

**Gentransfer bei genetisch komplexen,
vegetativ vermehrten Pflanzen
am Beispiel von Kulturformen der Gattung *Rosa* L.**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Thomas Halbach

geboren am 26.03.1973 in Lüdenscheid

2006

Referent: Prof. H.-J. Jacobsen

Korreferent: Prof. Th. Debener

Tag der Promotion: 21.12.2005

Für Anke

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	5
Kurzfassung.....	7
1 Einleitung.....	10
1.1 die Rose.....	10
1.1.1 Geschichte und Verbreitung.....	10
1.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung.....	12
1.1.3 Systematik.....	12
1.1.4 Gartenbauliche Klassifizierung.....	13
1.1.5 Blüten und Früchte.....	13
1.1.6 Genetik und Züchtung.....	14
1.1.7 Pathogene Pilze und Resistenz.....	17
1.1.7.1 Echter Mehltau.....	18
1.1.7.2 Sternrußtau.....	18
1.2 Gentransfer bei genetisch komplexen, vegetativ vermehrten Pflanzen.....	20
1.2.1 Agrobakterien-vermittelte Transformation.....	22
1.2.1.1 Ultraschall.....	22
1.2.1.2 “backbone“-Sequenzen.....	23
1.2.1.3 Persistierende Agrobakterien.....	24
1.2.2 Selektion.....	25
1.2.3 Genetische Chimären.....	26
2 Material.....	28
2.1 Geräte.....	28
2.2 Kulturgefäße.....	28
2.3 Verbrauchsmaterial.....	29
2.4 Reagenzien, Chemikalien und Enzyme.....	29
2.5 Puffer und Lösungen.....	31
2.5.1 für DNA-Isolation.....	31
2.5.2 für Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.5.3 für Southern-Blot-Analyse.....	32
2.6 Pflanzenmaterial.....	33
2.7 Bakterienstämme.....	33
2.8 Medien.....	34
2.8.1 Bakterienkultur.....	34
2.8.2 Pflanzliche Gewebekultur.....	34
2.9 Nukleinsäuren.....	37
2.9.1 Transformationsvektoren.....	37
2.9.2 Oligonukleotide.....	38
3 Methoden.....	39
3.1 <i>in-vitro</i> Sprosskulturen.....	39
3.1.1 Etablierung.....	39

3.1.2 Mikropropagation.....	39
3.2 Spross-Organogenese.....	40
3.3 Somatische Embryogenese.....	40
3.3.1 Induktion von embryogenem Kallus.....	40
3.3.2 Proliferation von embryogenem Kallus und Produktion somatischer Embryonen.....	40
3.4 Transformation.....	41
3.4.1 Anzucht der Agrobakterien.....	41
3.4.2 Transformation von Blattachselknospen.....	41
3.4.3 Transformation somatischer Embryonen.....	41
3.4.4 Co-Kultur.....	41
3.5 Regeneration und Selektion.....	42
3.5.1 Sprosse aus Blattachselknospen.....	42
3.5.2 Sprosse aus somatischen Embryonen.....	42
3.5.3 Bewurzelung.....	43
3.5.4 Akklimatisierung.....	43
3.5.5 Kulturführung im Gewächshaus.....	43
3.5.6 Histochemischer GUS-Assay.....	43
3.5.7 Herbizidresistenz.....	44
3.5.7.1 “leaf paint“.....	44
3.5.7.2 Spritzung mit Herbizid.....	44
3.6 Nachkommenschaft der T ₀	44
3.6.1 Selbstung und Ernte.....	44
3.6.2 Aussaat und Keimung.....	44
3.7 Molekulare Analysen.....	45
3.7.1 DNA-Isolation.....	45
3.7.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	46
3.7.3 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	46
3.7.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	47
3.7.5 Southern-Blot-Analyse.....	48
3.7.5.1 Restriktionsverdau genomischer DNA und Fällung.....	48
3.7.5.2 Southern Gel.....	48
3.7.5.3 Southern Transfer.....	49
3.7.5.4 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden.....	50
3.7.5.5 Hybridisierung.....	51
3.7.5.6 Antikörperbindung, Detektion und “stripping“.....	51
3.7.6 Transkriptionsnachweis mit RT-PCR.....	51
3.7.6.1 RNA-Isolation.....	52
3.7.6.2 Reverse Transkription und RT-PCR.....	52
4 Ergebnisse.....	53
4.1 <i>in-vitro</i> Sprosskulturen.....	53
4.2 Spross-Organogenese an Blättern.....	54
4.3 Transformation von Meristemen.....	56
4.4 Somatische Embryogenese.....	60

