als Positivkontrolle (P) eingesetzt.

Die Analyse der Pigmentgehalte der einzelnen Samenstadien während ihrer Entwicklung ergab nur geringfügige Unterschiede zwischen den untersuchten Linien, wie in Tab. 6 am Beispiel des Gehaltes an Chlorophyll a dargestellt wird. Der Chlorophyll a-Gehalt war in jungen Samen (4 DAP) des Wildtyps (Gewächshaus) am höchsten. Während die Samen am 8. Tag nach Bestäubung nur geringe Mengen an Chlorophyll a enthielten, stieg der Chlorophyll a-Gehalt bis zum 16. Tag an und fiel mit zunehmender Reife wieder ab. Die Samen von Wildtyppflanzen, die unter Phytokammerbedingungen kultiviert wurden, enthielten in allen untersuchten Stadien weniger Chlorophyll a.



Alle untersuchten Samenstadien der transgenen Linie RAP40/7 akkumulierten mehr Chlorophyll a als die entsprechenden Stadien des Wildtyps. Allerdings wurde die Untersuchung der Pigmentgehalte der Samen in der Phytokammer kultivierter Pflanzen durch die geringe Materialmenge erschwert. Dennoch konnten auch in den untersuchten Samenstadien der ABA-Biosynthesemutante *aba1* größere Mengen an Chlorophyll a als in Wildtypsamensstadien nachgewiesen werden.

**Tab. 6.** Chlorophyll a-Gehalte der Samenstadien des Wildtyps, der transgenen Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutante *aba1*

Linie	WT Gewächshaus	WT Phytokammer	RAP40/7	<i>aba1</i>
<b>4 DAP</b>	11,5 ± 11,4	n.b.	n.b.	n.b.
<b>8 DAP</b>	0,2 ± 0,3	0	1,8 ± 0,3	0,86
<b>12 DAP</b>	1,7 ± 0,4	0,39	3,6 ± 0,1	1,87
<b>16 DAP</b>	2,3 ± 0,6	0,94	1,5 ± 0,9	1,36
<b>20 DAP</b>	0,8 ± 1,1	n.b.	1,4	n.b.
<b>reife Samen</b>	0,49	n.b.	0,99	n.b.

Durch die Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass reife Samen der immunmodulierten Linie und der ABA-Biosynthesemutante *aba2* geringere Reserveglobulinmengen enthielten. Zwischen der Akkumulation der kleinen Hitzeschockproteine und ABA-Defizienz konnte keine eindeutige Korrelation hergestellt werden. Im Vergleich zum Wildtyp enthielten Samenstadien der transgenen Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutante *aba1* mehr Chlorophyll a, sodass ein Zusammenhang zwischen ABA-Mangel, Samenentwicklung und Pigmentgehalt besteht.

### 3.10.4. ABA-Gehalt und scFv-Akkumulation während der Samenentwicklung

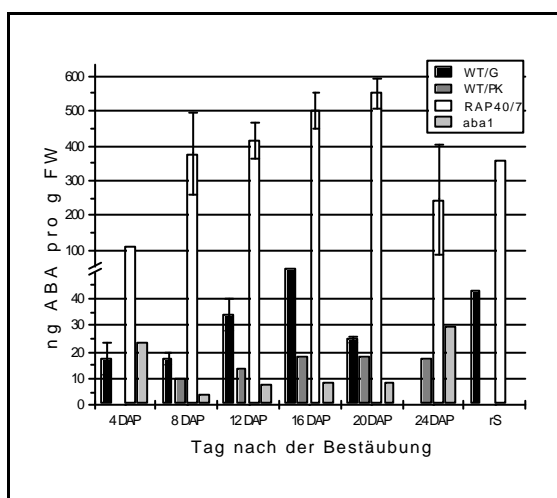
Zur Untersuchung des ABA-Einflusses auf die Samenentwicklung wurden die ABA-Mengen in Abhängigkeit vom Samenstadium der untersuchten Linien ermittelt. In Samen der immunmodulierten Linie wurde die anti-ABA scFv-Akkumulation im Verlauf der Samenentwicklung überprüft, um die Möglichkeit der Kompensation hoher ABA-Gehalte durch den Antikörper nachzuweisen. Die Akkumulation des anti-Oxazonon scFv wurde zum Vergleich analysiert.

Die ABA-Akkumulation in reifenden Samen war von den Wachstumsbedingungen der Pflanzen abhängig, wie für Wildtypsamens nachgewiesen werden konnte (Abb. 30). Samen von Wildtyppflanzen, die unter Gewächshausbedingungen kultiviert wurden, akkumulierten

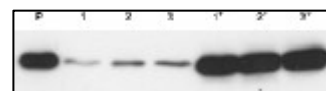


bis zum 12. bzw. 16. Tag nach Bestäubung zunehmende Mengen an ABA in Abhängigkeit von der Reifungsdauer (16 bzw. 20 Tage). In späteren Samenstadien nahm der ABA-Gehalt ab (Abb. 30). Die ABA-Analyse wurde an Samenmaterial von Wildtyppflanzen, die unter Phytokammerbedingungen kultiviert wurden, wiederholt, da von der transgenen Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutante *aba1* nur Pflanzenmaterial aus der Phytokammer zur Analyse des ABA-Gehaltes zur Verfügung stand. Die ABA-Gehalte der Samen dieser Wildtyppflanzen waren im Vergleich zu den Gewächshauspflanzen geringer. Die Samen der ABA-Biosynthesemutante enthielten vom 8. bis zum 20. Tag nach der Bestäubung geringere ABA-Mengen als der Wildtyp, am 24. Tag war die ABA-Menge hingegen größer.

In Samen der konstitutiv anti-ABA scFv exprimierenden Linie wurden die höchsten Mengen an ABA nachgewiesen. Die maximale ABA-Menge wurde nach 21 Tagen erreicht, wohingegen der ABA-Gehalt späterer Samenstadien abnahm. Um zu sichern, dass für die Analyse der ABA-Akkumulation in Samenstadien möglichst homogenes Pflanzenmaterial zur Verfügung stand, wurde die Akkumulation von scFv in Blättern und Blüten der individuellen Versuchspflanzen überprüft (Abb. 31).



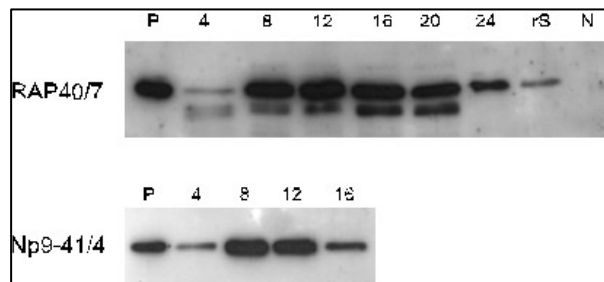
**Abb. 30.** ABA-Akkumulation während der Samenentwicklung.



**Abb. 31.** Akkumulation des anti-ABA scFv-Antikörpers in Blättern und Blüten der RAP40/7-Pflanzen 1 - 3, deren Samen für die unter 3.10.3., 4. und 5. beschriebenen Untersuchungen eingesetzt wurden. 10µg Protein wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Samenextrakte anti-ABA scFv exprimierender Pflanzen wurden als Positivkontrolle (P) eingesetzt. Der anti-ABA scFv-Antikörper wurde unter Verwendung von anti-c-myc und anti-Maus IgG POD mittels Chemilumineszenz nachgewiesen.

Der anti-ABA scFv-Antikörper wurde während der Samenentwicklung akkumuliert und ab dem 4. Tag nach der Bestäubung nachgewiesen (Abb. 32). Nach 12 Tagen wurde die höchste scFv-Akkumulation erreicht, während in späteren Entwicklungsstadien die akkumulierte scFv-Menge abnahm. Auch die Samen der Linie Np9-41/4 akkumulierten bereits am 4. Tag nach der Bestäubung anti-Oxazolon scFv. Während der anti-Oxazolon scFv-Gehalt in Samen

bis zum 12. Tag nach der Bestäubung anstieg, wurden in späteren Stadien der Samenentwicklung geringere Mengen akkumuliert.



**Abb. 32.** Akkumulation der scFv während der Samenentwicklung. RAP40/7: anti-ABA scFv-Antikörperakkumulation in Samenstadien der immunmodulierten Linie, Np9-41/4: anti-Oxazolon scFv-Akkumulation in Samenstadien, WT: Wildtyp-Kontrolle. 6µg (RAP40/7), 4µg (Np9-41/4) bzw. 10µg (WT) Proteinextrakt von Samen 4, 8, 12, 16, 20 und 24 DAP (nur RAP40/7) sowie reifer Samen (rS, nur RAP40/7) wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Samenextrakte anti-ABA scFv exprimierender Pflanzen wurden als Positivkontrolle (P), Wildtypsamenextrakt als Negativkontrolle (N) verwendet. Der scFv-Antikörper wurde nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit anti-myc und anti-Maus IgG POD Konjugat mittels Chemilumineszenz nachgewiesen.

Die Untersuchungen zeigten, dass die ABA-Akkumulation in Samen entwicklungsabhängig erfolgt. Erwartungsgemäß akkumulierten Samenstadien der ABA-Biosynthesemutante *aba1* weniger ABA als der Wildtyp, während Samen der transgenen Linie RAP40/7 in allen Stadien weitaus größere ABA-Mengen als der Wildtyp enthielten. Es konnte gezeigt werden, dass die anti-ABA scFv- bzw. anti-Oxazolon scFv-Expression auch im Samen entwicklungsabhängig reguliert wurde. Samen der immunmodulierten Linie prägten wie Samen der ABA-Biosynthesemutanten einen ABA-Mangelphänotyp aus.

## 4. Diskussion

### 4.1. ABA-Gehalt und ABA-Effekt in frühen Embryogeneseprozessen

ABA-Funktionen in späten Embryogeneseprozessen und in der Samenentwicklung und -reifung sind durch zahlreiche Untersuchungen belegt (Kermode 1990, Rock und Quatrano 1995). Der ABA-Gehalt in zygotischen Embryonen und Samen verändert sich im Verlauf der Samenentwicklung. Geringe Mengen sind bereits in frühen Stadien vorhanden (Ackerson 1984, Hoher et al. 1991, Xu et al. 1990). In der ersten Hälfte der Samenentwicklung nimmt der ABA-Gehalt drastisch zu und erreicht gleichzeitig mit maximalem Samenwachstum die höchsten Werte (1-10 $\mu$ M). Während der Embyoreifung sinkt der ABA-Gehalt des Samens (Rock und Quatrano 1995).

Über ABA-Einflüsse auf frühe Prozesse der Embryogenese ist wenig bekannt. Ackerson (1984) fand, dass ABA während früher Prozesse der Embryogenese das Embryowachstum fördert. Auch Hoher et al. (1991) wiesen in frühen Stadien der Samenentwicklung ABA nach, konnten dem Phytohormon jedoch keine Funktion zuordnen.

Die Analyse der ABA-Funktion während der frühen zygotischen Embryogenese wird durch die Anatomie von Samen und Samenanlage erschwert. Speziell Embryonen früher Stadien sind experimentell kaum zugänglich, sodass die Materialverfügbarkeit für umfassendere biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zum Engpass wird. Da Entwicklungsprozesse im Samen sowohl durch maternal als auch durch embryonal synthetisierte ABA reguliert werden (Finkelstein 1994, Koornneef et al. 1989), ist zur Funktionsanalyse die Bestimmung des ABA-Gehaltes der einzelnen Gewebe erforderlich. Zum anderen hängt die Samenentwicklung von Umweltbedingungen ab, sodass zweifelsfrei identische Entwicklungsstadien sehr schwierig reproduzierbar sind.

### 4.2. Somatische Embryogenese als Experimentalsystem zur ABA-Funktionsanalyse

Zur Untersuchung früher Embryogenesestadien wird häufig die somatische Embryogenese als Modellsystem gewählt (Zimmermann 1993, de Jong et al. 1993, Emons 1994, Mordhorst et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit fand das direkte somatische Embryogenesesystem von *Nicotiana plumbaginifolia* Verwendung. Kurzzeitig hohe Auxin- und Cytokininkonzentrationen induzieren Zellteilung von isolierten Mesophyllprotoplasten, die in moderatem Hormonregime zu somatischen Embryonen differenzieren und nachfolgend Pflanzen regenerieren. Vorteil des Systems ist, dass direkte Beziehungen zwischen physiologischem Zustand der *in vitro* Kultur, Hormonbalance und Morphogenese (Ivanova et al. 1994) untersucht werden

können. Von Mesophyllprotoplasten ausgehende somatische Embryogenesesysteme zeichnen sich in frühen Stadien durch eine relativ hohe, in unabhängigen Ansätzen reproduzierbare Synchronität der Entwicklung aus. Auch ist morphologische und biochemische Vergleichbarkeit von zygotischer und somatischer Embryogenese für eine Reihe von Entwicklungsstadien belegt (Zimmermann 1993). Somatische Embryonen synthetisieren und akkumulieren ABA (Rajasekaran et al. 1982, Hatzopoulos et al. 1990, Faure et al. 1998) und differenzieren in der *in vitro* Zellkultur unabhängig von maternalen Einflüssen inklusive ABA. Außerdem können Wirkstoffe zielgerichtet zum Embryosystem appliziert werden, ohne die Embryoentwicklung wie bei der *in vitro* Kultivierung zygotischer Embryonen durch Isolierung zu stören. Dabei können sowohl Konzentration als auch Zeitpunkt der Wirkstoffapplikation in Abhängigkeit von der Embryodifferenzierung verändert werden.

