

1.	2. Berichtsart Abschlussbericht 2004	3.
4. Titel des Berichts Produktion von Polyhydroxyfettsäuren in Nutzpflanzen Erzeugung und Charakterisierung PHF-speichernder Pflanzen		
5. Autor(en) (Name, Vorname(n)) Prof. Dr. Christian Jung		6. Abschlußdatum des Vorhabens 30.06.2004
		7. Veröffentlichungsdatum
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung Am Botanischen Garten 1-9 24118 Kiel		9. Ber. Nr. Durchführende Institution 2
		10. Förderkennzeichen 99 NR 072
		11. Seitenzahl: 15
		12. Literaturangaben:
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Postfach 14 02 70 53107 Bonn		14. Tabellen: 4
		15. Abbildungen: 1
16. Zusätzliche Angaben		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V., Hofplatz 1, 18 276 Gülzow		
18. Kurzfassung Im Bereich der PHB-Analytik wurden neben Kieler Transformanten Proben aus Einbeck und München analysiert. Dabei wurde das Material hinsichtlich von Polymergehalt und Polymerisationsgrad geprüft. Neue Transformanten mit samenspezifischem USP-Promoter in Arabidopsis- und Raps bzw. sink-spezifischem B33-Promoter in Zuckerrübe wurden erstellt und gemessen.		
19. Schlagwörter Polyhydroxyfettsäuren, PHB, „triple“-Konstrukte, transgene Pflanzen, Pflanzenzüchtung, nachwachsende Rohstoffe		
20. Verlag: Springer Menzel, Harloff, Jung (2003): Appl.Microb.Biotechnol. 60,571-576 Lössl, Eibl, Harloff, Jung, Koop (2003): Plant Cell Rep 21: 891-899		

## Abschlussbericht für das Forschungsprojekt

# Produktion von Polyhydroxyfettsäuren in Nutzpflanzen

## Phase II

**Antragszeitraum 1.1.2000 - 30.6.2004**

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

Prof. Dr. Christian Jung

Institut für Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

Prof. Dr. Alexander Steinbüchel

Botanisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop

MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm/Potsdam

Prof. Dr. Lothar Willmitzer

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

Dr. Hinrich Harling

## 1. Laufzeit des Projektes

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

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

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

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

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

Berichtszeitraum: 01.07.2003- 30.06.2004

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

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

### 2.1. Erzeugung transgener PHB-speichernder Pflanzen

#### 2.1.1. *In planta* Transformation von *Arabidopsis*

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

#### 2.1.2. Transformation von Raps

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

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

## 2.2. PHB-Analytik

### 2.2.1. Transgene Rüben aus Einbeck

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

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

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

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

### 2.2.2. Transgener Tabak aus München

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

### 2.2.3. Transgene Arabidopsis aus Kiel

Die PHB-Gehalte in den Samen von 474 Transformanten aus 2.1.1 lagen in der T1-Generation bei 2-54 ppm (Kontrolle 2-20), lediglich eine Transformante erreichte einen Wert von 1586+/-360 ppm. 26 Pflanzen, die wegen zu geringer Samenernte in T1 nicht analysiert werden konnten, wurden nachgebaut zusammen mit den 6 Kandidaten aus T1 mit Werten >40ppm und einer Kontrolle <40 ppm. Alle wurden vor dem Pikieren einer Kanamycin-Selektion ausgesetzt. Die Ergebnisse der Samengehalte in Tab.3. zeigen, dass nur der Genotyp USP\_I\_395 gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte PHB-Werte auch in selektierten Einzelpflanzennachkommenschaften besitzt. Verwunderlich für ein Transformationsexperiment mit Arabidopsis ist die geringe Zahl von transgenen Pflanzen (1 von 501!). Allerdings wurden bei den Experimenten mit dem samenspezifischen fatB4-Promoter gar keine Pflanzen mit signifikanter PHB-Synthese gefunden. Um die transgene USP\_I\_395 bezüglich Promoterspezifität und PHB-Synthese näher zu charakterisieren wurden in T2-Pflanzen verschiedene Zielgewebe beprobt: alte und junge Blätter, junge und reife Schoten an verschiedenen Terminen, sowie Samen und Schotenwände zur Zeit der Ernte. Die Ergebnisse waren überraschend und weisen darauf hin, dass der USP-Promoter in Arabidopsis nicht samenspezifisch aktiv ist (Abb.1.). Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen bei Raps in 2.4.