4.4.1 Induktion von embryogenem Kallus.....	60
4.4.2 Proliferation von embryogenem Kallus und Produktion somatischer Embryonen.....	65
4.5 Transformation somatischer Embryonen.....	67
4.5.1 Regeneration und Selektion von Kallus.....	67
4.5.2 Regeneration und Selektion von Sprossen.....	68
4.5.3 Etablierung PPT-resistenter Sprosslinien.....	68
4.5.4 Bewurzelung PPT-resistenter Sprosse.....	70
4.5.5 Akklimatisierung.....	71
4.5.6 Test auf Herbizidtoleranz an Pflanzen im Gewächshaus.....	71
4.5.6.1 “leaf paint“-Assay mit Basta®	71
4.5.6.2 Spritzung ganzer Pflanzen mit Basta®	73
4.6 Erzeugung einer Nachkommenschaft aus der T ₀ von Genotyp Hz.....	75
4.6.1 Selbstung.....	75
4.6.2 Keimung und Wachstum der T ₁ -Pflanzen.....	75
4.7 Molekulare Analysen.....	78
4.7.1 PCR.....	78
4.7.1.1 Gene der T-DNA.....	78
4.7.1.2 “backbone“-Sequenzen	78
4.7.1.3 Bakteriell Gen <i>picA</i>	80
4.7.2 Southern Blot-Analyse.....	82
4.7.3 Transkriptionsnachweis mit RT-PCR	89
5 Diskussion.....	90
5.1 <i>in-vitro</i> Sprosskulturen.....	90
5.2 Spross-Organogenese an Blättern.....	91
5.3 Transformation von Meristemen.....	93
5.3.1 Transformationsbedingungen.....	93
5.3.2 Transformationsversuche mit Lateralmeristemen.....	94
5.4 Somatische Embryogenese.....	95
5.4.1 Induktion von embryogenem Kallus.....	95
5.4.2 Proliferation von embryogenem Kallus und Produktion somatischer Embryonen.....	97
5.5 Produktion transgener Pflanzen.....	100
5.5.1 Konstrukt.....	100
5.5.2 Transformationsmethode.....	101
5.5.2.1 Agrobakterium-vermittelte Transformation.....	101
5.5.2.2 Unterdrückung des Bakterienwachstums.....	102
5.5.2.3 Persistierende Agrobakterien.....	103
5.5.3 Ultraschall-Behandlung.....	105
5.5.4 “backbone“-Sequenzen	106
5.5.4.1 ... in der T ₀	106
5.5.4.2 ... in der T ₁	108
5.5.5 Regeneration und Selektion transgener Pflanzen.....	109
5.5.5.1 Kallus – Regeneration.....	109
5.5.5.2 Spross – Regeneration.....	110

5.5.6 Nachkommenschaft der T ₀	111
5.5.6.1 Selbstung der transgenen Pflanzen.....	112
5.5.6.2 Keimung des Saatgutes aus Selbstung.....	113
5.5.6.3 Wachstum der T ₁ -Pflanzen.....	113
5.5.6.4 PCR der T ₁	114
5.5.6.5 Southern Blot-Analyse der T ₁	115
5.6 Entstehung von genetischen Chimären.....	116
5.6.1 Regeneration.....	116
5.6.2 Bewurzelung.....	117
5.6.3 PPT-Resistenz-Tests.....	118
5.6.3.1 “leaf paint“.....	118
5.6.3.2 Spritzung mit Herbizid.....	119
5.6.4 PCR.....	121
5.6.5 Southern Blot-Analyse.....	122
5.6.6 RT-PCR für <i>vstI</i>	123
6 Zusammenfassung und Ausblick.....	125
7 Literatur	129
8 Anhang.....	144
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	144
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	146
8.3 Tabellenverzeichnis.....	149
8.4 Zeichnungsverzeichnis.....	149
8.5 Danksagung.....	150
8.6 Lebenslauf.....	151

Abstract

In transformation experiments with vegetatively propagated plants like ornamentals or woody species, only the primary transformants (T_0) have to be analysed and are probably released. Production of sexual progeny, in contrast to seed derived plants, is virtually impossible as it would dilute the specific character of the genotype through recombination events. Therefore the constitution of the primary transformants, resulting from transformation and regeneration, is in focus. The occurrence or absence of persisting *Agrobacteria*, backbone sequences of the plasmid and genetically chimeric tissue can influence the reliability of molecular analyses and functional assays as well as aspects of biosafety and public acceptance in case of release.

