

**Transformation einer argentinischen  
Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L.)  
durch Transfer eines Seneszenz-verzögernden  
Gens zur Verbesserung der Ertragsleistung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Eduardo Daniel Souza Canada**

---

Bayreuth 2012

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Pflanzenzüchtung steht in den nächsten 50 Jahren vor enormen globalen Herausforderungen (die wachsende Weltbevölkerung, der fortschreitende Klimawandel, etc.). Sie kann jedoch einen wesentlichen Beitrag leisten, um die Produktivität der landwirtschaftlichen Flächen zu steigern, denn das Ertragspotenzial vieler Pflanzen ist noch nicht ausgeschöpft. Weizen ist zusammen mit Mais und Reis das meist angebaute Getreide der Welt. Ein Ziel der Gentechnikforschung am Weizen ist unter anderen die Wachstums- und Ertragsteigerung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Übertragung eines Isopentenyltransferase (*ipt*)-Gens in eine argentinische Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L.) die Cytokinin-Biosynthese unter der Kontrolle Seneszenz-spezifischer Promotoren in Weizen zu stimulieren. Das Enzym Isopentenyltransferase besitzt eine Schlüsselposition, da es die Schrittmacherreaktion in der Cytokinin-Biosynthese katalysiert. Seneszenz-assoziierte Gene (SAG) werden bei Eintritt der Seneszenz hochreguliert. Die Verwendung eines Seneszenz-spezifischen Promotors führte bei einigen Pflanzen (z.B. Tabak und Reis) zur verstärkten Expression des *ipt*-Gens in der letzten Lebensphase der Blätter, verbunden mit einer deutlichen Verzögerung der Blattseneszenz. Die auf diese Weise verzögerte Seneszenz wiederum vermindert in einer autoregulatorischen Schleife die Aktivität des Seneszenz-spezifischen Promotors und verhindert so eine Überproduktion der Cytokinine. Um den Seneszenz-Prozess der Weizenpflanze durch Stimulierung der Cytokininbiosynthese zu verzögern und so eine höhere Ertragsleistung zu erreichen, wurde eine bisher noch nicht übertragene Nutzenkassette mittels Partikelbeschuss in eine argentinische Sommerweizenvarietät eingebracht. Diese Nutzenkassette besteht aus der proteincodierenden Region des Isopentenyltransferase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* und dem Seneszenz-spezifischen *HvS40*-Promotor aus *Hordeum vulgare*. Parallel dazu wurden die Modell-Sommerweizenvarietät (*Triticum aestivum* L. Bobwhite SH 98 26) mit dem *ipt*-Gen unter der Kontrolle des Seneszenz-spezifischen *SAG12*-Promotors aus *Arabidopsis thaliana* transformiert und bis zur T<sub>2</sub>-Generation untersucht.

### 5.1 SCREENING VON 22 ARGENTINISCHEN SOMMERWEIZEN-VARIETÄTEN

Eine effektive Gewebekultur ist als Grundlage für die Erzeugung transgener Pflanzen unabdingbar. Leider ist die Transformationseffizienz bei Weizen nicht sehr hoch, wodurch die genetische Manipulation sehr erschwert ist. Ziel war es deshalb zunächst, optimale Bedingungen für die *in vitro* Kultur zu finden. Durch ein erstes Screening der unreifen Embryonen von 22