#### **4.3. Strategien der ABA-Funktionsanalyse - Bewertungskriterien der Embryoentwicklung**

Durch Kombination von direkter somatischer Embryogenese mit Versuchsstrategien zur artifiziellen Erzeugung von ABA-Mangel in embryogenen Zellen kann die funktionelle Aktivität von ABA in frühen Embryogenese Prozessen untersucht werden.

Dazu wurden zum ersten ein gentechnischer Ansatz der Immunsuppression von ABA durch intrazelluläre anti-ABA scFv-Expression, zum zweiten ein genetischer Ansatz in Form von ABA-defizienten Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* und zum dritten ein biochemischer Ansatz der Blockade der ABA-Biosynthese in Wildtypzellkulturen durch den ABA-Biosyntheseinhibitor Fluridon gewählt.

Untersuchungen zygotischer Embryonen der *aba1* und *aba2* Mutanten erweisen sich als schwierig, da bedingt durch den ABA-Biosynthesedefekt insbesondere *aba2*-Mutanten nur sehr wenige bzw. keine lebensfähigen Samen ausbilden. Beide Mutanten besitzen noch geringe endogene ABA-Gehalte, da die ABA-Defizienz aufgrund alternativer Synthesewege nicht total ist (Rock et al. 1991). Ein somatisches Embryogenesesystem, etabliert aus Mesophyllprotoplasten *in vitro* kultivierter *aba1* und *aba2* Pflanzen, ermöglicht die Analyse der Embryoentwicklung der ABA-defizienten Mutanten im Detail.

Auch durch biochemische Erzeugung von ABA-Defizienz mittels Applikation eines Biosyntheseinhibitors kann der endogene ABA-Gehalt somatischer Embryonen verändert und der Einfluss von Konzentration und Applikationszeitpunkt auf die somatische Embryoentwicklung untersucht werden. Da in beiden Versuchsstrategien frühe Schritte der ABA-Biosynthese

gehemmt sind, können morphogenetische Veränderungen und ABA-Funktion nicht direkt zueinander in Beziehung gesetzt werden (Artsaenko et al. 1999).

Für den gentechnischen Ansatz der Immunmodulation wurden homozygote transgene *Nicotiana plumbaginifolia* Pflanzen mit konstitutiver Expression eines anti-ABA scFv hergestellt. Die Effizienz einer *in vivo* Blockade von ABA durch intrazelluläre Antikörper-Expression wurde bereits durch Artsaenko et al. (1995) und durch Phillips et al. (1997) demonstriert. Artsaenko et al. (1995) konnten durch konstitutive Expression des anti-ABA scFv in transgenen *Nicotiana tabacum* Pflanzen einen welkenden Phänotyp hervorrufen. Durch samenspezifische Antikörperexpression erzeugten Phillips et al. (1997) vivipare Samen (Phillips et al. 1997, Marion-Poll 1997).

Durch konstitutive Expression des anti-ABA scFv unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors kann die ABA-Verfügbarkeit blockiert werden, sodass die somatische Embryoentwicklung der immunmodulierten Linie und der ABA-Biosynthesemutanten unter vergleichbaren ABA-Mangelbedingungen ablaufen. N-terminales Signalpeptid und C-terminales KDEL-ER-Retentionssignal gewährleisten dabei stabile Akkumulation des Antikörperfragmentes im endoplasmatischen Retikulum der transgenen Zellen. Die ABA-Bindung an den ER-kompartimentierten Antikörper führt zur ABA-Akkumulation im ER und zu ABA-Mangel in anderen Zellkompartimenten (Artsaenko et al. 1995, Phillips et al. 1997).

Für die somatische Embryogenese wurden homozygote Linien eingesetzt, um größtmögliche Homogenität des *in vitro* Zellkulturmaterials zu gewährleisten. Um Effekte einer Fremdgenexpression auf die Entwicklung zu untersuchen, wurden Pflanzen einer transgenen Kontrolle, die einen scFv-Antikörper gegen das nichtpflanzliche Hapten Oxazolon exprimierten, in das Embryogenesesystem einbezogen.

Die somatische Embryoentwicklung wurde durch morphogenetische und biochemische Parameter charakterisiert. Zur Untersuchung der Korrelation von Embryoentwicklung und ABA-Gehalt (Kamada und Harada 1981, Rajasekaran et al. 1982, Faure et al. 1998), wurden die ABA-Gehalte der Zellstrukturen bestimmt. Darüber hinaus wurde die morphogenetische Entwicklung somatischer Embryonen der ABA-immunmodulierten Linie, der ABA-defizienten Mutanten und des fluridonbehandelten Wildtyps im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp bonitiert. Als Bewertungskriterien der Morphogenese der Zellstrukturen wurden Protodermdifferentierung und Ultrastruktur herangezogen sowie Frischgewichtsentwicklung und Regenerationseffizienz ermittelt. Da sich zur Charakterisierung der Embryoentwicklung auch die Akkumulation von Speicherstoffen (Thorpe und Murashige 1969, Crouch 1982, Shoemaker et al. 1987, Keller et al. 1988, Sreedhar und Bewley 1998), Pigmentgehalt und –

zusammensetzung (Le Page-Degivry 1987, Rock et al. 1992, Phillips et al. 1997) sowie Induzierbarkeit von kleinen Hitzeschockproteinen (Kanabus et al. 1984, Zimmermann et al. 1989) eignen, wurden auch diese biochemischen Parameter analysiert.

#### 4.4. ABA-Mangel durch Immunmodulation, Mutation und Fluridonbehandlung

Zur Überprüfung der experimentellen Strategien der Erzeugung von ABA-Mangel, wurden die ABA-Gehalte der unterschiedlichen Zellkulturstadien im Verlauf der somatischen Embryogenese mittels ELISA bestimmt.

Zellstrukturen der ABA-defizienten Mutanten *aba1* und *aba2* enthielten wesentlich geringere ABA-Mengen im Vergleich zu Wildtyp und transgener Kontrolle (Abb. 23). Auch die ABA-Gehalte unterschiedlicher Stadien der Samenentwicklung der ABA-defizienten Mutanten zeigten deutlich niedrigere ABA-Werte gegenüber dem Wildtyp. Die Differenz zwischen ABA-Gehalten von Zellstrukturen und Samen der Mutanten und des Wildtyps lag im Bereich der durch Marin et al. (1996) und Leydecker et al. (1995) für Blätter von Mutanten und Wildtyp ermittelten ABA-Differenzen. Im Vergleich zum Wildtyp herrschte demzufolge für die Mutanten unter *in vitro* Zellkulturbedingungen und während der Samenentwicklung ABA-Mangel.

Fluridonbehandlung von Wildtypzellstrukturen führte bis zum 21. Kulturtag nur zu geringfügig niedrigeren ABA-Werten im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (Abb. 23). Trotzdem waren nach Fluridonapplikation deutliche Veränderungen der Zellmorphogenese nachweisbar (Abb. 12), die möglicherweise auch auf unspezifische Inhibitoreffekte zurückzuführen sind.

Im Gegensatz zu ABA-defizienten Mutanten und Fluridonbehandlung des Wildtyps wurden in Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie signifikant höhere ABA-Gehalte als im Wildtyp nachgewiesen. Auch Samen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie enthielten höhere ABA-Mengen als Wildtypsamensamen. Diese Resultate stimmen mit den für Blätter (Artsaenko et al. 1995) und Samen von *Nicotiana tabacum* (Phillips et al. 1997) gefundenen Daten überein. Nach Artsaenko (1996) könnte die Erhöhung des ABA-Gehaltes durch gestörte “feedback”-Regulation der ABA-Synthese infolge des Mangels an freier ABA verursacht werden. Des weiteren wurde vermutet, dass ABA durch Bindung des Phytohormons an den Antikörper unzugänglich für enzymatischen Abbau wird. Hemmung des ABA-Abbaus wäre sowohl durch Akkumulation der antikörpergebundenen ABA im ER als auch aus sterischen Gründen durch Antikörperbindung möglich. Phillips et al. (1997) zeigten, dass ausreichende Antikörpermengen exprimiert wurden, um die endogene ABA-Menge durch Antigen-Antikörperkomplexbildung in Samen zu kompensieren.

Auch in unseren Versuchen wurden die Expression des anti-ABA scFv (Abb. 17) und der endogene ABA-Gehalt in unterschiedlichen Zellkulturstadien bestimmt (Abb. 23). Anti-ABA scFv-Akkumulation wurde in allen untersuchten Zellkulturstadien der Linie RAP40/7 nachgewiesen. Parallel zum ABA-Gehalt stieg auch die akkumulierte Antikörpermenge während der frühen Embryogenese an. Die spezifische Bindung von ABA an den im ER lokalisierten Antikörper führt zur Fixierung von ABA im ER, wodurch es zu ABA-Mangel in anderen Zellkompartimenten kommen kann (Artsaenko et al. 1995). Obgleich in großer Menge vorhanden, wird intrazellulärer ABA-Mangel signalisiert.

Da ABA-Gehalte der Zellstrukturen und Samenstadien der transgenen Kontrolllinie Np9-41/4 sich nicht vom Wildtyp unterschieden, ist eine durch Transgenexpression verursachte Veränderung des ABA-Gehaltes auszuschliessen. Die erhöhten ABA-Gehalte in Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie sind auf den durch Immunmodulation bedingten ABA-Mangel zurückzuführen.

Unabhängig von Differenzen im ABA-Gehalt der Zellstrukturen der differenten Embryogenessysteme nahm der ABA-Gehalt in allen untersuchten Linien im Verlauf der *in vitro* Kultivierung zu. Da Protoplasten nicht selbst ABA synthetisieren (Loveys und Robinson 1987, Lahr und Raschke 1988), wird ABA *de novo* in Abhängigkeit von der somatischen Embryoentwicklung synthetisiert. ABA-Synthese wurde auch in somatischen Embryonen der Möhre (Kamada und Harada 1981, Hatzopoulos et al. 1990) und des Weins (Rajasekaran et al. 1982, Faure et al. 1998) nachgewiesen.

Die kontinuierliche Zunahme des ABA-Gehaltes im Verlauf der *in vitro* Embryokultur spiegelte die Veränderung des ABA-Gehaltes während der Samenentwicklung nicht wider. Der ABA-Gehalt im Samen stieg zunächst drastisch an und fiel während der Samenreifung ab (Black 1991, Rock und Quatrano 1995). Die kontinuierliche Zunahme des ABA-Gehaltes in unseren somatischen Embryogenesesystemen ist eher mit dem ABA-Metabolismus von *in vitro* kultivierten unreifen Embryonen vergleichbar (Faure et al. 1998). Kamada und Harada (1981) die höchsten ABA-Gehalte in globulären Stadien somatischer Embryonen der Möhre.

Somatische Embryonen von *Nicotiana plumbaginifolia* enthielten deutlich weniger ABA als Samen. Unterschiede im ABA-Gehalt zygotischer und somatischer Embryonen wurden auch von Rajasekaran et al. (1982) und Faure et al. (1998) beschrieben. Da für *Nicotiana plumbaginifolia* die Isolation zygotischer Embryonen nicht möglich war, konnte der ABA-Gehalt zygotischer und somatischer Embryonen nicht verglichen werden. Aus dem ABA-Gehalt des Samens sind Rückschlüsse auf den ABA-Gehalt des Embryos nicht zu ziehen, da

ABA in unterschiedlichen Geweben des Samens lokalisiert ist (Hoher et al. 1991, Xu et al. 1990).

ABA-Mangel während der *in vitro* Zellkultur wurde im genetischen Ansatz unter Verwendung der Mutanten durch Analyse der ABA-Mengen dokumentiert. Dass auch Immunmodulation ABA-Mangel bewirkte, wurde indirekt anhand von Morphogenese, Ultrastruktur und biochemischen Parametern im Vergleich mit ABA-defizienten Mutanten, fluridonbehandeltem Wildtyp und unbehandelten Wildtypkulturen nachgewiesen.

#### **4.5. ABA-Mangel - Morphogenese, Ultrastruktur und Regenerationseffizienz somatischer Embryonen**

Zellstrukturen früher Embryogenesestadien des Wildtyps und der transgenen Kontrolle waren durch kleine cytoplasmareiche Zellen in gerichteter Anordnung gekennzeichnet und zeigten somit typische Merkmale embryogener differenzierender Zellstrukturen (Abb. 12, 13; Halperin und Wetherell 1964, Komamine et al. 1990, Toonen et al. 1994, Emons 1994). Auch Halperin und Wetherell (1964) beschrieben die somatische Embryoentwicklung der Möhre durch geordnete Zellteilungen unter Reduktion des Zellvolumens ähnlich dem Muster der *in situ* Embryogenese.