The present thesis aims to analyse these parameters using rose (*Rosa*), which is a woody ornamental. Roses are one of the oldest domesticated flowers and it's about 20,000 commercial varieties resemble a high biodiversity and a great market value. Most of the cultivars are tetraploid. They are generally selected from F_1 -progeny leading to heterozygosity of a high degree.

Cultivation of roses demands repeated applications of chemical plant protectants, especially fungicides, leading to well known problems for humans and the environment. Among commercial cultivars, natural resistance genes are almost unknown so far. Including wildtype species in breeding programmes would require several backcrosses and will therefore be quite laborious and time consuming. Due to differences in ploidy level they are difficult to achieve anyhow. For this reason the *vst1*-gene from grape (*Vitis vinifera* L.) was chosen instead of a marker gene for transformation. It codes for the enzyme stilbene synthase and has already proven to increase resistance level to some fungi in other plant species.

Initially aseptic shoot cultures were established *in-vitro* and three different principles of regeneration were tested for their use in transformation experiments. As *de-novo* shoot organogenesis had a too low efficiency for application of transformation and co-cultivation of lateral meristems with *Agrobacteria* did not result in any transgenic shoot, somatic embryogenesis was chosen to produce transgenic plants.

Embryogenic callus was induced from *in-vitro*-leaves and the somatic embryos were taken as target tissue for transformation. Sonication of explants in the presence of *Agrobacteria* (SAAT) was one of the key features to yield transgenics. Selection for transformed tissue was done by Phosphinothricin, the active agent of herbicides (e. g. Basta[®]/Liberty[®]). Shoots were regenerated under selection pressure, rooted and acclimatised in the greenhouse. As surprising results during the selection phase were attained, we doubted whether the shoots were homogenically transformed. Results of leaf-paint and treatment of whole plants with Basta[®] confirmed these findings.

To draw conclusions on the events in regeneration and transformation, the T_1 -generation was produced by self-pollination and parents and progeny were analysed for the presence of persisting *Agrobacteria*, transduced backbone sequences and the occurrence of genetically chimeric tissue using molecular methods.

In some samples of T₀-plants, a fragment of the *picA*-gene from *Agrobacterium* genome was detected, indicating that *Agrobacteria* were still present in regenerated plants although antibiotics included in culture media throughout the plant tissue culture should minimise that. As a release of those plants would bear the risk of releasing genetically modified bacteria, *picA* positive samples were excluded from further analysis also as the presence of *Agrobacteria* would impair further PCR analyses. A carry-over of them to the next generation was not observed as expected.

The search for backbone sequences by PCR showed up to give positive results in about 40 % of the tested T₀-plants. They contained DNA of bacterial origin, raising the probability of undesired gene transfer to micro-organisms by recombination and the risk of methylation due to differences in GC-content and along with this gene silencing. Concerning this, the progeny showed the same results as their parent respectively, with the exception of four plants.

PCR revealed as well that the number of transgenics among the progeny (T₁) was much lower than expected, another hint for chimeric parental plants. Southern blot analysis finally proved the majority of plants regenerated after transformation being genetical chimeras. Plants of the same origin gave a differing banding pattern in Southern blot representing different integration patterns of transgenic sites. During regeneration there must have been the generation of chimeric tissue on the level of callus as well as on the level of shoots. In some plants the chimeric character maintained until flowering at least for some progeny showed an integration pattern in Southern analysis that was not detected in their parent respectively. The prove of genetically chimeric tissue in transgenic vegetatively propagated plants cancels the reliability for further research and the practical use of such plants because the loss of the transgenic feature is possible just due to propagation at any time and results from a certain sample could never be generalised.

The results show for rose as an example for many vegetatively propagated ornamentals and woody species, that persisting *Agrobacteria* and the occurrence of genetically chimeric plants during regeneration are limiting factors for analysis and utilisation of transgenic vegetatively propagated plants. One can doubt, whether it will be possible at all in the T₀ to exclude both observations for sure due to improved protocols and more precise analytical methods for it is much more difficult to prove that something is not there but its existence.