argentinischen Sommerweizenvarietäten dreier Saatgutbetriebe wurden geeignete argentinische Genotypen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur embryogenen Scutellarkallus-Bildung und zur Regeneration ganzer Pflanzen, ausgewählt. Für den Erfolg des ersten Schritts der Gewebekultur, der Kallusbildung, sind das geeignete Entwicklungsstadium der unreifen Embryonen sowie die Konzentration von 2,4-D als Hormon ausschlaggebend. Die Kombination der Embryo-Entwicklungsstadien H und W, die sich in der Länge des Embryos sowie des Scutellums unterscheiden, mit den zwei 2,4-D Konzentrationen 1 und 2 mg pro Liter L3-5 Medium ergab vier verschiedene Bedingungen denen alle Weizensorten ausgesetzt wurden. Insgesamt wurden 10091 unreife Embryonen hinsichtlich Scutellarkallus-Induktion, Kallusproliferation von der Scutellumoberfläche, vorzeitige Keimung unreifer Embryonen, Regeneration, Sprossbildung und Kultureffizienz getestet. Die besten Ergebnisse bei fünf von sechs der getesteten Parameter erbrachte die Kombination des Entwicklungsstadiums H und der Auxinkonzentration 1 mg 2,4-D /l medium, wobei die Zadoks Skala eine bessere Methode zur Definition des Entwicklungsstadiums war als die Zahl der Tage nach der Blüte. Die Induktion eines Scutellarkallus sowie die Regenerationsfähigkeit der unreifen Embryonen zur Pflanze waren vom Genotyp, vom Entwicklungsstadium und von der 2,4-D Konzentration im Medium abhängig. Hingegen war die Sprossbildung im Wesentlichen nur vom Genotyp abhängig. Aufgrund ihrer hohen Werte bei der Scutellarkallus-Bildung und der Regenerationsfähigkeit wurde „Klein Brujo“ von den 22 untersuchten argentinischen Sommerweizensorten als geeignetste Sorte ermittelt und für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Unreife Embryonen des Genotyps „Klein Brujo“ wurden in den Induktionsmedien L3-5 und MS (welches in dieser Arbeit optimiert wurde) kultiviert. Das modifizierte MS-Medium mit 3 % Maltose und 1 mg/l 2,4-D erbrachte eine Verbesserung hinsichtlich der Scutellarkallus-Bildung, der Kallusproliferation aus der Scutellumoberfläche, sowie der anschließenden Regeneration bzw. Kultureffizienz.

### **5.2 TRANSFORMATION DURCH PARTIKELBESCHUSS UND *IN VITRO* GEWEBEKULTUR DER UNREIFEN EMBRYONEN DES WEIZENS**

Für „Klein Brujo“ konnte ein auf Partikelbeschusstechnik basierendes Transformationssystem etabliert werden. Als selektierbares Markergen wurde das *bar*-Gen, als Marker- Reportergen das *gfp*-Gen verwendet. Beide Gene liegen auf dem Plasmid pGFPBAR und stehen unter der Kontrolle des *Ubiquitin*- bzw. des *CaMV 35S*-Promotors. Die Transformation erfolgte durch den gleichzeitigen Beschuss von Zellen mit zwei Plasmiden (Cotransformation): Eines trägt das Nutzgen (pS40-GUS, pSG506, pSG516 und pS40-IPT) und das andere das Marker- Reporter-

Gen (pGFPBAR). Das Plasmid pS40-IPT wurde durch die Kombination des um ca. 2 kb verkürzten *HvS40*-Promotors aus pS40-GUS und dem *ipt*-Gen mit dem *nos*-Terminator aus pSG516 neu konstruiert. Alle anderen Plasmide wurden zur Verfügung gestellt.

Für den Partikelbeschuss von embryonem Scutellarkallus mit den Nutzgenen wurden drei Varianten der Zellkultur (Scutellarkallus-Induktionsmedium, osmotische Behandlung und Kallus-Induktionsanfang (Vorkultur)) und drei physikalische Varianten (Abstand zwischen Zielgewebe und Abstoppgitter, Beschussdruck und Durchmesser der Goldpartikel) getestet. Nach der Optimierung der Beschussbedingungen ergaben sich drei Variable, die für eine hohe Transformationseffizienz von „Klein Brujo“ (10 % im besten Versuch) entscheidend waren: das Kallus-Induktionsmedium, die Vorkultur und das osmotische Behandlungsmedium.