Im Gegensatz dazu waren Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie, der ABA-Mutanten und des fluridonbehandelten Wildtyps aus großvolumigen Zellen zusammengesetzt, die lose ungerichtete Zellverbände mit phyllopodium-ähnlichen Auswüchsen bildeten (Abb. 12, 13). Diese für embryogene Strukturen untypischen Charakteristika sind vergleichbar der Entwicklung undifferenzierter Zellstrukturen. Halperin und Wetherell (1964) zeigten, dass Zellklusterbildung in undifferenziertem Kallus durch zufällige Orientierung der neugebildeten Zellwände bei nachfolgender Vergrößerung der Tochterzellen gekennzeichnet war.

Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie enthielten am 50. Kulturtag nur wenige oder keine embryogenen Zellen (Abb. 12). Fluridonbehandelte Wildtypstrukturen wiesen ebenfalls keine embryogenen Zellen zu diesem Entwicklungszeitpunkt auf. Übereinstimmend mit diesen Daten fanden auch Nickle und Yeung (1994) starke Reduktion der Anzahl meristematischer Zellen im Sprosspol von Möhrenembryonen nach Fluridonbehandlung.

Die Zellen ABA-defizienter Strukturen waren größer und expandierten stärker als Zellen in Wildtypstrukturen. Bereits 1972 zeigten de la Torre et al., dass ABA die Zellgröße beeinflusst. Nach ABA-Applikation im Konzentrationsbereich  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  M war die Zellgröße in *Allium cepa* Wurzeln bis zu 50% reduziert. Da die Zellwand limitierender Faktor der Zellex-



pansion ist (Lindsey und Topping 1993, de Jong et al. 1993, Emons 1994), kann eine Verringerung der Zellwandrigidität unter ABA-Mangel angenommen werden. Der ABA-Einfluss auf die Zellwand wurde durch Schopfer et al. (1979) und Schopfer und Plachy (1984, 1985) untersucht. Während der Keimung zygotischer Embryonen ist die ABA-Konzentration niedrig. Dadurch wurde die Auflockerung der Zellwand und die Erhöhung ihrer Permeabilität gefördert, das Zellvolumen stieg durch Wasseraufnahme. Durch exogene ABA-Applikation wurde die Permeabilisierung der Zellwand reduziert. So erzielten Rajeshkar et al. (1996) durch exogene ABA-Applikation Veränderungen der Zellwände in Zellkulturen und Blättern von Wein und Apfel, die erhöhte Frosttoleranz bewirkten.

Der ABA-Gehalt in Protoplasten des Wildtyps und der Kontrolllinie Np9-41/4 war niedrig. Protoplasten der ABA-Biosynthesemutanten enthielten noch geringere ABA-Mengen, RAP40/7-Protoplasten jedoch hohe ABA-Mengen (Abb. 23). Geringe ABA-Gehalte begünstigen sowohl die Initiation zygotischer Embryogenese (Xu et al. 1990, Black 1991, Hoher et al. 1991, Rock und Quatrano 1995) als auch Initiation und Differenzierung somatischer Embryonen (Ivanova et al. 1994). Der niedrige endogene ABA-Gehalt in Protoplasten des Wildtyps und der transgenen Kontrolllinie bewirkte Initiation von Zellteilungen und Differenzierung somatischer Embryonen. Protoplasten der ABA-Biosynthesemutanten mit geringerem ABA-Gehalt teilten sich ebenfalls, differenzierten aber nicht zu kompakten embryogenen Zellstrukturen. Auch Protoplasten der anti-ABA scFv exprimierenden Linie entwickelten sich zu kallösen Zellstrukturen, obgleich hohe ABA-Mengen vorhanden waren. Dieser Befund wird so interpretiert, dass ABA durch Bindung an den Antikörper nicht funktionell wirksam war, sondern Mangel an physiologisch aktiver ABA vorlag. Unter ABA-Mangelbedingungen war die Differenzierung von Protoplasten zu kompakten somatischen Embryonen nicht aber die Initiation von Zellteilungen gestört.

Durch ultrastrukturelle Analyse der Zellstrukturen des Wildtyps und der Linie RAP40/7 am 50. Tag der *in vitro* Kultivierung wurde gesteigerte Vakuolisierung der Zellen in RAP40/7 Strukturen im Vergleich zu Wildtypzellen nachgewiesen. Verstärkte Vakuolisierung in Möhrenembryonen wurde auch von Nickle und Yeung (1994) nach ABA-Biosynthesehemmung durch Fluridon gefunden.

ABA-defiziente Zellstrukturen der Linie RAP40/7 und der ABA-defizienten Mutanten regenerierten später als Wildtypembryonen (Abb. 14). Fluridonbehandelte Wildtypstrukturen regenerierten überhaupt nicht, doch konnte nach Langzeitkultivierung Xylemdifferenzierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hatzopoulos et al. (1990) berichteten, dass ABA-Defizienz bedingt durch Fluridonapplikation die somatische Embryogenese bei Möhren ver-

zögerte, ohne die Lebensfähigkeit der Zellen herabzusetzen. In zygotischen Maisembryonen konnte die Entwicklung stadienspezifisch durch Fluridon gehemmt werden (Fong et al. 1983b).

Der Einfluss von ABA-Mangel auf die Anzahl sich entwickelnder Embryonen ließ sich anhand der Regenerationseffizienz ermitteln. Literaturdaten zur Regenerationseffizienz variieren stark in Abhängigkeit von der Pflanzenart und der Kultivierung der somatischen Embryonen. Nitsch (1969) erreichte 67% Regenerationseffizienz in Androgenese-Kulturen von Tabak. Für somatische Embryogenesesysteme der Möhre wurden 0,2-2% (Toonen et al. 1994, de Vries et al. 1988, de Jong et al. 1993) jedoch auch 85-90% (Komamine et al. 1990) Regenerationseffizienz erzielt. Die Regenerationseffizienz der von uns untersuchten Linien lag zwischen 4,0 und 18,6%. ABA-defiziente und transgene Linien hatten eine verringerte Regenerationseffizienz im Vergleich zum Wildtyp. Demzufolge hatten sowohl ABA-Defizienz, als auch Transgenexpression Einfluss auf die Embryoentwicklung. Die Verringerung der Regenerationseffizienz nach Fluridonbehandlung könnte durch ABA-Mangel, aber auch durch unspezifische Effekte des Inhibitors verursacht worden sein.

Da die Entwicklung der somatischen Embryonen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie, der ABA-defizienten Mutanten und des fluridonbehandelten Wildtyps vergleichbare Charakteristika zeigte, wird geschlussfolgert, dass vorrangig ABA-Mangel die Ursache für die morphogenetischen Veränderungen war.

#### **4.6. ABA-Mangel – biochemische Parameter somatischer Embryonen**

Der Einfluss von ABA-Mangel auf die Entwicklung somatischer Embryonen konnte durch biochemische Parameter charakterisiert werden, die Abhängigkeit von Differenzierungsprozessen aufweisen und durch ABA in zygotischen Embryonen beeinflusst werden. Dazu gehören Speicherstoffakkumulation und -verteilung (Thorpe und Murashige 1969, Crouch 1982, Shoemaker et al. 1987, Keller et al. 1988, Sreedhar und Bewley 1998), Pigmentgehalt und -zusammensetzung (Le Page-Degivry 1987, Rock et al. 1992, Phillips et al. 1997) und Akkumulation und Induzierbarkeit kleiner Hitzeschockproteine (Kanabus et al. 1984, Zimmermann et al. 1989, Waters et al. 1996, Leps 1998). In Zellstrukturen der transgenen Linien RAP40/7 und Np9-41/4 wurde die Antikörperakkumulation in Abhängigkeit vom Embryogenesestadium untersucht.

Alle untersuchten Strukturen akkumulierten Stärke am 21. und 50. Tag der *in vitro* Kultivierung. Zellstrukturen der immunmodulierten Linie RAP40/7, der ABA-Biosynthesemutante

*abal* und des fluridonbehandelten Wildtyps enthielten weniger Stärke als der unbehandelte Wildtyp. Akkumulation von Stärke in somatischen Embryonen wurde in verschiedenen Embryogenesesystemen gezeigt (Halperin und Wetherell 1964, Thorpe und Murashige 1969, Hara et al. 1985, Srinivasan und Vasil 1986, Keller et al. 1988, Ross und Murphy 1993, Faure et al. 1994, Krochko et al. 1994, Sreedhar und Bewley 1998). Dabei steigerte exogene ABA-Applikation die Stärkespeicherung in somatischen Embryonen (Fuji et al. 1990, Etienne et al. 1993a, Courty et al. 1997). In unseren Untersuchungen korrelierten endogener ABA-Mangel und verringerte Stärkespeicherung. Das Muster der Stärkeakkumulation in Zellstrukturen der immunmodulierten Linie, der ABA-defizienten Mutanten und des fluridonbehandelten Wildtyps war ähnlich. Folglich führte ABA-Mangel zur Verringerung der Stärkeakkumulation.

Synthese und Akkumulation von Reserveproteinen sind nicht nur spezifische Charakteristika für die Reifung zygotischer Embryonen (Kermode 1990, Bewley und Black 1994) sondern auch wichtige Kriterien zur Bewertung der Qualität somatischer Embryonen (Crouch 1982, Dahmer et al. 1992, Sreedhar und Bewley 1998). Während Samen aller untersuchten Linien Reserveproteine erst nach der Embryodifferenzierung speicherten (Abb. 28), wurden sie in somatischen Embryonen bereits im globulären Stadium synthetisiert (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden die Reserveglobuline in somatischen Embryonen in deutlich geringeren Mengen als im Samen akkumuliert. Das frühe Auftreten und die geringe Akkumulation von Reserveglobulinen in somatischen Embryonen beschrieben auch andere Autoren (Crouch 1982, Shoemaker et al. 1987). In Samen der immunmodulierten Linie wurden deutlich geringere Reserveproteinmengen nachgewiesen (Abb. 29). Durch histologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass RAP40/7 zygotische Embryonen im Vergleich zum Wildtyp weniger intakte „protein bodies“ enthielten, die nur in den äußeren Zellschichten des Embryos lokalisiert waren (Abb. 26a). Da der CaMV 35S-Promotor in Samen aktiv ist, und ABA auch im Samen durch den akkumulierten anti-ABA scFv (Abb. 32) spezifisch gebunden wird, kann von einer Verringerung der Speicherproteinakkumulation durch ABA-Mangel ähnlich der Situation bei samenspezifischer scFv-Expression ausgegangen werden (Phillips et al. 1997, Leps 1998). Die Degeneration der „protein bodies“ in inneren Zellschichten des Embryos deutet darauf hin, dass aufgrund der gesteigerten CaMV 35S-Promotoraktivität in meristematischen Geweben (Dudits et al. 1991), die höchsten anti-ABA scFv-Mengen im Sprossapex akkumuliert werden und in dieser Region ABA-Mangel verursachen könnten. Im Gegensatz zu Befunden von Zeevaart und Creelman (1988), die keine Unterschiede in der Reserveproteinakkumulation zwischen *Arabidopsis thaliana* Wildtypsamen und Samen der

ABA-defizienten Mutante *aba1* fanden, enthielten Samen der *Nicotiana plumbaginifolia* ABA-defizienten Mutante *aba2* geringere Reserveglobulinmengen als Wildtypsamens. In Embryonen der ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* wurden keine intakten „protein bodies“ gefunden (Abb. 26b). Vermutlich war ABA-Mangel in Samen der immunmodulierten Linie und der ABA-defizienten Mutante *aba2* für Störungen bei der Bildung der Speicherorganellen und die Reduktion der Akkumulation der Speicherproteine verantwortlich.

In zygotischen Embryonen der ABA-Biosynthesemutante *aba1* wurde eine veränderte Kontrastierung der Lipidvakuolen gefunden, die ein Indiz für eine veränderte Zusammensetzung der Lipide ist. Da die Molybdäncofaktormutation in *aba1* nicht nur die ABA-Aldehydoxidase, sondern mit der Nitratreduktase auch Enzymaktivitäten des Stickstoff-Stoffwechsels betrifft, könnte die veränderte Lipidzusammensetzung auf eine ABA-unabhängige Stoffwechselstörung zurückzuführen sein.

Wie die Akkumulation von Speicherstoffen ist auch das Auftreten kleiner Hitzeschockproteine (hsp) typisch für späte Stadien der Samenentwicklung (Waters et al. 1996). Diese werden im zygotischen Embryo entwicklungs- und stressabhängig exprimiert (Wehmeyer und Vierling 2000) und sind in somatischen Embryonen stadienabhängig durch Hitzeschock induzierbar (Zimmermann et al. 1989). Deshalb wurden Induktion und Expression kleiner hsp's während der somatischen Embryogenese untersucht.