Keywords: *Rosa* / transformation / chimeras

Kurzfassung

Nach der Transformation von ausschließlich vegetativ vermehrten Pflanzen wie Gehölzen und Zierpflanzen, stellen die regenerierten Pflanzen (T_0) bereits das zu untersuchende und unter Umständen zu vermarktende Endprodukt dar. Die Herstellung einer Folgegeneration ist, anders als bei samenvermehrten Pflanzen, nicht sinnvoll, da dies mit dem Verlust der Merkmalskombination verbunden wäre, die den Charakter und den Wert des Genotyps ausmachen. Daher ist in solchen Fällen die Konstitution der Regenerate, die sich unmittelbar aus dem Geschehen während der Transformation und Regeneration ergibt, von entscheidender Bedeutung. Das Persistieren von Agrobakterien, die Übertragung von Plasmidsequenzen außerhalb der T-DNA und das Auftreten genetischer Chimären bestimmen die Verlässlichkeit von molekularen Analysen und funktionale Tests, sowie über Aspekte der biologischen Sicherheit und öffentlichen Akzeptanz im Falle einer Freisetzung.

Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurde die Rose (*Rosa*) als Vertreter von gleichermaßen Zier- und Gehölzpflanzen gewählt. Sie ist eine der ältesten kultivierten Zierpflanzen und mit etwa 20.000 kommerziellen Genotypen nach wie vor von höchster ökonomischer Bedeutung. Ihre Kultursorten sind weitgehend tetraploid und werden in der Züchtung nach der ersten Kreuzung direkt aus den Pflanzen der F_1 selektiert, so dass ein hohes Maß an Heterozygotie erhalten bleibt.

Die Kultur von Rosen erfordert vor allem durch den Befall mit phytopathogenen Pilzen einen intensiven Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, der mit den bekannten Risiken für Mensch und Umwelt einhergeht. Da im Genpool der Kulturrosen bisher keine natürlichen Resistenzen bekannt sind und Kreuzungen mit Wildarten aufwändig und aufgrund von Unterschieden im Ploidiegrad schwierig sind, wurde im vorliegenden transgenen Ansatz statt eines Reportergens ein Gen mit antifungal wirksamem Produkt eingesetzt. Das *vst1*-Gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) codiert für das Enzym Stilbensynthase und hat bereits bei heterologer Expression in anderen Pflanzen zu einer gesteigerten Resistenz gegen phytopathogene Pilze geführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Sprosse als Meristemkulturen *in-vitro* etabliert und drei grundsätzlich verschiedene Prinzipien der Regeneration auf ihre Eignung für die Transformation hin geprüft. Da die Spross-Organogenese an Blattsegmenten eine zu geringe Effizienz für die Anwendung mit Transformation aufwies und aus Meristemen in Blattachselknospen nach Co-Kultur mit Agrobakterien keine transgenen Sprossen generiert werden konnten, erfolgte die Herstellung transgener Pflanzen aus somatischen Embryonen.

Dazu wurde zunächst embryogener Kallus an *in-vitro*-Blättern induziert. Die sich darauf entwickelnden SE wurden mittels Agrobakterien transformiert und transgene Sprosse regeneriert. Der Einsatz von Ultraschall stellte sich als ein entscheidender Faktor für den Erfolg der Transformation heraus. Die Selektion transgenen Gewebes erfolgte mit Phosphinothricin, einem Wirkstoff von Totalherbiziden (z. B. Basta®/Liberty®). Die unter Selektionsdruck regenerierten Sprosse wurden bewurzelt, akklimatisiert und im Gewächshaus zur Blüte gebracht. Schon dabei erschien die Homogenität des transgenen Gewebes aufgrund

unterschiedlichen Resistenzverhaltens fraglich. Die ersten Untersuchungen der T₀ durch Behandlung mit Basta[®] unterstützten diese Beobachtungen: Die Pflanzen zeigten zu unterschiedlichen Teilen sowohl Resistenz als auch Sensitivität.

Um Rückschlüsse auf die genetische Konstitution der T₀ und den Ablauf von Transformation und Regeneration zu ziehen, wurde durch Selbstung eine F₁-Generation erzeugt. Beide wurden mit molekularen Methoden auf das Vorkommen persistierender Agrobakterien, übertragener "backbone"-Sequenzen und das Auftreten von Chimären untersucht.