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

### 2.2.4. Transgener Raps aus Kiel

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

## 2.3. Weiterführende Analysen

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

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

## 3. Zusammenfassung der Ergebnisse aller Teilprojekte der Projektphase II

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

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

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

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

**Übersicht 2:** PHB-Gehalte in verschiedenen transgene Pflanzen nach Kerntransformation und Plastidentargeting unter Verwendung von alternativer Promotoren und Phasingenen (P). FatB4, P-LH und USP sind samenspezifische Promotoren, B33 ein Knollen-/Speicherwurzel-spezifischer und AlcA ein alkoholinduzierbarer Promoter. Das Monomer in Rübe tritt nach pBI\_B33\_ABC-Transformation auf.

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

**Übersicht 3:** PHB-Gehalte in verschiedenen transgene Pflanzen nach Lokalisation der Gene in Organellen. Die Bezeichnung "oper" bedeutet, dass hier die ursprüngliche bakterielle Operonstruktur für einen transplastomen Ansatz verwendet wurde, Plastpr kennzeichnet die Verwendung eines plastidären Promoters, PHBpr die des ursprünglichen PHB-Promoters. Nicht erfasst sind zahlreiche Transformationsexperimente der Arbeitsgruppe Willmitzer zum Thema "kurative Maßnahmen".

Spezies	Organell	Konstrukt	Speichergewebe	max. PHB [%DW]	Arbeitsgruppe
Solanum tuberosum	Mitochon.	35S/ ABC	Blatt, Knolle	<0,05	Willmitzer
Nicotiana tabacum	Plastid	Plastpr/ oper	Blatt	2,4	Koop
		PHBpr/ oper	Blatt	1,7	Koop
		AlcA; T7/ oper	Blatt	0,13	Koop

## 4. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und abschliessende Bewertung

Obwohl die Zielvorgaben der II. Projektphase (Nutzpflanze mit >5% PHB, MG >1 Mio, Ertragsverlust <20%) nicht erreicht wurde, liegt dennoch ein erheblicher Kenntnissgewinn aus den Teilprojekten vor. Dieser lässt sich wie folgt zusammenfassen:

- Es wurden mehrere neue PHA-Synthasen kloniert und charakterisiert. Diese verfügen über zum Teil deutlich veränderte Substratspezifitäten.
- Die Regulation von Phasingenen wurde analysiert und es wurden erstmals Pflanzen mit Phasingenen unter der Kontrolle pflanzeigener Promotoren erzeugt und analysiert. Die Funktion der in Bakterien zur Stabilisierung der PHB-Granula benötigten Phasine lässt sich nicht ohne weiteres auf Pflanzen übertragen. Arabidopsispflanzen mit Phasingenen zeigten die gleichen Wachstumsstörungen bei hohen PHB Gehalten wie transgene Pflanzen ohne Phasine.
- Zum ersten Mal wurden transplastome PHB-speichernde Pflanzen erzeugt. Eine Pflanze enthielt relativ hohe Mengen an PHB. Die Messungen aus der Gewebekultur waren jedoch später nach der Überführung in das Gewächshaus nicht mehr reproduzierbar.
- Das Problem der frühen Wachstumshemmung nach konstitutiver Expression wurde gelöst, indem die Expression der PHB Gene in transplastomen Pflanzen durch Import einer unter der Kontrolle eines Ethanol Promotors stehenden T7-RNA-Polymerase in den Chloroplasten gestellt wurde. Die PHB-Gehalte lagen jedoch nur bei max. 0,13%.
- Im Verlaufe des Projektes wurden Pflanzen mit zuvor noch nie erreichten PHB-Gehalten erzeugt. Die höchste Speicherleistung, die im Projekt erreicht wurde, betrug 40% PHB in Arabidopsis, 5% in hairy roots der Zuckerrübe und 1% in Kartoffel.
- Das in Pflanzen gespeicherte PHB war von hoher Qualität in Bezug auf Molekulargewicht und Extraktionseigenschaften (außer bei den Pflanzen, bei denen überwiegend Monomer auftrat).
- Der PHB-Gehalt (konstitutive Expression auf dem 1% Level) wurde in Arabidopsis über 8 Generationen stabil vererbt.
- Trotz Verwendung identischer Konstrukte wie in Arabidopsis, konnten keine PHB speichernden Kartoffeln erzeugt werden. Der Grund liegt in der plastidär lokalisierten 3-Keto-Thiolase.
- Die konstitutive Expression von PHB-Genen hatte abhängig von der Pflanzenart erhebliche Auswirkungen auf das Wachstum. So wurde bei Arabidopsis Kümmerwuchs oberhalb von 5% PHB beobachtet. Verlangsamtes Wachstum trat ab 0,5% PHB in Arabidopsis und Zuckerrübe auf. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die konstitutive Expression von PHB-Genen keine Lösung darstellt. Vielmehr sollten PHB-Gene unter der Kontrolle gewebespezifischer Promotoren stehen. Diese Erkenntnisse wurden in der zweiten Phase umgesetzt. Allerdings konnten aufgrund der langen