Die neu etablierte Gewebekulturstrategie führte zu einer Verkürzung der *in vitro* Kulturdauer zwischen Embryonenpräparation und *ex vitro* Kultur. Mit 9 bis 12 Wochen entspricht diese Kulturdauer einer der kürzesten, die man in der Literatur finden kann. Diese Methode der Gewebekultur zusammen mit der Verwendung von Phosphinothricin (PPT) als Selektionsmittel während der *ex vitro* Kultur minimierte die Anzahl sogenannter „Ausreißer“ oder „falscher Positiver“ unter den überlebenden Pflanzen und es wurde eine hohe Ausbeute an Cotransformanten (97,4%) erreicht. Allerdings ließen sich durch unabhängige Segregation keine Reporter- bzw. Selektionsgen-freien T<sub>1</sub>-Pflanzen kultivieren, wie es auch in anderen Arbeiten beschrieben wurde. Es zeigte sich, dass sich alle Fremdgene in einer Kopplungsgruppe befanden, also gemeinsam segregierten. Dies ist wahrscheinlich auf die Einfügung von Transgenen in einen einzigen Locus oder in eng miteinander verbundene Loci zurückzuführen. In der Folge der Generationen T<sub>0</sub> bis T<sub>3</sub> wurde ein progressives jedoch unterschiedliches *gene-silencing* des *bar*- und des *gfp*-Gens, die auf demselben Plasmid liegen, festgestellt. Es handelt sich vermutlich um posttranskriptionales *gene-silencing*.

Da es von Vorteil ist, Promotoren aus gleichen oder eng verwandten Pflanzenarten für gentechnische Zwecke zu verwenden, wurde der aus der Gerste stammende *HvS40*-Promotor eingesetzt. Seine im Zuge der natürlichen Seneszenz auftretende Expression kann in Gerstenblättern sowohl durch Dauer-Dunkelheit als auch durch Pathogenbefall induziert werden. In einem Vorversuch wurde zunächst die Funktionsfähigkeit der beiden Seneszenz-assoziierten Promotoren (*HvS40* und *SAG12*) im heterologen Weizensystem unter Verwendung des *uidA*-Reporter-Gens geprüft. Die histochemische Analyse des *HvS40*-GUS wurde in Seneszenz-induzierten jungen Blättern, in natürlich seneszierenden Blättern, in Stängeln und Wurzeln und in verschiedenen Blütenteilen sowie in Körnern der transgenen T<sub>0</sub>-Pflanzen durchgeführt. Im Vorversuch wurde der Promotor im Mesophyll durch Pathogenbefall (zumeist Pilzinfektionen)

induziert, jedoch nicht durch die Seneszenz des Blattes. Darüber hinaus war er auch in Epidermis- und Schließzellen aktiv, was bedeutet, dass die Mesophyll-spezifische Expression des *HvS40*-Promotors in dem heterologen System verloren ging. Außerdem wurde eine ektopische Expression des *uidA*-Gens in jungen Blütenorganen des Weizens beobachtet.

*SAG12*-GUS wurde weder in adulten noch in seneszierenden Blättern, noch in anderen Organen des Weizens exprimiert.

In allen  $T_0$ -Regeneraten (sechs ausgesuchte Linien der Sorte „Klein Brujo“ mit dem pS40-IPT-Plasmid und zwei Linien der Sorte Bobwhite SH 98 26 mit dem pSG516-Plasmid) konnte über *Southern blot*-Analysen die vollständige proteincodierende Region des eingeführten *ipt*-Gens nachgewiesen werden. Die Anzahl der übertragenen Genkopien lag zwischen zwei und sieben. Das Konstrukt aus einem um 2 kb verkürzten *HvS40*-Promotor und dem *ipt*-Gen (pS40-IPT) wurde in Weizenblättern sowohl bei künstlich induzierter als auch bei natürlicher Seneszenz exprimiert. Dies wurde mittels RT-PCR der *ipt*-mRNA in  $T_0$ - und  $T_2$ -Pflanzen nachgewiesen. Die Fähigkeit des verkürzten *HvS40*-Promotors die Expression des *ipt*-Gens bei der Blattseneszenz von transgenem Weizen zu steuern, legt nahe, dass *cis*-Elemente, die als Repressoren auf die Expression bei einem seneszierenden Blatt einwirken, stromaufwärts des verkürzten Promotors lokalisiert waren. Es wurde bereits berichtet, dass Getreide-Promotoren nicht zwangsläufig in allen Getreidearten den gleichen Effekt zeigen. Dies kann sowohl an unterschiedlicher räumlicher- oder zeitlicher Expressionskontrolle als auch an der von der Promotorlänge abhängigen Promotoraktivität liegen.