In einigen Proben von T₀-Pflanzen wurde in der PCR ein Fragment des *picA*-Gens aus dem Agrobakterien-Genom detektiert. Damit sind trotz des Einsatzes von Antibiotika während der gesamten *in-vitro*-Kultur Agrobakterien in den regenerierten Pflanzen nachgewiesen worden. Bei einer Freisetzung solcher Pflanzen würden also gleichzeitig auch die gentechnisch veränderten Agrobakterien freigesetzt werden. Die entsprechenden Proben wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da nicht zu unterscheiden war, ob Ergebnisse mit anderen Primerpaaren auf ein Transgen im Pflanzengenom oder auf Plasmide persistierender Agrobakterien zurückzuführen waren. Eine Übertragung der Bakterien auf die nächste Generation konnte erwartungsgemäß nicht gezeigt werden.

Die Untersuchung auf "backbone"-Sequenzen mit PCR zeigte bei etwa 40 % der darauf untersuchten T₀-Pflanzen, dass ein Teil des Plasmids außerhalb der T-DNA übertragen worden war. Damit beinhaltet ihr Genom DNA bakteriellen Ursprungs. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für einen unerwünschten Gentransfer in Mikroorganismen durch Rekombination und birgt aufgrund des unterschiedlichen GC-Gehaltes ein erhöhtes Risiko für Methylierung und damit das Stilllegen (silencing) des DNA-Bereiches. Die Nachkommenschaft zeigte mit Ausnahme von vier Pflanzen die gleichen Ergebnisse wie ihre Eltern.

Mittels PCR-Analysen zeigte sich in der T₁, dass der Anteil an Transgenen deutlich geringer war, als zu erwarten, was einen weiteren Hinweis auf den möglicherweise chimären Charakter der Elterpflanzen darstellte. Die Southern-Blot-Analyse von Eltern und Nachkommen bestätigte, dass es sich bei einigen nach der Transformation regenerierten und daraufhin untersuchten Pflanzen um genetische Chimären handelte. Pflanzen mit demselben Ursprung wiesen ein unterschiedliches Bandenmuster und damit verschiedene Integrationsmuster transgener Loci auf. Es muss demnach im Verlauf der Regeneration von der Existenz chimären Gewebes sowohl auf Kallus- als auch auf Sprossenebene ausgegangen werden. Dieser chimäre Charakter ist bei einigen Pflanzen bis zur Selbstung im Gewächshaus erhalten geblieben, da bei einigen Nachkommen Integrationsorte in Form von Southern-Banden nachgewiesen worden sind, die bei ihrem jeweiligen Elter nicht detektiert wurden. Der Nachweis genetisch chimären Gewebes in transgenen, vegetativ vermehrten Pflanzen macht verlässliche weiterführende Untersuchungen zur Expression des gewünschten Transgens und seiner Wirkung unmöglich und schließt die praktische Nutzung aus, da der Verlust des Transgens im Laufe der Vermehrung immer möglich ist und Analyseergebnisse nie sicher von der aktuellen Probe auf andere Pflanzenteile oder Klone übertragbar sind.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen bei der Rose beispielhaft für viele Zierpflanzen und Gehölze, dass das Persistieren von Agrobakterien nach der Co-Kultur und die Entstehung genetischer Chimären während der Regeneration limitierende Faktoren für die Nutzung transgener, vegetativ vermehrter Pflanzen sind. Es bleibt fraglich, ob es für die T₀ überhaupt möglich sein wird, beides durch eine Verbesserung der Vorgehensweise und ausreichend feine Analysemethoden sicher auszuschließen, da es methodisch erheblich schwerer ist, zu beweisen, dass etwas nicht da ist, als seine Existenz.

Schlagworte: Rosa / Transformation / Chimären

1 Einleitung

1.1 die Rose

1.1.1 Geschichte und Verbreitung

Die ältesten fossilen Funde von Pflanzen aus der Gattung *Rosa* stammen aus den USA (Colorado und Oregon) aus dem Erdzeitalter des Oligozän und sind etwa 32 mio. Jahre alt (Shepherd `54). Ein weiterer archäologischer Fund aus dem Gebiet des heutigen Irak wird ebenfalls als Teil einer Rose angesehen und stammt aus dem Tertiär vor rund 25 Millionen Jahren (Höger-Orthner `91).

Durch den Menschen wurde die Rose zunächst als Nahrungspflanze, wohl wegen des hohen Vitamingehaltes der Früchte, genutzt, wie Samenfunde in Küchenabfällen aus der Stein- und Bronzezeit belegen (Nickig und Rau `96).