Zeitdauer für die Erzeugung und Bewertung von transgenen Nutzpflanzen und deren Nachkommenschaften keine abschliessenden Ergebnisse erzielt werden.

- Um das Problem der Wachstumsdepression zu lösen, wurden Arabidopsis, Tabak und Kartoffeln erzeugt, bei denen das phbA Gen unter der Kontrolle eines Alkohol-induzierbaren Promotors aus *Aspergillus* stand. Die daraus erhaltenen Arabidopsispflanzen erzeugten deutlich geringere PHB-Gehalte bis 2,7 mg/g FG, waren aber phänotypisch normal. Ähnliche Befunde wurden für Kartoffeln erhalten, die Gehalte an PHB waren aber noch geringer.
- Erfolgreicher waren Versuche an Kartoffeln mit knollenspezifischer Expression der PHB Gene. Es wurden transgene Kartoffeln mit PHB Gehalten bis 1 mg/g FG erhalten. Allerdings zeigten diese Kartoffeln einen drastischen Phänotyp. Die Gehalte waren über die Generationen stabil, jedoch war die Knollenmasse um bis zu 50% reduziert.

## 5. Ausblick

Als Ergebnis des Projektes stehen neue PHA-Polymerasen mit neuer Substratspezifität zur Verfügung, die für die Bildung von Mischpolymeren genutzt werden können. Zukünftig sollten PHB-Gene ausschließlich in den Kern eingebracht werden. Dort sollten sie unter der Kontrolle gewebespezifischer oder organspezifischer Promotoren stehen. Dazu sollten weitere Promotoren getestet auf ihre Eignung zur Kontrollen von PHB-Genen getestet werden. Besonders lohnend erscheinen aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die Kartoffelknolle und der Rübenkörper als Zielorgane. Die Expression der Gene muss bestimmt werden, um die Funktionalität der Kombination aus Promotor und bakterieller Synthase zu belegen (Northern, RT-PCR). Weiterhin muss die Funktion der Synthasen im Zielgewebe genauer untersucht werden. Dazu sind umfangreiche molekulare Analysen notwendig (Western-Analysen). Entsprechende Antikörper stehen zur Verfügung. Schließlich sollten breitere Analysen des Stoffwechsels transgener Pflanzen mittel GC/MS vorgenommen werden, um zu überprüfen, welche Auswirkungen die Etablierung der PHB-Synthese auf den Grund- und Sekundärstoffwechsel der Pflanze hat. Diese Untersuchungen können die Grundlage für weitere kurative Maßnahmen zum Ausgleich von Wachstumsdepressionen sein.

## 6. Publikationen

Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorfer, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R. N., and Willmitzer, L., 2001: Transgenic *Arabidopsis* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta* **211**, 841-845.

Bohmert, K., Balbo, I., Steinbüchel, A., Tischendorf, G., and Willmitzer, L., 2002: Constitutive Expression of the  $\beta$ -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants. A Major Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants. *Plant Physiology* **128**, 1282-1290.

Dovzhenko A, Bergen U, Koop HU (1998) Thin alginate layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: shoot formation in less than two weeks. *Protoplasma* 204: 114-118

Dovzhenko A, Dal Bosco C, Meurer J, Koop, H.U. (2003): Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* (im Druck)

Dovzhenko A and Koop H.U (2003) Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts. *Planta* (im Druck)

Jung, C. und Steinbüchel, A. (2001). Bioplastik aus Nutzpflanzen. *Biologie in unserer Zeit*, 31:250-258.