Unabhängig vom Phänotyp konnte in allen Stadien der somatischen Embryogenese des Wildtyps und der ABA-defizienten Linien keine hsp-Expression auf Proteinebene gefunden werden (Abb. 21). Im Gegensatz dazu wurde in somatischen Embryonen von Luzerne (Györgyey et al. 1991) und *Picea glauca* (Dong und Dunstan 1996) entwicklungsregulierte Akkumulation der mRNA kleiner Hitzeschockproteine nachgewiesen. In unseren somatischen Embryonen von *Nicotiana plumbaginifolia* wurde die mRNA-Akkumulation der kleinen hsp's nicht untersucht. Hsp17-Proteinakkumulation war nicht nachweisbar, da sie möglicherweise optimalere Embryogenese erfordert und das entsprechende Entwicklungsstadium nicht untersucht wurde. Vermutlich ist der Nachweis ein Mengenproblem, da in konzentrierten Zellkulturextrakten (Proteinanreicherung durch Acetonfällung) eines späten Embryogenesestadiums der transgenen Linie Np9-41/4 geringe hsp17-Akkumulation gefunden wurde (Daten nicht gezeigt).

In Samen wurde hsp17 in späten Stadien akkumuliert (Almoguera und Jordano 1992, Coca et al. 1994, zur Nieden et al. 1995, Waters et al. 1996, Wehmeyer et al. 1996, Almoguera et al. 1998). Die entwicklungsregulierte hsp-Akkumulation setzte in *Nicotiana plumbaginifolia* Samen erst nach 20 bzw. 24 DAP in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen und der unter-

suchten Linie ein (Daten nicht gezeigt) und korrelierte nicht mit der früher beginnenden Reserveglobulinakkumulation (Abb. 28). Die akkumulierte hsp17-Menge war in *aba1*-Samen geringer und in *aba2*-Samen größer als im Wildtyp. Wehmeyer et al. (1996) fanden keine Unterschiede in der hsp17-Expression in Samen des *Arabidopsis thaliana* Wildtyps und der ABA-defizienten Mutante *aba1* (entspricht der *Nicotiana plumbaginifolia* Mutante *aba2*). Dagegen fand Leps (1998) auf mRNA- und Proteinebene verringerte hsp17-Expression in Tabak-Embryonen von Pflanzen mit samenspezifischer ABA-Immunmodulation. Derzeit ist nicht klar, wie ABA-Mangel auf die hsp17-Akkumulation im Samen wirkt.

Die Expression der kleinen Hitzeschockproteine erfolgte in Embryonen auch stressinduziert (Nover 1991). Protoplastierung und Zellkulturbedingungen führten in unserem System jedoch nicht zur stressinduzierten hsp-Synthese (Abb. 20).

Um zu prüfen, ob sich hsp-Induzierbarkeit während der Embryoentwicklung (Pitto et al. 1983, Kanabus et al. 1984, Zimmermann et al. 1989) unter ABA-Mangelbedingungen verändert, wurden Zellkulturstadien aller untersuchten Linien einem Hitzestress ausgesetzt. Die Induzierbarkeit der kleinen Hitzeschockproteine veränderte sich während der *in vitro* Embryogenese in Abhängigkeit vom Zellkulturstadium und von der untersuchten Linie. Eindeutige Korrelation zwischen Hitzeschockantwort und ABA-Mangel konnten jedoch nicht gefunden werden. Für diese Aussagen wären quantitative Bestimmungen und Analyse des hsp-Isoformenmusters erforderlich (Pitto et al. 1983, Waters et al. 1996).

Die Expression des anti-ABA scFv in RAP40/7 und des anti-Oxazonon scFv in Np9-41/4-Zellstrukturen konnte während der somatischen Embryogenese vergleichend analysiert werden, da beide scFv unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimiert wurden. Alle Stadien der somatischen Embryogenese akkumulierten anti-ABA scFv bzw. anti-Oxazonon scFv (Abb. 17). Während der frühen somatischen Embryogenese nahm die scFv-Expression zu, erreichte zwischen 21. und 28. Kulturtag ihr Maximum und nahm danach wieder ab. In Pflanzen wurde die höchste Expression während der Blütenentwicklung gefunden (Abb. 18). Auch Dudits et al. (1995) fanden, dass die CaMV 35S-Promotoraktivität in sich teilenden Zellen somatischer Embryonen von *Medicago sativa* am stärksten war. Offenbar ist der CaMV 35S-Promotor entwicklungsreguliert, sodass entwicklungsabhängig unterschiedliche scFv-Mengen akkumuliert wurden.

Die Expression des anti-ABA scFv schwankte vor allem in späten Stadien der Linie RAP40/7 stark, während in anti-Oxazonon scFv exprimierenden Zellkulturstadien zwischen den individuellen Kulturansätzen derartige Schwankungen nicht gefunden wurden. Diese Variation der akkumulierten anti-ABA scFv-Menge kann durch mehrere Faktoren verursacht

werden. Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie zeigten während der *in vitro* Kultivierung einen typischen ABA-Mangelphänotyp, während sich anti-Oxazonon scFv exprimierende Zellstrukturen wie der Wildtyp entwickelten. Entwicklungsregulierte Expression des anti-ABA scFv unter CaMV 35S-Promotorkontrolle könnte demzufolge die Ursache sein. Auch Fluridonbehandlung von Np9-41/4-Kulturen führte zu veränderter Morphogenese und zur drastischen Abnahme der akkumulierten Antikörpermenge (Abb. 17). Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Schwankungen in der Antikörperakkumulation auf Entwicklungsdifferenzen somatischer Embryonen zurückzuführen waren, die aus dem ABA-Mangel resultierten.

ABA-Mangel hatte einen deutlichen Einfluss auf die Pigmentakkumulation sowohl in späten Stadien der somatischen Embryogenese als auch in Samen. Zellkulturstadien des Wildtyps bildeten am 50. Kulturtag deutlich mehr Chlorophyll und Carotinoide als Zellstrukturen der immunmodulierten Linie und der ABA-defizienten Mutanten (Abb. 24, 25). Diese Unterschiede im Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt stimmen mit den morphogenetischen Entwicklungsdifferenzen der Embryosysteme überein. Wildtypembryonen sind zu diesem Zeitpunkt weiter differenziert und regenerieren früher als Embryonen der immunmodulierten Linie und ABA-defizienten Mutanten *aba1* und *aba2*.

Die Carotinoide Zeaxanthin, Neoxanthin und Violaxanthin sind neben ihrer Funktion für die Photosynthese auch Vorstufen der ABA-Biosynthese (Zeevaart und Creelman 1988, Liotenberg et al. 1999, Cutler und Krochko 1999). Da der ABA-Gehalt somatischer Embryonen (Abb. 23) jedoch wesentlich niedriger als der Zeaxanthin, Neoxanthin- bzw. Violaxanthin-Gehalt war (Abb. 25), ist ein Zusammenhang zwischen ABA und Carotinoid-Gehalt nicht herzustellen.

Samen der immunmodulierten Linie RAP40/7 und der ABA-defizienten Mutante *aba1* akkumulierten mehr Chlorophyll als Wildtypsamen. Erhöhte Chlorophyll-Gehalte wurden auch durch Phillips et al. (1997) in Samen transgener Pflanzen gefunden, die den anti-ABA scFv samenspezifisch exprimierten. Le Page-Degivry et al. (1987) fanden Akkumulation von Chlorophyll in *in vitro* kultivierten unreifen Apfelembryonen, in denen der ABA-Gehalt durch Isolation und nachfolgender *in vitro* Kultivierung abfiel. In Blättern der ABA-defizienten *Arabidopsis thaliana* Mutante *aba1* wurden mehr Chloroplasten gefunden als in Wildtypblättern. Die Zunahme von Chlorophyll a in Samen korrelierte mit den reduzierten ABA-Gehalten durch Mutation oder Immunmodulation (Phillips et al. 1997).

#### 4.7. ABA-Applikation - ABA-Gehalt, Morphogenese, Ultrastruktur und Regenerationseffizienz somatischer Embryonen

Wurden die morphogenetischen und biochemischen Unterschiede somatischer Embryonen der immunmodulierten Linie RAP40/7 und der ABA-Biosynthesemutanten durch ABA-Mangel verursacht, sollte ihre Entwicklung durch exogene ABA normalisiert werden.

Voraussetzung dafür ist die Zunahme des ABA-Gehaltes der Zellstrukturen nach ABA-Applikation. Zellstrukturen aller untersuchten Linien akkumulierten nach ABA-Applikation signifikant mehr ABA als unbehandelte Strukturen wie auch von anderen Autoren beschrieben (Ivanova et al. 1994, Linossier et al. 1997).

In frühen Entwicklungsstadien zeigten Wildtypzellkulturen nach ABA-Applikation keine deutlichen morphogenetischen Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. Dennoch konnten unterschiedliche Effekte beobachtet werden. Bis zum 28. Kulturtag führte ABA-Applikation zu geringfügig verbessertem Wachstum. In späteren Stadien wurde das Wachstum dagegen verzögert. Nur wenige Embryonen bildeten Sprosspole.

Die fördernde Wirkung einer ABA-Applikation in geringen Konzentrationen auf Wachstum und Differenzierung wurde ebenfalls durch andere Autoren beschrieben (Kochkar 1979, Kamada und Harada 1981, Carman 1988, Etienne et al. 1993b, Li und Wolyn 1995, Dunstan et al. 1998, Saunders und Tsai 1999, Fernando und Gamage 2000). Auch für isolierte zygotische Embryonen konnte der wachstumsfördernde Einfluss von ABA auf frühe Embryogenesestadien gezeigt werden (Ackerson et al. 1984).

Wachstumshemmung somatischer Embryonen ist von der ABA-Konzentration (Nitsch 1969, Kochkar 1979, Qureshi et al. 1989, Slawinska und Obendorf 1991, Perl et al. 1995, Tettersoo et al. 1995b) und dem Applikationszeitraum (Tokuji et al. 1995, Tettersoo et al. 1995a, Fernando und Gamage 2000) abhängig. In späten Stadien der Embryogenese von *Nicotiana plumbaginifolia* Wildtypembryonen wirkte exogene ABA hemmend auf die weitere Entwicklung, da der ABA-Gehalt in diesen Strukturen offenbar überoptimal für diese Entwicklungssituation ist. Cvrková et al. (1998) fanden, dass somatische Embryonen, die Pflanzen regenerieren, weniger ABA enthielten als nichtregenerierende Embryonen. Die Hemmung der Sprossbildung ABA-behandelter Wildtypkulturen könnte somit den Übergang in einen der späten zygotischen Embryogenese ähnlichen Ruhezustand bedeuten, da während der Samenentwicklung höhere ABA-Gehalte Samenreife und –ruhe induzieren (Black 1991, Rock und Quatrano 1995).

In Zellkulturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie und der ABA-defizienten Mutanten bewirkte ABA-Applikation Normalisierung der somatischen Embryoentwicklung. Wie in Wildtypzellkulturen traten kompakte Zellstrukturen auf, die aus kleinen Zellen in gerichteter Anordnung gebildet wurden (Abb. 11, 12). Die Zellstrukturen enthielten am 50. Kulturtag embryogene Zentren aus cytoplasmareichen Zellen, die nur wenig vakuolisiert waren (Abb. 13). Damit wiesen die Embryonen der immunmodulierten Linie und der ABA-defizienten Mutanten Linien nach ABA-Applikation die typischen Merkmale embryogener Strukturen auf, die durch Halperin und Wetherell (1964), Komamine et al. (1990), Toonen et al. (1994) und Emons (1994) beschrieben wurden. Nickle und Yeung (1994) fanden einen analogen Effekt von exogener ABA auf die Entwicklung von Möhrenembryonen. Sprosspole enthielten mehr meristematische Zellen, die cytoplasmareich und wenig vakuolisiert waren. Während exogene ABA in diesem System offenbar für normale Entwicklung von Wildtypembryonen erforderlich war, entwickelte sich der *Nicotiana plumbaginifolia*-Wildtyp mit oder ohne ABA-Applikation sehr ähnlich. Die durch Nickle und Yeung (1994) beschriebenen Effekte konnten jedoch an ABA-defizienten Linien nach ABA-Applikation beobachtet werden. Auch Orr et al. (1986) fanden in Untersuchungen zur Induktion der Frosttoleranz in Zellkulturen von *Brassica napus*, dass ABA-behandelte Zellen kleinere Vakuolen besaßen.

In Zellkulturen der immunmodulierten Linie und der ABA-defizienten Mutanten führte ABA-Applikation zum Übergang von ungerichtetem zu gerichtetem Wachstum und Embryogenese. Diese Wirkung von ABA konnte durch Ammirato (1974) nach ABA-Komplementation von Kümmelwildtypkulturen nachgewiesen werden. Vermutlich ist der Effekt der ABA-Applikation abhängig von ABA-Sensitivität und ABA-Gehalt, die in Embryonen unterschiedlicher Pflanzenspezies different sind.