### 5.3      PHYSIOLOGISCHE EFFEKTE DER ÜBERTRAGUNG DES *IPT*-GENS UND DER ERTRAGSLEISTUNG

Um einen Hinweis auf die Funktion des *ipt*-Gens unter der Kontrolle von beiden SAG Promotoren zu bekommen wurde der Chlorophyll-Gehalt während der induzierten Seneszenz von voll entwickelten, abgeschnittenen Fahnenblättern von *ipt*-PCR-positiven transgenen  $T_1$ -Pflanzen gemessen. Bei fünf von den sechs untersuchenden Transgenen zeigte sich ein deutlich geringerer Chlorophyll-Verlust was auf die Aktivität des *ipt*-Gens und eine erhöhte Cytokininkonzentration hindeutet. Das Chl *a/b*-Verhältnis war höher als bei den Kontrollen, da das Chl *a* während der Seneszenz-Verzögerung langsamer als das Chl *b* abgebaut wird. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den zwei Linien der  $T_1$ -Pflanzen mit dem Konstrukt pSG516 beobachtet.

Der Gehalt der dominierenden Cytokinine, Isopentenyladenosin, Zeatinribosid und Dihydrozeatinribosid und der der *O*-Glucoside von Zeatinribosid- und Dihydrozeatinribosid,

wurde in seneszierenden Fahnenblättern von T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanzen der drei pS40-IPT Linien, die den geringsten Chlorophyll-Abbau zeigten, analysiert. Eine beinahe Verdopplung des Cytokinin-Gesamtgehaltes gegenüber der Azygoten konnte in Extrakten der seneszierenden Fahnenblätter nachgewiesen werden. In den meisten Fällen war der Zeatinribosid-Gehalt in der Kornfüllungsphase sowohl bei freien Cytokinininen als auch bei den O-Glucosiden der anteilmäßig höchste. Dies ist bereits von anderen seneszierenden *ipt*-Pflanzen bekannt. Die Ergebnisse der RT-PCR Analyse der transgenen Pflanzen zeigten eine höhere Expression des *ipt*-Gens während der Kornfüllungsphase verglichen mit der Anthese, die als Beginn der allmählichen Fahnenblattseneszenz gilt. Allerdings war der Cytokiningehalt in intakten Pflanzen trotz des Promoters aus Gerste aufgrund der hier vorliegenden heterologen Expression nicht ausreichend, um eine deutliche Seneszenz-Verzögerung hervorzurufen. Dieser Effekt von *ipt*-Expression kann durch den schwachen Promotor oder durch eine partielle Fremdgenstilllegung des übertragenen Gens zustande gekommen sein. Die stärkere Expression des *ipt*-Gens wurde durch RT-PCR Analyse sowohl bei der induzierten Seneszenz voll entwickelter, abgeschnittener Fahnenblättern als auch bei natürlicher Seneszenz bestätigt. Im Gegensatz zur Verzögerung des Chlorophyllabbaus bei der induzierten Seneszenz wurden keine entsprechenden Effekte bei der natürlichen Seneszenz beobachtet. Dieses unterschiedliche Verhalten zwischen natürlicher und induzierter Seneszenz in transgenen Weizenblättern bestätigt, dass beide Seneszenz-Prozesse unterschiedlich ablaufen.