Jung, C., G. Menzel, H. Harloff and L. Willmitzer (2002) Prospects for PHB production in plants: from *Arabidopsis* to sugar beet. International Symposium on Biological Polyesters, Münster, 22.-26.9.2002

Jung, C., Harloff, H., Cai, D. Transfer of PHB-genes to crop species. International symposium on biological polyhydroxyalcanoates, Tokio, 9.-11.9.1998

Lössl, A., C. Eibl, H.-J. Harloff, C. Jung, H.-U. Koop (2003): Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Reports* 21, 891-899

Menzel, G. (2001). Nutzpflanzen als Kunststofffabriken. *Bioworld*, 6:6-8.

Menzel, G., and C. Jung (2002) Produktion von biologisch abbaubaren Polyestern in Nutzpflanzen, *Vortr. Pflanzenzücht*, 54:145-152

Menzel, G., H.-J. Harloff, C. Jung (2003): Expression of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 571-576

## 7. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1a. PHB-Messungen in transgenen Rüben aus Einbeck (ppm PHB= $\mu\text{g/gDW}$ )

	Ernte 1 n=3		Ernte 2 n=2		Vorextraktion n=3	
	ppm	$\pm$	ppm	$\pm$	ppm	$\pm$
<b>Kontrollen</b>						
8T_0015_1	68	10	3	0		
8T_0015_2	-	-	3	2		
6B_2840_1	70	17	1	0	16	3
6B_2840_2	49	34	1	0		
6B_2840_3	74	12				
6B_2840_4	50	8				
6B_2840_5	52	6				
6B_2840_6	38	3				
<b>Transformanten</b>						
PH22-1_1	64	3	4	2		
PH22-1_2	55	18	5	2		
PH22-3_1	27	1				
PH22-3_2	21	7				
PH22-4_1	35	4				
PH22-4_2	24	5				
PH22-5_1	52	20				
PH22-5_2	58	2				
PH22-6_1	52	17				
PH22-6_2	36	14				
PH22-9_1	41	8				
PH22-9_2	37	6				
PH22-10_1	27	4				

PH22-10_2	26	6		
PH22-14_1	59	9		
PH22-16_1	31	9		
PH22-16_2	28	5		
<b>PH22-20_1</b>	-	-	<b>74</b>	<b>5</b>
<b>PH22-20_2</b>	-	-	<b>68</b>	<b>5</b>
PH22-21_1	97	9		
PH22-21_2	55	5		
PH22-23_1	29	15		
PH22-23_2	32	13		
PH22-24_1	42	8		
PH22-24_2	35	4		
PH22-25_1	19	3		
PH22-25_2	20	8		
PH22-28_1	48	40		
PH22-29_1	18	1		
PH22-29_2	37	18		
<b>PH22-30_1</b>	<b>165</b>	<b>9</b>		
<b>PH22-30_2</b>	<b>149</b>	<b>12</b>	21	1
PH22-31_1	22	3		
PH22-31_2	25	7		
PH22-32_1	44	10		
PH22-32_2	22	8		
PH22-33_1	31	6		
PH22-33_2	33	9		
PH22-38_1	13	9		
PH22-38_2	34	21		
PH22-39_1	45	9		
PH22-39_2	23	1		
PH22-40_1	56	18		
PH22-40_2	47	11		
PH22-41_1	26	7	2	1
PH22-41_2	-	-	2	0
PH22-42_1	21	2	1	1
PH22-42_2	15	7	2	1
<b>PH22-44_1</b>	<b>34</b>	<b>8</b>	<b>51</b>	<b>5</b>
<b>PH22-44_2</b>	<b>92</b>	<b>9</b>	<b>91</b>	<b>7</b>
PH22-45_1	39	3	24	0
PH22-45_2	-	-	29	2
PH22-46_1	20	4		
PH22-46_2	25	8		
PH22-49_1	18	7	4	0
PH22-49_2	18	5	9	2
PH22-51_1	22	6		
PH22-51_2	22	8		
<b>PH22-53_1</b>	<b>511</b>	<b>22</b>		
<b>PH22-53_2</b>	<b>267</b>	<b>18</b>	130	4
PH22-54_1	26	6	31	9
PH22-54_2	34	9	14	1
PH22-55_1	29	2	12	5
PH22-55_2	-	-	17	7
PH22-56_1	33	1	22	6
PH22-56_2	-	-	14	3
			85	2