Nicht alle Zellstrukturen der ABA-defizienten Linien zeigten nach ABA-Applikation einen homogenen normalisierten Phänotyp. Das Auftreten von Übergangsformen war unter anderem auf Abnahme der Zellstruktursynchronität mit zunehmendem Kulturalter (Zimmermann 1993) zurückzuführen, von der auch andere Autoren berichteten (Keller et al. 1988, Hatzopoulos et al. 1990, Wurtele et al. 1993, Linossier et al. 1997). So konnten biochemische Analysen häufig erst nach Fraktionierung des Zellkulturmaterials durchgeführt werden.

Embryonen der immunmodulierten Linie RAP40/7 und der ABA-defizienten Mutanten regenerierten nach Normalisierung durch ABA wie der unbehandelte Wildtyp (Abb. 14). Die Regenerationseffizienz der anti-ABA scFv exprimierenden Linie nach ABA-Behandlung



unterschied sich kaum von unbehandelten Strukturen, sodass ABA-Applikation zwar die Qualität nicht aber die Quantität der entwickelnden Strukturen beeinflusste.

In Wildtypzellkulturen war der endogene ABA-Gehalt in Protoplasten und früher embryogener Stadien wahrscheinlich ausreichend, um Embryogenese- und Differenzierungsprozesse anzuschalten, sodass exogene ABA die Entwicklung kaum veränderte. Auch Faure et al. (1998) postulierten, dass der endogene ABA-Gehalt in frühen Stadien wichtig ist, um die Entwicklung späterer Stadien zu determinieren.

Nach ABA-Applikation differenzierten Zellstrukturen der immunmodulierten Linie und der ABA-defizienten Mutanten zu wildtypähnlichen somatischen Embryonen und regenerierten zeitgleich mit Wildtypembryonen. Da das Kulturmedium einen sauren pH-Wert aufweist, kann exogene ABA durch pH-abhängige Diffusion (Kaiser und Hartung 1981, Hartung und Slovik 1991, Hendrix und Radin 1984, Hendrix et al. 1987, Dunstan et al. 1998) bzw. transportervermittelt (Daeter und Hartung 1993, Perras et al. 1994, Bianco-Colomas et al. 1991) aufgenommen werden. Exogene ABA kann den endogenen ABA-Gehalt in Zellstrukturen der ABA-Biosynthesemutanten komplementieren und den genetisch bedingten ABA-Mangel ausgleichen.

Auch die Entwicklung von Zellkulturen der immunmodulierten Linie konnte durch exogene ABA normalisiert werden, obwohl hohe ABA-Gehalte in allen Zellkulturstadien vorhanden waren. Exogene ABA kann zur Erhöhung des freien ABA-Gehaltes führen, da es entweder in anderen Zellkompartimenten akkumuliert wurde oder nach Absättigung der Bindungskapazität des Antikörpers als freie ABA vorlag. Außerdem könnte exogene ABA vor ihrer Komplexierung durch den Antikörper im ER durch hypothetische Rezeptoren im Plasmalemma (Allan et al. 1994, Schultz und Quatrano 1997, Pedron et al. 1998) oder Cytosol (Allan und Trewavas 1994) erkannt werden. Die Normalisierung der Embryoentwicklung nach Kompensation des ABA-Mangels durch exogene ABA demonstriert, dass physiologisch funktionelle ABA vorhanden war.

Die Normalisierung der Entwicklung der Zellstrukturen der anti-ABA scFv exprimierenden Linie und der Mutanten lässt den Schluss zu, dass ABA-Mangel für die beobachteten morphogenetischen Defekte verantwortlich war.

#### **4.8. Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der ABA-Applikation**

Das Zellkulturmedium wurde mit ABA zu unterschiedlichen Zeiten und mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$  und  $1,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) im Verlauf der *in vitro* Kultivierung komplementiert. Beide ABA-Konzentrationen führten nach Applikation zu Protoplasten (Tag 0)

und zu Zellstrukturen des 3. und 6. Kulturtages des Wildtyps und der ABA-defizienten Mutanten zur Hemmung der Bildung somatischer Embryonen. Normalisierung der Embryoentwicklung der ABA-defizienten Linien wurde nur durch Applikation von  $1,5 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $\pm$ )-ABA beginnend am 10. Tag der *in vitro* Kultivierung erreicht. Die Konzentration von  $1,5 \times 10^{-6} \text{M}$  lag im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte (Nitsch 1969, Ammirato 1974, Kochkar 1979, Kamada und Harada 1981, Qureshi et al. 1989, Nickle und Yeung 1994, Li und Wolyn 1995). Ein Zusammenhang von Embryoentwicklung und ABA-Konzentration, Synchronität der Zellkultur und Osmolarität des Kulturmediums wurde durch Tetteroo et al. (1995a) beschrieben. Daneben war sicher auch die unterschiedliche Sensitivität differenter Embryostadien gegenüber ABA von Bedeutung (Bewley und Black 1994). Diese Aspekte spielen auch im Hinblick auf die Wirkung anderer Hormone (endogen bzw. exogen) während der Entwicklung somatischer Embryonen eine Rolle (Kochkar 1979, Kamada und Harada 1981, Etienne et al. 1993b, Ivanova et al. 1994, Saunders und Tsai 1999).

Die frühe Embryoentwicklung des Wildtyps und der ABA-defizienten Mutanten wurde durch exogene ABA gehemmt. Die Initiation der Embryogenese sowohl in zygotischen Embryonen (Xu et al. 1990, Black et al. 1991, Hoche et al. 1991, Rock und Quatrano 1995) als auch somatischen Embryogenesesystemen (Ivanova et al. 1994) findet in Gegenwart niedriger ABA-Konzentrationen statt. Die beobachtete Wachstumshemmung durch höhere ABA-Konzentrationen ist eine Folge verringerter Zellteilungsaktivität und Zellexpansion wie durch Stewart und Smith (1972), de la Torre et al. (1972), Newton (1977), Schopfer et al. (1979), Schopfer und Plachy (1984, 1985) und Robertson et al. (1990) gezeigt werden konnte.

Am 10. Kulturtag lagen in Wildtypzellkulturen bereits präglobuläre Strukturen vor. In Zellkultursystemen der ABA-defizienten Linien wurde zu diesem Zeitpunkt der *in vitro* Kultivierung der ABA-Mangeleffekt offensichtlich. ABA-Applikation ab 10. Kulturtag führte zur Normalisierung der Embryoentwicklung der ABA-defizienten Linien. Auch andere Autoren erreichten durch ABA-Applikation zu globulären Embryonen optimalere Embryoentwicklung, während sowohl frühere Stadien (Kamada und Harada 1981) als auch spätere Stadien (Nickle und Yeung 1994) weniger sensitiv auf ABA-Applikation reagierten.

Die mit dem 10. Kulturtag ABA-defizienter Linien ermittelten Differenzierungsdefekte, die durch ABA-Applikation kompensierbar waren, machen deutlich, dass ABA Einfluss auf frühe Embryogeneseprozesse in diesem Entwicklungsstadium hatte.

#### 4.9. ABA-Applikation - biochemische Parameter somatischer Embryonen

Die Normalisierung der somatischen Embryoentwicklung ABA-defizienter Linien durch ABA sollte auch durch die biochemischen Eigenschaften nachzuweisen sein.

ABA-behandelte Zellstrukturen der immunmodulierten Linie zeigten am 21. und 50. Kulturtag eine ähnliche Dichte der Stärkekörner wie unbehandelte Wildtypstrukturen. Transient akkumulierte Stärke wird in reifenden zygotischen Embryonen in späteren Stadien unter Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten für Lipid- und Proteinspeicherung wieder abgebaut (Koornneef und Karssen 1994, Bewley und Black 1994). Eine analoge Abnahme der Stärke wurde in embryogenen Zentren von Wildtyp- und RAP40/7-Zellstrukturen gefunden. Demzufolge akkumulierten auch somatische Embryonen transient Stärke, die in nachfolgenden Entwicklungsstadien metabolisiert werden kann.

Außerdem änderte sich in Wildtyp- und RAP40/7-Zellstrukturen auch das Verteilungsmuster der Stärkeakkumulation im Verlauf der *in vitro* Kultivierung. Während am 21. Kulturtag Stärkeakkumulation im Zentrum der Zellstrukturen nachgewiesen wurde, zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellstrukturen des 50. Kulturtages Stärke in Zellen, die das embryogene Zentrum umgeben. Auch Halperin und Wetherell (1964) fanden, dass Stärkeakkumulation ein typisches Merkmal von Kallusdifferenzierung ist. Thorpe und Murashige (1969) bestätigten diese Ergebnisse an Tabakkalluskulturen. Stärkespeicherung wurde auch nach Induktion der Organogenese (Sprossbildung) nachgewiesen. Unmittelbar vor Einsetzen der eigentlichen Differenzierung nahm die Menge der akkumulierten Stärke ab.

Stärkeakkumulation wurde auch von anderen Autoren zur Charakterisierung von Differenzierungsprozessen während der somatischen Embryogenese herangezogen (Hara et al. 1985, Srinivasan und Vasil 1986, Keller et al. 1988, Ross und Murphy 1993, Faure et al. 1994, Krochko et al. 1994, Sreedhar und Bewley 1998). Die Änderung des Verteilungsmusters der Stärkeakkumulation zwischen 21. und 50. Kulturtag spricht dafür, dass in dieser Phase der somatischen Embryogenese komplexe Differenzierungsprozesse stattfanden. ABA-Applikation zu RAP40/7-Zellstrukturen fördert die Differenzierung und führte auf morphogenetischem und biochemischem Niveau zur Normalisierung der Entwicklung.

Sowohl in ABA-behandelten Zellstrukturen der immunmodulierten Linie als auch in unbehandelten Kulturen konnten Speicherproteine nachgewiesen werden. Ergebnisse der Western Blot Analysen lassen darauf schließen, dass ABA das Expressionsmuster der Untereinheiten beeinflusste (Daten nicht gezeigt). Differenzen in der Untereinheitenzusammensetzung der Speicherproteine in unterschiedlichen Stadien der zygotischen Embryogenese wurden durch Bewley und Black (1994) berichtet. Krochko et al. (1994) fanden veränderte

Zusammensetzung, abnormale Prozessierung und Kompartimentierung der Speicherproteine in somatischen im Vergleich zu zygotischen Embryonen der Luzerne.

Die Akkumulation des anti-ABA scFv-Antikörpers nahm nach ABA-Behandlung zu. Durch exogene ABA wurde die Embryoentwicklung normalisiert, Zelldifferenzierungsprozesse liefen vermehrt ab. Da die CaMV 35S-Promotoraktivität in sich teilenden Geweben erhöht ist (Dudits et al. 1995), wurden größere anti-ABA scFv-Mengen akkumuliert. In Np9-41/4-Kulturen traten diese Unterschiede nach ABA-Applikation nicht auf. Allerdings verhielten sich Np9-41/4-Kulturen unabhängig von der ABA-Applikation morphogenetisch wie Wildtypkulturen. Das unterschiedliche Expressionsverhalten von anti-ABA scFv und anti-Oxazolon scFv exprimierenden Zellstrukturen ist indikativ für die entwicklungsregulierte scFv-Expression unter ABA-Mangelbedingungen.

Konstitutive Expression der kleinen Hitzeschockproteine konnte in somatischen Embryonen aller untersuchten Linien auch nach ABA-Applikation nicht nachgewiesen werden. Die Induzierbarkeit der hsp17-Expression war in allen ABA-behandelten Strukturen höher als in unbehandelten Kulturen. Kanabus et al. (1984) fanden die höchste hsp-Akkumulation nach Hitzestress in Tabaksuspensionskulturen während der logarithmischen Wachstumsphase. Ein Zusammenhang zwischen Entwicklungsstadium und Hitzeschockantwort wurde auch durch Zimmermann et al. (1989) nachgewiesen. Vermutlich reagieren teilungsaktive und differenzierende Zellkulturen wesentlich empfindlicher auf Hitzestress. Da erhöhte Induzierbarkeit kleiner Hitzeschockproteine erst nach ABA-Langzeitbehandlung eintrat, ist dieser Phytohormoneffekt der Förderung von Differenzierungsprozessen während der Entwicklung somatischer Embryonen zuzuschreiben. Die erhöhte hsp17-Akkumulation in Wildtypstrukturen nach ABA-Applikation deutet darauf hin, dass ABA in gewissem Umfang auch die Entwicklung von Wildtypembryonen beeinflusst.