In einer *SAG12-ipt* Linie wurde der Cytokiningehalt der T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Pflanzen untersucht. Die Transgenen zeigten eine höhere Konzentration der drei gemessenen Cytokinine in der Kornfüllungsphase gegenüber der Wildtypkontrolle, aber keine signifikante Differenz gegenüber den azygoten Pflanzen. Das schwache Signal der *ipt*-mRNA nach RT-PCR deutet darauf hin, dass der *SAG12*-Promotor in seneszierenden Weizenblättern schwach exprimiert wird. Keine der untersuchten transgenen Pflanzen zeigten eine deutliche Verzögerung der Seneszenz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die T<sub>2</sub>-Generation während ihres gesamten Lebenszyklus sorgfältig verfolgt. Dabei wurden die homozygoten T<sub>2</sub>-Pflanzen der vier Klein Brujo-Linien und einer Linie der Sorte „Bobwhite SH 98 26“, die eine Expression des *ipt*-Gens nach RT-PCR-Analyse zeigten, mit den entsprechenden azygoten Pflanzen verglichen. Es wurde bei der Sorte „Bobwhite SH 98 26“ keine signifikante Differenz zwischen den homozygoten Pflanzen der *SAG12-ipt*-Linie und den azygoten Pflanzen sowohl bei den morphometrischen Daten als auch bei den Ertragsparametern gefunden. Bei der Sorte „Klein Brujo“ wurde in allen vier transgenen Linien keine deutlich sichtbare Seneszenz-Verzögerung sowohl während der sequenziellen Seneszenz der Blattorgane als auch während der monokarpischen Seneszenz der ganzen Pflanze

festgestellt. Allerdings zeigten zwei Linien gegenüber den Azygoten bei den Parametern Körner pro Ähre, Korngewicht insgesamt sowie durchschnittliches Korngewicht höhere Ergebnisse. Die Steigerung der Kornanzahl wurde durch ein niedrigeres Korngewicht nicht aufgewogen. Es ist heutzutage allgemein akzeptiert, dass die Photosynthese der Ähre einen wichtigen Beitrag zum Korntrag liefert. Die höhere Blattanzahl sowie die längere Lebenszeit der Fahnenblätter und Ähren der zwei homozygoten Linien könnte die bessere Versorgung ihrer Körner erklären. So wurde die Expression des *HvS40*-Promotors mit Hilfe des *uidA*-Reporter-Gens in einem frühen Stadium der Körner in den Hüllspelzen, Deckspelzen, Vorspelzen und in der Samenschale beobachtet. Neben einer Bestätigung der Expression des *ipt*-Gens könnte sowohl die Steigerung des Cytokinin-Gehalts in der Weizenähre als auch in Endosperm-Zellen des Weizenkorns eine weitere Erklärung für die bessere Ertragsleistung der zwei transgenen Linien sein. Denn es wurde gezeigt, dass Cytokinin die Kornanzahl steigert und die Kornentwicklung stimuliert, wenn es auf die Ähre oder auf die oberirdischen Teile der Weizenpflanze aufgetragen wird.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollte versucht werden, eine Seneszenzverzögerung in den Blättern durch den Transfer des *ipt*-Gens unter Kontrolle des homologen Seneszenz-assoziierten Promotors zu erreichen, der aber nicht in Fahnenblatt aktiv ist. Dies könnte sich letztlich günstig auf das Ährenwachstum auswirken, so dass Ähren mit einer größeren Kornzahl und somit einem höheren Korntrag entstehen würden.

## 6 SUMMARY

Plant breeding is facing in the next 50 years enormous global challenges (the world's growing population, the progressive climate change, etc.). However, it can significantly contribute to improving the productivity of agricultural areas, because the harvest potential of many plants is not yet fully exploited. Wheat besides corn and rice is the world's most cultivated cereal. One aim of genetic research on wheat is to improve its growth and productivity.

The aim of the present work was to stimulate cytokinin biosynthesis in a variety of Argentine summer wheat (*Triticum aestivum* L.) by the transfer of an isopentenyl transferase (*ipt*-) gene under the control of a senescence-specific promoter. The enzyme isopentenyl transferase is of key importance in that it catalyses the rate-limiting step in the biosynthesis of cytokinins. The expression of senescence-associated genes (SAGs) is increased upon the onset of senescence in leaves. The employment of a senescence-specific promoter has resulted in the enhanced expression of the *ipt*-gene in the later developmental stages of the leaves of some plants (e.g. tobacco and rice) that was associated with a significant delay of leaf senescence. Senescence delayed in this way reduces the activity of the senescence-specific promoter in an autoregulatory feedback loop, thereby preventing overproduction of cytokinins. In an attempt to delay the onset of senescence by stimulating cytokinin-biosynthesis and to accordingly achieve a higher harvest yield, a hitherto unemployed gene construct was transferred into a summer variety of Argentine wheat by particle bombardment. This gene construct consists of the protein-encoding region of the isopentenyl transferase gene from *Agrobacterium tumefaciens* and the senescence-specific *HvS40*-promoter from *Hordeum vulgare*. A parallel experiment the model spring wheat variety (*Triticum aestivum* L. "Bobwhite SH 98 26") was also transformed with the *ipt*-gene under the control of the senescence-specific *SAG12*-promoter from *Arabidopsis thaliana* and analyzed up to the T<sub>2</sub>-generation.