PH22-57_1	26	0				
PH22-57_2	43	11				
PH22-59_1	59	1				
PH22-59_2	40	6				
PH22-60_1	29	3	6	3		
PH22-60_2	21	2	9	4		
PH22-61_1			37	5		
PH22-61_2			35	3		
PH22-62_1			10	1		
PH22-62_2			14	2		
PH22-63_1			33	3		
PH22-63_2			27	2		
PH22-64_1			26	4		
PH22-64_2			22	5		
PH22-65_1			40	0		
PH22-65_2			34	4		
PH22-66_1			38	7		
PH22-66_2			38	3		
PH22-67_1			27	0		
PH22-67_2			32	9		
PH22-68_1			25	2		
PH22-68_2			38	2		
PH22-71_1			10	3		
PH22-71_2			11	4		
PH22-72_1			14	2		
PH22-72_2			17	4		
PH22-73_1			13	0		
PH22-73_2			6	0		
PH22-74_1			8	0		
PH22-74_2			12	5		
<b>Positivkontrolle</b>						
#100_1			1216	33	1123	39
Kartoffel/Golm						
<b>Gewebekultur</b>						
PH22-30	221	36				
PH22-53	1539	69				

Tabelle 1b. Extraktionsversuche von transgenen Rüben aus Einbeck (ppm PHB= $\mu\text{g/gDW}$ )

je 3 Messungen ppm im Rückstand	Methanol		Dichlormethan	Chloroform		direkt
	kalt	heiß	heiß	kalt	+HAc	
6B_2840_1	16		4			21
PH22-30_1	21	9	97	99	19	114
PH22-53_1	130	85	188	231	47	327
Positivko. #100_1	1123		81			1216

Tabelle 2. PHB-Messungen in transgenem Tabak aus München

PHB	nicht induziert			Ethanolinduktion1			Ethanolinduktion2		
	n	ppm	±	n	ppm	±	n	ppm	±
Wildtyp	11	<b>5</b>	3	6	<b>26</b>	11			
291-5	4	<b>126</b>	18	6	<b>331</b>	8	4	<b>309</b>	71
291-8	4	<b>71</b>	14	6	<b>311</b>	22	3	<b>937</b>	54
291-12							4	<b>594</b>	49
294-3	12	<b>346</b>	48	10	<b>572</b>	43			
294-5	4	<b>143</b>	33	6	<b>795</b>	47	4	<b>1383</b>	84
294-16							4	<b>186</b>	12
295-3	4	<b>120</b>	15	6	<b>605</b>	31			
295-5	4	<b>166</b>	19	6	<b>246</b>	18			
295-6	4	<b>154</b>	18	6	<b>578</b>	51	4	<b>156</b>	17
295-10	4	<b>171</b>	8	2	<b>469</b>	1			
280-3	4	<b>584</b>	85	4	<b>656</b>	203			
278-14	8	<b>58</b>	17	8	<b>50</b>	33			
278-9	8	<b>341</b>	43	8	<b>392</b>	36			

Tabelle 3. PHB-Messungen in der T1-und T2-Generation transgener Arabidopsis-Pflanzen

Pool	T1		T2	
	6-8 Pflz.	SD	8 Pflz.	*21 Pflz.
	ppm		ppm	SD
Kontrolle	17	9	*6	3
A.t._USP_I_436	3	1	14	4
A.t._USP_I_34	44	28	6	3
A.t._USP_I_22	48	3	11	5
A.t._USP_I_5	48	31	10	5
A.t._USP_I_17	48	18	13	7
A.t._USP_I_61	54	3	12	9
A.t._USP_I_395	1586	360	*1271	294
Einzelpflz. aus T2				
A.t._USP_395_1			802	46
A.t._USP_395_2			1730	57
A.t._USP_395_3			1414	66
A.t._USP_395_4			1100	49
A.t._USP_395_5			1325	68
A.t._USP_395_6			1200	55
A.t._USP_395_7			1313	110
A.t._USP_395_8			1712	48
A.t._USP_395_9			1378	85
A.t._USP_395_10			737	78
A.t._USP_395_11			1454	21
A.t._USP_395_12			1209	65
A.t._USP_395_13			1155	23
A.t._USP_395_14			898	18
A.t._USP_395_15			1840	79
A.t._USP_395_16			1162	72
A.t._USP_395_17			1472	39
A.t._USP_395_18			1319	100
A.t._USP_395_19			1195	78