Die Normalisierung der Entwicklung der somatischen Embryonen der immunmodulierten Linie und der ABA-defizienten Mutanten nach ABA-Applikation spiegelt sich auch im Pigmentgehalt wider. So fiel der Chlorophyllgehalt nach ABA-Behandlung bis zum 21. Kulturtag und war geringer als in korrespondierenden unbehandelten Zellkulturstadien. In späteren Stadien (50. Kulturtag) nahm der Chlorophyllgehalt jedoch zu. In Strukturen der ABA-defizienten Linien wurden deutlich höhere Chlorophyllgehalte als in unbehandelten Strukturen gefunden; die Werte näherten sich den Wildtypchlorophyllgehalten an. Die Abnahme der Chlorophyllgehalte bis zum 21. Kulturtag unter ABA-Einfluss in der somatischen

Embryogenese stimmt mit einer ABA-bedingten Hemmung der Chlorophyll-Akkumulation während der Samenentwicklung überein (Le Page-Degivry et al. 1987). Nitsch (1969) stellte fest, dass nach Applikation von  $10^{-6}$ M ABA im Torpedostadium der Embryonen von *Nicotiana tabacum* kein Chlorophyll gebildet wird. Der reduzierte Chlorophyllgehalt früher embryogener Stadien nach ABA-Applikation ist damit charakteristisch für den Differenzierungsgrad dieser Strukturen. Die wildtypähnlichen Chlorophyllgehalte nach ABA-Behandlung der ABA-defizienten Linien am 50. Tag der *in vitro* Kultivierung deuten darauf hin, dass diese Strukturen zu diesem Zeitpunkt ein ähnliches Differenzierungsstadium wie unbehandelte Wildtypstrukturen erreicht hatten.

Aus den biochemischen Parametern ist zu schließen, dass ABA nicht einen metabolischen Schritt beeinflusst, sondern in den komplexen Differenzierungsprozess der Embryogenese eingreift.

In den Untersuchungen wurde durch die eingesetzten Methoden zur Charakterisierung der Embryoentwicklung eindeutig nachgewiesen, dass durch Immunmodulation ABA-Mangel in somatischen Embryonen erzeugt wird. Der Einfluss von ABA auf frühe Embryogeneseprozesse konnte sowohl durch morphogenetische und biochemische Untersuchungen als auch durch die Normalisierbarkeit der Embryoentwicklung mittels ABA-Applikation in einem frühen Entwicklungsstadium (10. Kulturtag) demonstriert werden. Die angewandte Methode eröffnet neue Möglichkeiten zur spezifischen Modulation von Hormoneffekten, da die Funktionalität von Hormonen durch räumlich und zeitlich determinierte Expression eines hormonspezifischen Antikörpers zu beeinflussen ist.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Abscisinsäure auf frühe Prozesse der Embryogenese untersucht. Da frühe Stadien der zygotischen Embryogenese experimentell schwer zugänglich sind und eine zeitlich, räumlich und mengenmäßig definierte Beeinflussung des endogenen ABA-Gehaltes im komplexen System Pflanze nicht zu realisieren ist, wurde das Experimentalmodell der somatischen Embryogenese von *Nicotiana plumbaginifolia* für die Untersuchungen gewählt.

ABA-Mangel kann in embryogenese-kompetenten Zellen der *in vitro* Systeme gentechnisch durch Immunmodulation der ABA-Funktion erzeugt werden, ist in den ABA-Biosynthesemutanten *aba1* und *aba2* genetisch fixiert oder wird biochemisch durch Behandlung der Zellkulturen mit dem ABA-Biosyntheseinhibitor Fluridon hervorgerufen. Zielgerichtete Beeinflussung des ABA-Gehaltes während Zellwachstum und -differenzierung ist durch ABA-Applikation in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration möglich.

Zur Immunmodulation der ABA-Funktion wurden homozygote transgene *Nicotiana plumbaginifolia* Pflanzen (F2) hergestellt, die einen anti-ABA Einzelkettenantikörper (scFv) konstitutiv exprimierten und auf hohem Niveau im ER akkumulierten. Als Kontrolle für mögliche Transgeneffekte wurden transgene *Nicotiana plumbaginifolia* Pflanzen (Np9-41/4) mit Expression eines scFv gegen ein nicht-pflanzliches Hapten (Oxazon) etabliert. Von *in vitro* kultivierten Pflanzen der transgenen Linien, der ABA-Biosynthesemutanten und des Wildtyps wurden Mesophyllprotoplasten isoliert und Zellwachstum und -differenzierung unter definiertem Hormonregime der somatischen Embryogenese durch morphogenetische Kriterien und biochemische Parameter charakterisiert.

Durch Bestimmung des endogenen ABA-Gehaltes mittels ELISA konnte in Zellstrukturen der ABA-Biosynthesemutante im Vergleich zum Wildtyp ein ABA-Defizit nachgewiesen werden. Zellstrukturen der immunmodulierten Linie RAP40/7 enthielten entwicklungsabhängig 18-61x mehr ABA als entsprechende Wildtypstrukturen. Kompensation der hohen ABA-Menge durch Antikörperbindung im ER wurde durch das hohe Niveau der anti-ABA scFv Akkumulation in allen Stadien der immunmodulierten Linie garantiert.

Durch vergleichende morphogenetische und biochemische Untersuchungen von Zellwachstum und -differenzierung der *in vitro* Kulturen der immunmodulierten Linie, der ABA-Biosynthesemutanten und des fluridonbehandelten Wildtyps mit Embryogenesesystemen des unbehandelten Wildtyp- bzw. der transgenen anti-Oxazon scFv exprimierenden Linie wurde

gezeigt, dass ABA-Mangel sowohl das Zellwachstum als auch -differenzierung in relativ frühen Phasen der Embryogenese beeinflusst.

Im Gegensatz zu Embryogenesesystemen von Wildtyp und anti-Oxazolon scFv exprimierender Linie prägten Zellstrukturen der immunmodulierten Linie wie der ABA-Biosynthesemutanten und des fluridonbehandelten Wildtyps einen ABA-Mangelphänotyp aus, der durch großvolumige, abnorm geformte, stark vakuolisierte Zellen charakterisiert war, die zu ungeordneten Zellverbänden zusammentraten. Unter ABA-Mangelbedingungen war die Regenerationseffizienz geringer als in Wildtypkulturen. Sprossbildung trat verzögert ein. Verringerte Stärke- und Pigmentakkumulation in Zellstrukturen der ABA-defizienten Linien spiegelten Differenzierungsunterschiede wider.

Applikation von ( $\pm$ )-ABA ( $1,5 \times 10^{-6}$  M) ab 10. Kulturtag führte zur Normalisierung der somatischen Embryoentwicklung der immunmodulierten Linie und der ABA-defizienten Mutanten. Normalisierte Zellstrukturen unterschieden sich morphogenetisch und biochemisch nicht signifikant vom Wildtyp. Die endogene ABA-Menge in den Zellstrukturen war nach ABA-Behandlung signifikant erhöht. Die Normalisierung der Embryoentwicklung durch exogene ABA ist der Beweis, dass in Zellstrukturen der immunmodulierten Linie wie auch der ABA-Biosynthesemutanten ABA-Mangel die Ursache für Differenzierungsunterschiede war.

Die Charakterisierung des Embryogenesesystems der transgenen anti-Oxazolon scFv exprimierenden Linie zeigte, dass Transgenexpression geringfügig die Regenerationseffizienz somatischer Embryonen nicht aber die Embryodifferenzierung beeinflusst.

Während der Samenentwicklung bewirkte ABA-Mangel Abnormitäten in der „protein body“ Bildung und Anzahl, die sich auch in verringerter Speicherproteinakkumulation in Samen der ABA-Biosynthesemutanten *aba2* und der immunmodulierten Linie widerspiegelten. Samen ABA-defizienter Linien hatten in späten Stadien ein erhöhtes Frischgewicht im Vergleich zu Wildtypsamen. Außerdem wurden größere Mengen Chlorophyll akkumuliert.

Durch die gewählten Versuchsstrategien konnte der ABA-Einfluss auf frühe Embryogenesevorgänge nachgewiesen werden. Dabei erwies sich die Immunmodulation als geeignete Methode zur Untersuchung der Hormonfunktion während der Embryogenese.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ackerson R C (1984) Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *J Exp Bot* 35: 403-413
- Addicott FT, Carns HR (1983) History and introduction. In: Addicott FT, *Absciscic acid*. Praeger Scientific, New York, pp 1-21
- Allan A, Fricker MD, Ward JL, Beale MH, Trewavas AJ (1994) Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 6: 1319-1328
- Allan AC, Trewavas AJ (1994) Absciscic acid and gibberelin perception: inside or out? *Plant Physiol* 104: 1107-1108
- Almoguera C, Prieto-Dapena P, Jordano J (1998) Dual regulation of a heat shock promotor during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *Plant J* 13: 437-446
- Almoguera C, Jordano J (1992) Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein Lea mRNAs. *Plant Mol Biol* 19: 781-792
- Ammirato PV (1974) The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Bot Gaz* 135: 328-337
- Arigoni D, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bachers A, Zenk MH (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10600-10605
- Artsaenko O, Peisker M, zur Nieden U, Fiedler U, Weiler EW, Müntz K, Conrad U (1995) Expression of single chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J* 8: 745-750
- Artsaenko O (1996): Immunomodulation of ABA activity in transgenic tobacco plants. Ph.D. thesis, Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg, Deutschland
- Artsaenko O, Phillips J, Fiedler U, Peisker M, Conrad U (1999) Intracellular immunomodulation in plants – a new tool for the investigations of phytohormones. In: Harper K, Ziegler A (eds) *Recombinant antibodies*. Taylor&Francis, London, pp 145-156
- Artsaenko O, Weiler EW, Müntz K, Conrad U (1994) Construction and functional characterization of a single chain Fv antibody binding to the plant hormone abscisic acid. *J Plant Physiol* 144: 427-429
- Audran C, Borel C, Frey A, Sotta B, Meyer C, Simonneau T, Marion-Poll A (1998) Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* 118: 1021-1028



- Bewley JD, Black M (1994) Seeds. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York, London, pp 35-115
- Bianco-Colomas J, Barthe P, Orlandini M, Le Page-Degivry MT (1991) Carrier-mediated uptake of abscisic acid by suspension-cultured *Amaranthus tricolor* cells. Plant Physiol 95: 990-996
- Black M (1991) Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. In: Davies WJ, Jones HG (eds) Absciscic acid: physiology and biochemistry, Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 99-124
- Bradford MM (1976) Rapid and quantitative method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-252
- Borisjuk N, Sitailo L, Adler K, Malysheva L, Tewes A, Borisjuk L, Manteuffel R (1998) Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. Planta 206: 504-514
- Bray EA, Beachy RN (1985) Regulation by ABA of  $\beta$ -conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. Plant Physiol 79: 746-750
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB (1999) Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. Plant J 17: 427-431
- Busk PK, Pagès M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant Mol Biol 37: 425-435
- Carman JG (1988) Improved somatic embryogenesis in wheat by partial simulation of the in-ovulo oxygen, growth-regulator and dessication environments. Planta 175: 417-424
- Close TJ (1996) Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. Physiol Plant 97: 795-803
- Coca MA, Almoguera C, Jordano J (1994) Expression of sunflower low-molecular-weight heat shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. Plant Mol Biol 25: 479-492
- Conrad U, Fiedler U (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. Plant Mol Biol 38: 101-109
- Conrad U, Fiedler U, Artsaenko O, Phillips J (1998) Single-chain Fv Antibodies expressed in plants. In: Cunningham C, Porter AJR (ed) Recombinant proteins from plants, Humana Press, Totowa, pp 89-102

- Courty C, Ducher M, Coudret A (1997) Comparison of starch, ADP-glucose Pyrophosphorylase and starch synthase levels in non-embryogenic cells and developing embryos in *Hevea brasiliensis*. J Plant Physiol 153: 469-474
- Criková M, Malá J, Eder J, Hrubcová M, Vágner M (1998) Absciscic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. Plant Physiol Biochem 3: 247-255
- Crouch ML (1982) Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. Planta 156: 520-524
- Crouch ML, Sussex IM (1981) Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. Planta 153: 64-74
- Cunningham FX Jr, Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 557-583
- Cutler AJ, Krochko JE (1999) Formation and breakdown of ABA. Trends Plant Sci 4: 472-478
- Daeter W, Hartung W (1993) The permeability of the epidermal cell plasma membrane of barley leaves to abscisic acid. Planta 191: 41-47
- Dahmer ML, Hildebrand DF, Collins GB (1992) Comparative protein accumulation patterns in soybean somatic and zygotic embryos. In Vitro Cell Dev Biol 28P: 106-114
- Davies PJ (ed) Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Deblaere R, Bytebier B, de Greve H, Deboeck F, Schell J, van Montague M, Leemans J (1985) Efficient octopine Ti plasmid derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucl. Acids Res. 13: 4777-4788
- De Jong AJ, Schmidt EDL, de Vries SC (1993) Early events in higher-plant embryogenesis. Plant Mol Biol 22: 367-377
- De la Torre C, Díez JL, López-Sáez JF, Giménez-Martin G (1972) Effect of abscisic acid on the cytological components of the root growth. Cytologia 37: 197-205
- De Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde HD, Thomas TL, Van Kammen A (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot-suspension cultures. Plant 176: 196-204
- Dodeman VL, Le Guilloux M, Ducreux G, de Vienne D (1998) Somatic and zygotic Embryos of *Daucus carota* L. Display different protein patterns until conversion to plants. Plant Cell Physiol 39, 1104-1110