### 6.1 SCREENING OF 22 ARGENTINE SUMMER WHEAT VARIETIES

An effective tissue culture is indispensable as a basis for the production of transgenic plants. Unfortunately, transformation efficiency is not very high in wheat genetic manipulation is thus very difficult. An initial aim was therefore to identify optimal conditions for *in vitro* culture. In a first screening of the immature embryos of 22 Argentine summer wheat varieties from three seed breeders, suitable genotypes were selected with regard to their ability to form embryogenic scutellar callus and to the regeneration of whole plants. The appropriate developmental stage of the immature embryos and the concentration of 2,4-D to be used as a hormone are crucial for the



success of callus formation, the first step of tissue culture. The combination of the developmental stages H and W, which differ in the lengths of the embryo and the scutellum, with two different 2,4-D concentrations (1 and 2 mg per liter of L3-5 medium) resulted in four different culture conditions to which all of the wheat varieties investigated have been exposed.

Substantial differences were observed in 22 varieties with regard to the reciprocal effect of the two applied variables (developmental stage and 2,4-D concentration) on six cell culture parameters. A total of 10091 immature embryos were tested with regard to scutellar callus induction, callus proliferation on the scutellum surface, precocious immature embryo germination, regeneration, shoot formation and cultural efficiency. The best results for five of the six parameters tested were provided by the combination of developmental stage H and the auxin concentration of 1 mg 2,4-D/L medium, whereby the Zadoks scale is a better method for defining the stage of development than the number of days after anthesis. The induction of scutellar callus formation and the regenerative capacity of the immature embryos to grow into plants depended on each of the genotype, stage of development and concentration of 2,4-D in the medium. In contrast, shoot formation depended essentially only on the genotype. On the basis of its high rates of scutellar callus formation and high regeneration ability, "Klein Brujo" was determined to be the most suitable variety of all the 22 analyzed Argentine summer wheat varieties as and was used for further investigations. Immature embryos of the genotype "Klein Brujo" were cultivated on the induction media L3-5 and MS.

The MS medium was evaluated as to the effect of 3% and 9% maltose as well as of 1 or 2 mg 2,4-D/L on the six parameters specified above. The MS medium with 3% maltose and 1 mg 2,4 D/L resulted in an improvement of the scutellar callus formation, callus proliferation on the scutellum surface, subsequent regeneration and cultural efficiency of the wheat cultivar "Klein Brujo".

## **6.2 TRANSFORMATION BY PARTICLE BOMBARDMENT AND *IN VITRO* TISSUE CULTURE OF IMMATURE EMBRYOS OF WHEAT**

A transformation system based on particle bombardment technology was established for "Klein Brujo". The *bar*-gene was used as a selectable marker gene and the *gfp*-gene as a marker reporter gene. Both genes are located on the plasmid pGFPBAR and are under the control of the *ubiquitin*- and the *CaMV 35S*-promoter, respectively. The transformation was performed by the simultaneous bombardment of cells with two plasmids (co-transformation), one carrying the genes of interest (pS40-GUS, pSG506, pSG516 and pS40-IPT) and the other bearing the marker-reporter gene (pGFPBAR). The plasmid pS40-IPT was newly constructed by combining the

*HvS40*-promoter from pS40-GUS (shortened by about 2 kb) and the *ipt*-gene with the *nos* terminator from pSG516. All other plasmids were placed at our disposal.