A.t._USP_395_20	803	32
A.t._USP_395_21	1477	131

Tabelle 4. PHB-Messungen in transgenen Rapspflanzen

n=3	Blatt		Schotenwände		Samen	
	ppm	SD	ppm	SD	ppm	SD
Kontrolle RS306					<b>9,0</b>	2,9
RS306_1	<b>2,5</b>	1,2			<b>4,9</b>	1,2
RS306_2	<b>4,4</b>	1,7			<b>4,9</b>	1,2
RS306_3	<b>4,2</b>	0,8	<b>4,1</b>	1,5	<b>5,6</b>	1,4
Vektorkontrollen						
R_PBI_1	<b>18,4</b>	4,5			<b>3,9</b>	1,3
R_PBI_2	<b>4,1</b>	0,2			<b>6,3</b>	0,0
R_PBI_3	<b>5,0</b>	2,0			<b>11,0</b>	1,0
R_PBI_4	<b>5,2</b>	0,2			<b>6,3</b>	2,2
R_PBI_5	<b>5,5</b>	1,1			<b>4,2</b>	1,5
R_PBI_6	<b>5,8</b>	2,1			<b>7,4</b>	1,7
R_PBI_7	<b>6,3</b>	0,2			<b>5,1</b>	0,3
Transformanten						
R_USP_I_18	<b>7,1</b>	2,8			<b>3,7</b>	0,7
R_USP_II_1	<b>4,0</b>	0,4			<b>3,8</b>	1,5
R_USP_II_42	<b>5,1</b>	1,1	<b>8,6</b>	2,6	<b>4,3</b>	0,9
R_USP_II_28	<b>5,8</b>	0,2			<b>4,3</b>	1,4
R_USP_II_30	<b>8,1</b>	1,2			<b>4,9</b>	1,2
R_USP_II_21	<b>5,0</b>	0,6			<b>5,2</b>	1,7
R_USP_II_23	<b>4,0</b>	1,5			<b>5,4</b>	2,8
R_USP_II_29	<b>4,1</b>	0,2			<b>5,4</b>	0,7
R_USP_II_20	<b>4,4</b>	0,7			<b>5,4</b>	1,7
R_USP_II_11	<b>2,8</b>	0,5			<b>5,8</b>	1,7
R_USP_I_23	<b>7,7</b>	2,3			<b>5,9</b>	1,1
R_USP_I_26	<b>6,1</b>	1,9			<b>6,1</b>	1,8
R_USP_I_6	<b>8,2</b>	2,5			<b>6,3</b>	2,8
R_USP_II_26	<b>9,1</b>	4,6			<b>6,8</b>	0,6
R_USP_II_16	<b>1,9</b>	0,4			<b>6,9</b>	3,8
R_USP_I_29	<b>5,2</b>	2,5			<b>7,0</b>	3,9
R_USP_III_1	<b>4,0</b>	1,1			<b>7,2</b>	1,2
R_USP_II_44	<b>4,3</b>	0,6			<b>7,3</b>	0,8
R_USP_I_22	<b>6,1</b>	1,5			<b>8,1</b>	1,8
R_USP_II_22	<b>5,9</b>	1,2			<b>8,2</b>	1,5
R_USP_I_27	<b>4,4</b>	0,7			<b>8,6</b>	1,4
R_USP_II_18	<b>3,6</b>	0,3			<b>8,7</b>	1,7
R_USP_I_34	<b>4,7</b>	2,0	<b>26,2</b>	5,7	<b>9,5</b>	2,6
R_USP_II_36	<b>k.Bl.</b>				<b>9,9</b>	2,0
R_USP_II_53	<b>3,7</b>	0,7	<b>9,3</b>	1,8	<b>10,3</b>	1,4
R_USP_I_11	<b>6,4</b>	0,8	<b>6,6</b>	2,2	<b>12,1</b>	3,3
R_USP_II_46	<b>2,1</b>	0,8	<b>13,9</b>	2,0	<b>12,9</b>	4,0
R_USP_I_17	<b>7,1</b>	1,0			<b>13,1</b>	4,5
R_USP_II_55	<b>2,7</b>	0,6	<b>8,7</b>	0,9	<b>13,3</b>	2,6
R_USP_II_57	<b>3,5</b>	1,2	<b>7,7</b>	1,2	<b>13,3</b>	2,3
R_USP_II_45	<b>4,3</b>	2,7	<b>8,8</b>	0,1	<b>15,0</b>	1,5