- Dong JZ, Dunstan DI (1996) Characterization of three heat-shock-protein genes and their developmental regulation during somatic embryogenesis in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta* 200: 85-91
- Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci* 99, 475-484
- Dudits D, Györgyey J, Bögre L, Bakó L (1995) Molecular biologie of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 267-308
- Dunstan DI, Dong J-Z, Carrier DJ, Abrams SR (1998) Review. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol –Plant* 34: 159-168
- Eisenberg AJ, Mascarenhas JP (1985) Absciscic acid and the regulation of synthesis of specific seed proteins and their messenger RNAs during culture of soybean embryos. *Planta* 166: 505-514
- Emons AMC (1994) Somatic embryogenesis: cellbiological aspects. *Acta Bot Neerl* 43, 1-14
- Etienne H, Montoro P, Michaux-Ferriere N, Carron MP (1993a) Effects of dessication, medium osmolarity and absciscic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos. *J Exp Bot* 44: 1613-1619
- Etienne H, Sotta B, Montoro P, Miginiac E, Carron M-P (1993b) Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and absciscic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Sci* 88: 91-96
- Evans ML (1984) Functions of hormones at the cellular level of organization. In: Scott TK (ed) *Hormonal regulation of development II. Encyclopedia of plant physiology, New series, Vol 10*, Springer Verlag, Berlin, pp 22-79
- Faure O, Aarouf J (1994) Metabolism of reserve products during development of somatic embryos and germination of zygotic embryos in grapevine. *Plant Sci* 96: 167-178
- Faure O, Dewitte W, Nougarede A, van Onckelen H (1998) Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts. *Physiol Plant* 102: 591-595
- Fernando SC, Gamage CKA (2000) Absciscic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Sci* 151: 193-198
- Fiedler U, Phillips J, Artsaenko O, Conrad U (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3: 205-216

- Finkelstein RR (1994) Maternal effects govern variable dominance of two abscisic acid response mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 105: 1203-1208
- Finkelstein RR, Tenbarger KM, Shumway JE, Crouch ML (1985) Role of ABA in maturation in rapeseed embryos. *Plant Physiol* 78: 630-636
- Fischer W, Bergfeld R, Schopfer P (1987) Induction of storage protein synthesis in embryos of mature plant seeds. *Naturwissenschaften* 74: 86-88
- Fong F, Koehler DE, Smith JD (1983a) Fluridone induction of vivipary during maize seed development. In: Krueger JE, La Berge DE (eds) III. Int. Symp. on pre-harvest sprouting in cereals, Boulder, Colo. Westview press, pp 188-196
- Fong F, Smith JD, Koehler DE (1983b) Early events in maize seed development. *Plant Physiol* 73: 899-901
- Frey A, Audran C, Marin E, Sotta B, Marion-Poll A (1999) Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase expression. *Plant Mol Biol* 39: 1267-1274
- Fry SC (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol* 37: 165-186
- Fry S.C. (1993) Loosening the ties. *Curr Biol* 3: 355-357
- Fujii JAA, Slade D, Olsen R, Ruzin SE, Redenbaugh (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci* 72: 93-100
- Goldberg R.B., de Pavia G., Yadegari R. (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266, 605-614
- Grill E, Himmelbach A (1998) ABA signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1: 412-418
- Groot SPC, Karssen CM (1992) Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. Studies with the *sitiens* mutant. *Plant Physiol.* 99: 952-958
- Györgyey J, Gartner A, Németh K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol* 16: 999-1007
- Hable WE, Oishi KK, Schumaker KS (1998) *Viviparous-5* encodes phytoene desaturase, an enzyme essential for abscisic acid (ABA) accumulation and seed development in maize. *Mol Gen Genet* 257: 167-176
- Hahne G, Hoffmann F (1984) Dimethyl sulfoxide can initiate cell divisions of arrested callus protoplasts by promoting cortical microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5449-5453

- Halperin W, Wetherell DF (1964) Adventive embryogeny in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Amer J Bot 51: 273-283
- Hara S, Falk H, Kleinig H (1985) Starch and triacylglycerol metabolism related to somatic embryogenesis in *Papaver orientale* tissue cultures. Planta 164: 303-307
- Hartung W, Slovik S (1991) Physiological properties of plant growth regulators and plant tissues determine their distribution and redistribution: stomatal regulation by abscisic acid in leaves. New Phytol 119: 361-382
- Hatzopoulos P, Fong F, Sung ZR (1990) Absciscic acid regulation of DC8, a carrot embryogenic gene. Plant Physiol 94: 690-695
- Hendrix DL, Radin JW (1984) Seed development in cotton: feasibility of a hormonal role for abscisic acid in controlling vivipary. J Plant Physiol 117: 211-221
- Hendrix DL, Radin JW, Nieman RA (1987) Intracellular pH of cotton embryos and seed coats during fruit development determined by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Plant Physiol 85: 588-591
- Hetherington AM, Quatrano R (1991) Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. New Phytol 119: 9-32
- Higashi K, Shiota H, Kamada H (1998) Patterns of Expression of the genes for glutamine synthase isoforms during somatic and zygotic embryogenesis in carrot. Plant Cell Physiol 39: 418-424
- Hilhorst HWM, Downie B (1995) Primary dormancy in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. MoneyMaker): studies with the *sitiens* mutant. J Exp Bot 47: 89-97
- Himmelbach A, Iten M, Grill E (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. Phil Trans R Soc Lond B 353: 1439-1444
- Hoche V, Sotta B, Maldiney R, Miginiac E (1991) Changes in abscisic acid and its  $\beta$ -D-glucopyranosyl ester levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed development. Plant Cell Reports 10: 444-447
- Holdworth M, Kurup S, McKibbin R (1999) Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. Trends Plant Sci 4: 275-280
- Hood EE, Helmer GL, Fraley RT, Chilton MD (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region pTiBo542 outside of T-DNA. J Bacteriol 168, 1291-1301
- Imai R, Moses MS, Bray EA (1995) Expression of an ABA-induced gene of tomato in transgenic tobacco during periods of water deficit. J Exp Bot 46: 1077-1084

- Ivanova A, Velcheva M, Denchev P, Atanassov A, van Onckelen HA (1994) Endogenous hormone levels during somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiol Plant* 92: 85-89
- Kaiser WM, Hartung W (1981) Uptake and release of abscisic acid by isolated photoautotrophic mesophyll cells, depending on pH gradients. *Plant Physiol* 68: 202-206
- Kamada H, Harada H (1981) Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L.. *Plant Cell Physiol* 22: 1423-1429
- Kanabus J, Pikaard CS, Cherry JH (1984) Heat shock proteins in tobacco cell suspension during growth cycle. *Plant Physiol* 75: 639-644
- Karssen CM (1976) Uptake and effect of abscisic acid during induction and progress of radicle growth in seeds of *Chenopodium album*. *Physiol. Plant* 36: 259
- Karssen CM, Brinkhorst-van der Swan DLC, Breekland AE, Koornneef M (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. *Planta* 157: 158-165
- Keller GL, Nikolau BJ, Ulrich TH, Wurtele ES (1988) Comparison of starch and ADP-glucose phosphorylase levels in nonembryogenic cells and developing embryos from induced carrot cultures. *Plant Physiol* 86: 451-456
- Kermode AR (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit Rev Plant Sci* 9: 155-195
- Kochkar TS (1979) Effects of abscisic acid and auxins on the growth of tobacco callus. *Z Pflanzenphysiol* 97: 1-4
- Komamine A, Matsumoto M, Tsukahara M, Fujiwara A, Kawahara R, Ito M, Smith J, Nomura K, Fujimura T (1990) Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures – physiology, biochemistry and molecular biology. In: Nijkamp HJJ, van der Plas LHW, van Aartrijk J (eds) *Progress in plant cellular and molecular biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 307-313
- Koornneef M, Hanhart CJ, Hilhorst HWH, Karssen CM (1989) *In vivo* inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 90: 463-469
- Koornneef M, Jorna ML (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. *Theor Appl Genet* 61: 385-393

- Koornneef M, Karssen CM (1994) Seed dormancy and germination. In: Meyerowitz EM, Somerville (eds) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, pp 313-334
- Koornneef M, Léon-Kloosterziel KM, Schwartz SH, Zeevaart JAD (1998) The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 36: 83-89
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 61: 377-383
- Krochko JE, Pramanik SK, Bewley JD (1992) Contrasting storage protein synthesis and messenger RNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 99: 46-53
- Kruse E, Mock H-P, Grimm B (1995) Reduction of coproporphyrinogen oxidase level by antisense RNA synthesis leads to deregulated gene expression of plastid proteins and affects the oxidative defense system. *EMBO J* 14: 3712-3720
- Laemmli MK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lahr W, Raschke K (1988) Abscisic acid contents and concentrations in protoplasts from guard cells and mesophyll cells of *Vicia faba* L.. *Planta* 173: 528-531
- Le Page-Degivry MT, Boillot A, Loquès F, Bulard C (1987) An analysis of the role of abscisic acid on the differential expansion and chlorophyll synthesis of the two cotyledons of dormant apple embryo in culture. *Physiol Plant* 69: 87-92
- Leps (1998) Immunmodulation der Samenreifung in transgenen Tabakpflanzen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199-222
- Leydecker MT, Moureaux T, Kraepiel Y, Schnorr K, Caboche M (1995) Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. *Plant Physiol* 107:1427-1431
- Li B, Wolyn DJ (1995) The effects of ancymidol, abscisic acid, uniconazole and paclobutrazol on somatic embryogenesis of asparagus. *Plant Cell Rep* 14: 529-533
- Lichtenthaler HK (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of the isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 47-65

- Lichtenthaler HK, Becker K (1970) Inhibition of the light-induced vitamin K<sub>1</sub> and pigment synthesis by abscisic acid. *Phytochemistry* 9: 2109-2113
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* 400: 271-274
- Lindsey K, Topping JF (1993) Embryogenesis: a question of pattern. *J Exp Bot* 44: 359-374
- Linforth RST, Bowman WR, Griffin DA, Marples BA, Taylor IB (1987) 2-trans-ABA alcohol accumulation in the wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens*. *Plant Cell Environ* 10: 599-606
- Linossier L, Veisseire P, Cailloux F, Coudret A (1997) Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Sci* 124: 183-191
- Liotenberg S, North H, Marion-Poll A (1999) Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol Biochem* 37: 341-350
- Loveys BR, Robinson SP (1987) Abscisic acid synthesis and metabolism in barley leaves and protoplasts. *Plant Sci* 49, 23-30
- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Hygueney P, Frey A, Marion-Poll A (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 15: 2331-2342
- Marion-Poll A, Marin E, Bonnefoy N, Pautot V (1993) Transposition of the maize autonomous element *Ac* in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *Mol Gen Genet* 238: 209-217
- Marion-Poll A (1997) ABA and seed development. *Trends Plant Sci* 2: 447-448
- McCarty DR (1995) Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 71-93
- Merlot S, Giraudat J (1997) Genetic analysis of abscisic acid signal transduction. *Plant Physiol* 114: 751-757
- Mordhorst AP, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) Plant embryogenesis. *Crit. Rev Plant Sci* 16: 535-576
- Munroe S, Pelham H (1986) An hsp70-like protein in the E.R.: Identity with the 78kD glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46: 291-300



- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nagy JI, Maliga P (1976) Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Z Pflanzenphysiol* 78: 453-455
- Neill SJ, Horgan R (1985) Absciscic acid production and water relations in wilted tomato mutants subjected to water deficiency. *J Exp Bot* 36: 1222-1231
- Netting AG (2000) pH, absciscic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations. *J Exp Bot* 51: 147-158
- Newton RJ (1977) Absciscic acid effects on fronds and roots of *Lemna minor* L.. *Amer J Bot* 64: 45-49
- Nickle TC, Yeung EC (1994) Further evidence of a role for absciscic acid in conversion of somatic embryos of *Daucus carota*. *In Vitro Cell Dev Biol* 30P: 96-103
- Nitsch JP (1969) Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19: 389-404
- Norton G, Harris JF (1975) Compositional changes in developing rape seed (*Brassic napus* L.). *Planta (Berl.)* 123: 163-174
- Nover L (1991) Heat shock response. CRC Press, Boca Raton
- Orr W, Keller WA, Singh J (1986) Induction of freezing tolerance in an embryogenic cell suspension culture of *Brassica napus* by absciscic acid at room temperature. *J Plant Physiol* 126: 23-32
- Pedron J, Brault M, Nake C, Miginiac E (1998) Detection of absciscic-acid-binding proteins in the microsomal protein fraction of *Arabidopsis thaliana* with absciscic-acid-protein conjugates used as affinity probes. *Eur J Biochem* 252: 385-390
- Perl A, Saad S, Sahar N, Holland D (1995) Establishment of long-term embryogenic cultures of seedless *Vitis vinifera* cultivars – a synergistic effect of auxins and the role of absciscic acid. *Plant Sci* 104: 193-200
- Perras MR, Abrams SR, Balsevich JJ (1994) Characterization of an absciscic acid carrier in suspension-cultured barley cells. *J Exp Bot* 45: 1565-1573
- Pitto L, Lo Schiavo F, Giuliano G, Terzi M (1983) Analysis of the heat-shock protein pattern during somatic embryogenesis of carrot. *Plant Mol Biol* 2: 231-237
- Phillips J, Artsaenko O, Fiedler U, Horstmann C, Mock HP, Müntz K, Conrad U (1997) Seed-specific immunomodulation of absciscic acid activity induces a developmental switch. *EMBO J* 16: 4489-4496