To optimize the particle bombardment of embryogenic scutellar callus with the genes of interest, three aspects of the cell culture (scutellar callus induction medium, osmotic treatment and callus induction beginning (pre-culture)) and three physical variants (distance between target tissue and stopping screen, bombardment pressure and diameter of the gold particle) were tested. Three variables were found to be crucial for a high transformation efficiency of "Klein Brujo" (10% in the best experiment): the callus induction medium, the pre-culture and the osmotic treatment.

The newly established tissue culture strategy resulted in a shortening of the *in vitro* culture duration between embryo preparation and the onset of *ex vitro* culture. The 9 to 12 weeks of this duration is one of the shortest that can be found in the literature. This method of tissue culture - together with the use of phosphinothricin (PPT) as a selection agent during *ex vitro* culture - minimized the number of so-called "false positives" among the surviving plants and resulted in a high yield of co-transformants (97.4%). However, it was not possible to cultivate transgenic T<sub>1</sub>-plants by independent segregation that were free of the marker reporter gene or the selectable marker gene as has been described in other reports. It appeared that all of the introduced genes were present in a coupling group and therefore segregated together. This is probably due to the insertion of the transgenes into a single locus or into closely associated loci. In subsequent generations (T<sub>0</sub> to T<sub>3</sub>) a progressive but differential silencing of the *bar*- and the *gfp*-genes (located on the same plasmid) was observed, which an indication of post-transcriptional gene silencing is.

Since it is advantageous to use promoters from the same or closely related plant species for genetic purposes, the barley *HvS40*-promoter was employed. Its expression during the course of natural senescence in barley leaves can be induced by both continuous darkness and pathogen attack. In a preliminary experiment the functionality of both the senescence-associated promoters (*HvS40* and *SAG12*) in the heterologous system of wheat was examined using the *uidA* reporter gene. The histochemical assays of *HvS40*-GUS were carried out in senescence-induced young leaves, in naturally senescing leaves, in culm and roots and in different flower parts as well as in grains of transgenic T<sub>0</sub>-plants. The mesophyll specificity of the *HvS40*-promoter in barley was not observed in wheat. The promoter was also active in epidermis and guard cells, which indicated a loss of mesophyll specificity of the *HvS40*-promoter in the heterologous system. Furthermore the induction of the *HvS40*-promoter was only by pathogen attack, which was in most cases a fungal infection, but not by the leaf senescence. In addition, an ectopic expression of the *uidA*-gene in young flower organs of wheat was observed.

In all T<sub>0</sub>-plants (six selected lines of the cultivar "Klein Brujo" with the pS40-IPT plasmid and two lines of the cultivar "Bobwhite SH 98 26" with the pSG516-plasmid) the presence of the complete protein-encoding region of the introduced *ipt*-gene could be confirmed by Southern blot analysis. The number of the integrated gene copies was between two and seven. The construct of the shortened *HvS40*-promoter and the *ipt*-gene (pS40-IPT) was expressed in wheat leaves during the course of both artificially induced and natural senescence. This was detected by means of RT-PCR of *ipt*-mRNA in T<sub>0</sub>- and T<sub>2</sub>-plants. The ability of the shortened *HvS40*-promoter to direct the expression of the *ipt*-gene during the leaf senescence in transgenic wheat suggests that *cis*-elements acting as repressors of expression in a senescing leaf were located upstream of the shortened promoter. It was previously reported that cereal promoters do not necessarily have the same effect in all cereals. This can be due to differential spatial or temporal control of expression, as well as to dependence of the promoter activity on the length of the promoter. *SAG12*-GUS was expressed in neither adult nor senescing leaves, nor in other organs of wheat.

### 6.3      PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF THE TRANSFER OF THE *IPT*-GENE AND YIELD PERFORMANCE

The chlorophyll content of young, healthy detached flag leaves of positive *ipt*-PCR transgenic T<sub>1</sub>-plants was measured during induced senescence in to obtain an indication of the function of the *ipt*-gene under the control of both of the SAG promoters. Five of the six examined transgenes showed a significantly reduced chlorophyll loss, which suggests activity of the *ipt*-gene and an increased cytokinin concentration. The Chl *a/b* ratio was higher than in the controls, since Chl *a* was degraded more slowly than Chl *b* during the senescence delay. Similar results were observed in the two lines of T<sub>1</sub>-plants with the construct pSG516.