R_USP_I_31	<b>k.Bl.</b>		<b>3,3</b>	0,4	<b>15,2</b>	0,4
R_USP_II_43	<b>3,2</b>	0,4	<b>10,8</b>	2,2	<b>15,6</b>	1,1
R_USP_II_47	<b>2,4</b>	0,6	<b>9,3</b>	1,7	<b>15,9</b>	3,4
R_USP_II_54	<b>4,8</b>	1,5	<b>6,9</b>	0,9	<b>16,2</b>	5,3
R_USP_II_9	<b>5,6</b>	1,6			<b>16,3</b>	6,2
R_USP_I_28	<b>3,2</b>	0,7			<b>16,3</b>	3,7
R_USP_II_25	<b>5,7</b>	0,9			<b>17,8</b>	2,9
R_USP_II_56	<b>3,4</b>	0,6	<b>10,7</b>	0,3	<b>18,5</b>	3,7
R_USP_II_24	<b>5,2</b>	2,2			<b>23,0</b>	2,8
R_USP_II_3	<b>6,4</b>	1,7			<b>24,5</b>	2,1
R_USP_II_13	<b>3,1</b>	1,0			<b>24,9</b>	1,7
R_USP_III_1b	<b>5,0</b>	0,9			<b>33,8</b>	3,2
R_USP_II_14	<b>2,8</b>	0,3			<b>39,0</b>	5,9
R_USP_II_5	<b>4,3</b>	0,6			<b>50,1</b>	6,3
R_USP_I_33	<b>6,2</b>	3,0	<b>7,1</b>	1,0	<b>60,7</b>	12,2
R_USP_I_9	<b>12,6</b>	1,3			<b>63,6</b>	1,6
R_USP_I_5	<b>4,5</b>	0,8			<b>65,6</b>	12,3
R_USP_I_13	<b>8,6</b>	3,7			<b>82,4</b>	25,0
R_USP_I_19	<b>k.Bl.</b>				<b>87,9</b>	9,0
R_USP_I_20	<b>4,7</b>	1,4			<b>89,5</b>	8,6
R_USP_I_24	<b>6,4</b>	1,3			<b>90,7</b>	27,9
R_USP_I_10	<b>5,6</b>	1,8			<b>90,9</b>	40,7
R_USP_I_32	<b>5,5</b>	3,1	<b>3,8</b>	0,3	<b>97,0</b>	1,9
R_USP_I_4	<b>8,6</b>	3,5			<b>101,8</b>	18,6
R_USP_II_35	<b>6,5</b>	1,5			<b>102,4</b>	10,7
R_USP_I_8	<b>15,1</b>	8,0			<b>108,3</b>	19,4
R_USP_I_21	<b>7,3</b>	1,4			<b>113,3</b>	16,3
R_USP_II_15	<b>2,8</b>	0,6	<b>8,5</b>	2,4	<b>119,5</b>	6,2
R_USP_II_49	<b>2,8</b>	0,4	<b>9,5</b>	2,2	<b>120,9</b>	3,9
R_USP_II_19	<b>3,3</b>	0,9	<b>9,5</b>	1,4	<b>127,5</b>	7,5
R_USP_I_25	<b>10,0</b>	5,6			<b>133,1</b>	13,7
R_USP_II_33	<b>5,9</b>	0,5			<b>138,7</b>	12,2
R_USP_II_31	<b>10,0</b>	2,2			<b>141,1</b>	19,1
R_USP_I_15	<b>5,5</b>	1,9			<b>168,6</b>	14,4
R_USP_I_1	<b>10,0</b>	2,8			<b>171,5</b>	19,5
R_USP_II_17	<b>4,9</b>	0,8	<b>7,1</b>	2,7	<b>steril</b>	
R_USP_II_32	<b>5,4</b>	0,5	<b>5,2</b>	1,4	<b>steril</b>	
R_USP_II_37	<b>26,8</b>	15,3	<b>20,3</b>	6,9	<b>steril</b>	
R_USP_II_4	<b>4,1</b>	0,6	<b>4,0</b>	1,1	<b>steril</b>	

Abbildung 1. Spezifität des USP-Promoters in Arabidopsis