- Quatrano RS, Bartels D, Ho THD, Pagés M (1997) New insights into ABA-mediated processes. *Plant Cell* 9: 470-475
- Quarrie SA (1982) Droopy: a wilted mutant of potato deficient in abscisic acid. *Plant Cell Environ* 5: 23-26
- Quin X, Zeevaart JAD (1999) The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15354-15361
- Qureshi JA, Kartha KK, Abrams SR, Steinhauer L (1989) Modulation of somatic embryogenesis in early and late-stage embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) under the influence of ( $\pm$ )-abscisic acid and its analogs. *Plant Cell Tiss Org Cult* 18: 55-69
- Rajasekaran K, Vine J, Mullins MG (1982) Dormancy in somatic embryos and seeds of *Vitis*: changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. *Planta* 154: 139-144
- Rajashekar CB, Lafta A (1996) Cell-wall changes and cell tensions in response to cold acclimation and exogenous abscisic acid in leaves and cell cultures. *Plant Physiol* 111: 605-612
- Robertson JM, Yeung EC, Reid DM, Hubick KT (1990) Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. 2. Mitotic activity. *J Exp Bot* 41: 339-350
- Rock CD, Bowlby NR, Hoffmann-Benning S, Zeevaart JAD (1992) The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. has reduced chlorophyll fluorescence yields and reduced thylakoid stacking. *Plant Physiol* 100: 1796-1801
- Rock CD, Heath TG, Gage DA, Zeevaart JAD (1991) Absciscic alcohol is an intermediate in abscisic acid biosynthesis in a shunt pathway from abscisic aldehyde. *Plant Physiol* 97: 670-676
- Rock CD, Quatrano RS (1995) The role of hormones during seed development. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 671-697
- Ross JHE, Murphy DJ (1993) Differential accumulation of storage products in developing seeds and somatic cell cultures of *Daucus carota* L.. *Plant Sci* 88: 1-11
- Rousselin P, Kraepiel Y, Maldiney R, Miginiac E, Caboche M (1992) Characterization of three hormone mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for a common ABA deficiency. *Theor Appl Genet* 85: 213-221
- Saito K, Kaneko H, Yamazaki M, Yoshida M, Murakoshi I (1990) Stable transfer and expression of chimeric genes in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) using a Ri binary vector. *Plant Cell Rep* 8: 718-721

- Saunders JW, Tsai CJ (1999) Production of somatic embryos and shoots from sugarbeet callus: effects of abscisic acid, other growth regulators, nitrogen source, sucrose concentration and genotype. *In Vitro Cell Dev Biol –Plant* 35: 18-24
- Schopfer P, Bajracharya D, Plachy C (1979) Control of seed germination by abscisic acid. I. Time course of action in *Sinapis alba* L.. *Plant Physiol* 64: 822-827
- Schopfer P, Plachy C (1984) Control of seed germination by abscisic acid. II. Effect on embryo water uptake in *Brassica napus* L.. *Plant Physiol* 76: 155-160
- Schopfer P, Plachy C (1985) Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L.. *Plant Physiol* 77: 676-686
- Schultz TF, Quatrano RS (1997) Evidence for surface perception of abscisic acid by rice suspension cells as assayed by Em gene expression. *Plant Sci* 130: 63-71
- Schussler JR, Brenner ML, Brun WA (1984) Abscisic acid and its relationship to seed filling in soybeans. *Plant Physiol* 76: 301-306
- Schwartz SH, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M, Zeevaart JAD (1997a) Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114: 161-166
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty D (1997b) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874
- Shinozaki K, Yamaguchi –Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotech* 7: 161-167
- Shinozaki K, Yamaguchi –Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115: 327-334
- Shinozaki K, Yamaguchi –Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3: 217-223
- Shoemaker RC, Christofferson SE, Galbraith DW (1987) Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Plant Cell Rep.* 6, 12-15
- Skriver K, Mundy J (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-512
- Slawinska J, Obendorf RL (1991) Soybean somatic embryo maturation: composition, respiration and water relations. *Seed Sci Res* 1: 251-262

- Sreedhar L, Bewley JD (1998) Nitrogen- and sulfur containing compounds enhance the synthesis of storage reserves in developing somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Sci 134: 31-44
- Srinivasan C, Vasil IK (1986) Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). J Plant Physiol 126: 41-48
- Stewart GR, Smith H (1972) Effects of abscisic acid on nucleic acid synthesis and induction of nitrate reductase in *Lemna polyrhiza*. J Exp Bot 23: 875-885
- Tabaeizadeh Z (1998) Drought-induced responses in plant cells. Int Rev Cytol 182: 193-247
- Taiz L (1984) Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. Annu Rev Plant Physiol 35: 585-657
- Tal M, Nevo Y (1973) Abnormal stomatal behaviour and root resistance, and hormonal imbalance in three wilted mutants of tomato. Biochem Genet 8: 291-300
- Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JAD, McCarty D (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. Proc Natl Acad Sci USA 94: 12235-12240
- Taylor IB, Linforth RST, Al-Naieb RJ, Bowman WR, Marples BA (1988) The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. Plant Cell Environ 11: 739-745
- Taylor IB, Tarr AR (1984) Phenotypic interactions between abscisic acid deficient tomato mutants. Theor Appl Genet 68: 115-119
- Taylor MG, Vasil IK (1996) Quantitative analysis of ultrastructural changes during zygotic and somatic embryogenesis in pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) Sex Plant Reprod 9: 286-298
- Tetteroo FAA, Hoekstra FA, Karssen CM (1995a) Induction of complete desiccation tolerance in carrot (*Daucus carota*) embryoids. J Plant Physiol 145: 349-356
- Tetteroo FAA, Bino RJ, Bergervoet JHW, Hasenack B (1995b) Effect of ABA and slow drying on DNA replication in carrot (*Daucus carota*) embryoids. Physiol Plant 95: 154-158
- Tewes A, Manteuffel R, Adler K, Weber E, Wobus U (1991) Long term cultures of barley synthesize and correctly deposit seed storage proteins. Plant Cell Rep 10: 467-470
- Thomas TL (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. Plant Cell 5:1401-1410
- Thorpe TA, Murashige T (1969) Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. Can J Bot 48: 277-285

- Tokuji Y, Mizue Y, Masuda H (1995) Effects of methyljasmonate and concanavalin A on embryogenesis and the induction of secondary somatic embryos of carrot. *Biosci Biotech Biochem* 59: 1675-1678
- Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt EDL, Verhoeven HA, van Kammen A, de Vries SC (1994) Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194, 565-572
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* 47: 325-338
- Weymeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol* 112: 747-757
- Wehmeyer N, Vierling E (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 122: 1099-1108
- West MAL, Harada JJ (1993) Embryogenesis in higher plants: an overview. *Plant Cell* 5: 1361-1369
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinate behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57: 443-462
- Wurtele ES, Wang H, Durgerian S, Nikolau BJ, Ulrich TH (1993) Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol* 102: 303-312
- Xu N, Coulter KM, Bewley JD (1990) Absciscic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. *Planta* 182: 382-390
- Xu N, Bewley JD (1995) The role of absciscic acid in germination, storage protein synthesis and desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, as shown by inhibition of its synthesis by fluridone during development. *J Exp Bot* 46: 687-694
- Yasuda H, Nakajima M, Masuda H, Ohwada T (2000) Direct formation of heart-shaped embryos from differentiated single carrot cells in culture. *Plant Sci* 152: 1-6
- Zeevaart JAD (1999) Absciscic acid metabolism and its regulation. In: Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR (eds) *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 189-207
- Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of absciscic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 439-479

- Zimmermann JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423
- Zimmermann JL, Apuya N, Darwish K, O'Carroll C (1989) Novel regulation of heat shock genes during carrot somatic embryo development. *Plant Cell* 1: 1137-1146
- Zur Nieden U, Neumann D, Bucka A, Nover L (1995) Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta* 196: 530-538

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Frau Dr. Renate Manteuffel und Herrn Dr. Udo Conrad für die Überlassung des interessanten Themas danken, das die Grundlage für die vorliegende Arbeit bildete. Viele anregende Diskussionen und die gewährte Unterstützung trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei. Frau Dr. Renate Manteuffel danke ich ganz herzlich für die sehr persönliche Betreuung über viele Jahre seit meinem ersten Praktikum im Jahr 1990.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus, Direktor des Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, möchte ich für die Möglichkeit danken, an diesem Institut zu arbeiten.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Serologie und Phytoantikörper danke ich sehr für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung. Ganz besonders half mir Frau Helga Rudolph bei der Durchführung von Western Blot Experimenten und durch gewissenhafte Herstellung von Kulturmedien, sowie durch die Bereitschaft, anfallende Aufgaben schnell und unkompliziert zu erledigen. Frau Elisabeth Nagel führte die Bestimmungen des ABA-Gehaltes durch.

Die Konstrukte zur Herstellung transgener Pflanzen wurden freundlicherweise durch Dr. Olga Artsaenko und Dr. Ulrike Fiedler zur Verfügung gestellt. Frau Carla Liebing führte die ersten Transformationen durch. Frau Annemarie Silhengst, Frau Helga Tübke und Frau Martina Maier betreuten die transgenen Pflanzen in Phytokammer und Gewächshaus.

Frau Dr. Annegret Tewes gilt mein Dank für die Einarbeitung in das somatische Embryogenesensystem und die zahlreichen Hinweise und Diskussionen. Frau Sabine Skiebe möchte ich für viele praktische Hinweise und die Bereitstellung bestimmter komplexer Lösungen danken.

Herrn Dr. Hans-Peter Mock danke ich für die Möglichkeit, Pigmentzusammensetzungen in seinem Labor analysieren zu lassen. Die Versuche wurden von Frau Elena Barthel und Frau Barbara Kettig durchgeführt.

Bei Frau Dr. Uta zur Nieden, Institut für Pflanzenbiochemie Halle, bedanke ich mich sehr für die elektronenmikroskopischen Arbeiten an somatischen Embryonen und die Bearbeitung von Samen.

Dr. Thomas Nothnagel, Bundesanstalt für Züchtungsforschung Quedlinburg, danke ich für die Einarbeitung in die histologische Technik. Herr Dr. Reinhard Panitz half mir sehr bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate und durch die Herstellung von Quetschpräparaten zur Analyse der Stärkeakkumulation in somatischen Embryonen.

Frau Dr. Winfriede Weschke möchte ich für zahlreiche praktische Hinweise und Diskussionen danken.

Frau Heike Ernst und Frau Birgit Schäfer gilt mein Dank für die fotografischen Arbeiten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für die Unterstützung und die Ermöglichung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch allen hier nicht namentlich erwähnten für die Rücksicht, Anteilnahme und tatkräftige Hilfe bei der Erstellung der Arbeit.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe unter Verwendung der von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verfasst und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Gatersleben, im September 2000

Sigrun Senger



## Lebenslauf

Name: Sigrun Senger  
Geburtstag: 21.05.1971  
Geburtsort: Halle  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1977-1987 Besuch der Allgemeinbildenden Polytechnischen Oberschule in Halle mit Abschluss der 10. Klasse  
1987-1989 Besuch der Erweiterten Allgemeinbildenden Polytechnischen Oberschule in Halle mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulbildung:

1989-1995 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Sept. 1992 - Juni 1993 Studienaufenthalt in Großbritannien, University College of Wales (Swansea), Abschluss BSc Biochemistry, Anfertigung einer wissenschaftlichen Arbeit unter Anleitung von Dr. D.H. Jones, wissen-  
Titel der Arbeit:  
„Agglutinating activity and saccharide specificity of recombinant forms of the lectin Concanavalin A“  
Okt. 1994 - Juli 1995 Diplomarbeit am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben in der Arbeitsgruppe Serologie unter Anleitung von Dr. R. Manteuffel  
Titel der Diplomarbeit:  
„PCR-Klonierung und Charakterisierung in der Embryogenese aktiver Gene zur Untersuchung ihrer Expressionsmuster während der Protoplastendifferenzierung zu somatischen Embryonen“  
Okt. 1993 – März 1995 Magisterstudiengang Fachübersetzen Englisch an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Jan. 1996 - Anfertigung der Dissertation am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben unter Betreuung durch Dr. U. Conrad und Dr. R. Manteuffel  
Titel der Doktorarbeit: „Einfluss von ABA auf frühe Embryogeneseprozesse“