The content of the dominant cytokinins - adenine, zeatin riboside and dihydrozeatin riboside, and the *O*-glucosides derived from zeatin riboside and dihydrozeatin riboside - were analyzed in senescing flag leaves of the T<sub>1</sub>- and T<sub>2</sub>-plants of the three pS40-IPT lines showing the lowest chlorophyll degradation. A near doubling of the total cytokinin content as compared to the azygous plants could be detected in the extracts of senescing flag leaves. In most cases the zeatin riboside content constituted the highest proportion of both free and *O*-glucosides cytokinins during the grain filling stage. This was already known for other senescing *ipt*-plants. According to the results of the RT-PCR analysis, the transgenes showed a higher expression of the *ipt*-gene during the grain filling stage than after anthesis, which is considered to mark the onset of the gradual senescence of flag leaf. However, the cytokinin content in intact plants was not sufficient

to result in a significant delay of senescence in spite of the heterologous expression stemming from the barley promoter expression. This effect of *ipt*-expression may have been due to the weak promoter or to partial silencing of the transferred gene. The increased expression of the *ipt*-gene was confirmed by RT-PCR analysis of the induced senescence of young, healthy detached flag leaves as well as of naturally senescing wheat leaves. In contrast to the delay in chlorophyll degradation in induced senescence, no such effects were observed during natural senescence. This difference in behavior between natural and induced senescence in transgenic wheat leaves confirmed that the two senescence processes are different.

The cytokinin content of the T<sub>1</sub>- and T<sub>2</sub>-plants of a single *SAG12-ipt* line was determined. The transgenes showed a higher concentration of the three measured cytokinins during the grain filling phase than did the wild-type control plants, but no significant difference was observed in comparison to the azygous plants. The weak signal of *ipt*-mRNA determined by RT-PCR suggests that the *SAG12* promoter is weakly expressed in senescing wheat leaves. None of the transgenic plants exhibited a distinct delay of senescence.

The T<sub>2</sub>-generation was monitored carefully throughout its life cycle during the course of the present work. The homozygous T<sub>2</sub>-plants of the four "Klein Brujo" lines and one line of the variety "Bobwhite SH 98 26" that showed expression of the *ipt*-gene by RT-PCR analysis were compared with the corresponding azygous plants. No significant difference was found between the homozygous plants of the *SAG12-ipt* line and the azygous plants of the "Bobwhite SH 98 26" variety in either the morphometric data or the yield parameters. No clearly visible delay of senescence was detected in any of the four transgenic lines of the variety "Klein Brujo" during either the sequential senescence of the leaf organs or during the canopy-wide monocarpic senescence triggered by reproductive development. However, two lines showed higher values in the parameters grain number per ear, total grain weight, grain weight per ear and average grain weight in comparison to the azygous plants. The increase in grain number was not compensated for by a lower grain weight. It is now generally accepted that ear photosynthesis makes an important contribution to the final grain yield. The more numerous leaves as well as the greater size of the flag leaves and spikes in the two homozygous lines could explain the better supply to the grains of these plants. Thus, the expression of the *HvS40*-promoter as detected by the *uidA*-reporter-gene was observed at an early developmental stage of the grains in the glumes, lemmas, palea and seed coat. In addition to confirming the expression of the *ipt*-gene, the increase in the cytokinin content of the wheat spikes and the endosperm cells of the wheat grain can provide a further explanation for the improved yield performance of the two transgenic lines. It has been

## SUMMARY

---

shown that cytokinin increases the grain number and stimulates the development of the grain when it is applied to the ear or to the whole aerial part of wheat plants.

Based on the results of this work it should be tried to achieve a delay of senescence of the seedling leaves by transfer of *ipt*-gene under control of homologous senescence-associated promoter, whose activity doesn't work in the flag leaf. This finally could have favorable impact on the spike growth, so that ears could produce more grains and thereby raise productivity.