Erste Hinweise auf die Kultivierung von Rosen gibt es aus China sowie den Kulturen Nordafrikas und des westlichen Asien aus der Zeit vor etwa 5.000 Jahren. So waren sie schon 3000 Jahre v. Chr. fester Bestandteil des kaiserlichen Gartens von Peking (Rausch `03).

Von einem Feldzug der Sumerer in das Gebiet jenseits des Taurusgebirges 2600 v. Chr. wird berichtet, dass König Sargon I. unter anderem auch Rosen mit ins Zweistromland zwischen Euphrat und Tigris bringen ließ. Dort herrschten 1000 Jahre später die Babylonier und es entstanden unter der Herrschaft von Nebukadnezar die "hängenden Gärten der Semiramis", die von Rosen umrankt gewesen sein sollen und zu den sieben Weltwundern der Antike zählen (Höger-Orthner `91). Auch die Rosengärten des Orients, vor allem im Persien dieser Zeit sollen sehr beeindruckend gewesen sein.

Der älteste Nachweis von Rosen in Europa ist ein Fresko der minoischen Kultur auf Kreta aus der Ruine des Palastes in Knossos, der ebenfalls aus dem 16. vorchristlichen Jahrhundert stammt. Schon im 5. Jahrhundert v. Chr. waren Rosenpflanzungen in China sehr beliebt und die chinesische Kaiserliche Bibliothek hat eine umfassende Sammlung von Rosenbüchern zu bieten (Souire und Newdick `92). Um 700 v. Chr. besang die griechische Dichterin Sappho auf der Insel Lesbos die Rose als Königin der Blumen (Höger-Orthner `91) und um 500 v. Chr. berichtete der griechische Geschichtsschreiber Herodot von Rosen in den Gärten von König Midas in Thrakien. Rund 200 Jahre später beschrieb der griechische Philosoph Theophrastos (371-287 v. Chr.) die Rose als erster unter naturwissenschaftlichen Gesichtspunkten. Etwa zur gleichen Zeit zierte die Rose eine Münze auf der Ägäisinsel Rhodos, deren Name von "Rose" abgeleitet ist.

Ebenfalls im 3. Jahrhundert v. Chr. wurden Rosen auf Kleidern und Fresken in Ägypten abgebildet und von Cleopatra (69-30 v. Chr.) wird berichtet, dass sie Rosen bei vielen Zeremonien benutzte. Schon zu dieser Zeit gab es eine kommerzielle Rosenproduktion in Ägypten wie auch im Römischen Reich, da für festliche Anlässe große Mengen an Blüten und Blütenblättern gebraucht wurden. Die Römer produzierten Rosen für solche dekorativen Zwecke in großem Stil selbst oder importierten sie aus Ägypten. Plinius der Ältere (23-79)

beschrieb in seinem Werk "Naturalis historia" elf Hauptarten und vier weniger bedeutende, die im Römischen Reich kultiviert und verbreitet wurden. Zu dieser Zeit gab es neben der rein dekorativen Nutzung der Rose auch 30 Arzneien, für deren Herstellung Rosen verwendet wurden. Das unter einer Rose gesagte "sub rosa dictum" galt den Römern als geheim und vertraulich, so dass z.B. diplomatische Verhandlungen unter einer an der Decke befestigten weißen Rose geführt wurden.

Nach dem Niedergang des Römischen Reiches gibt es neben Funden in Äthiopien (1. bis 5. Jh. n. Chr.) kaum Zeugnis von der Kultivierung von Rosen, so dass nur wenige Varietäten überdauerten. Diese haben sich selbständig erhalten oder wurden in Klöstern als Heilpflanze angebaut. Die Benediktiner verbreiteten römische Gartenrosen aus dem Mittelmeerraum in den Klostergärten Europas.

Den Muslimen galt die Rose sogar als heilig, was beispielsweise dazu führte, dass während der Kreuzzüge zurückeroberte Moscheen und umgewandelte christliche Kirchen mit Rosenwasser gereinigt wurden (Souire und Newdick '92). Im Osmanischen Reich erlebte die Rosenkultur eine neue Blüte. Viele Pflanzen wurden zwischen Indien und Spanien hin und her transportiert, so dass für manche Arten die Frage nach dem ursprünglich natürlichen Verbreitungsgebiet nicht mehr eindeutig geklärt werden kann. Nur wenig ist bekannt über die Geschichte der Rose zwischen dem Niedergang des osmanischen Reiches und dem neu erwachten Interesse an Gartenpflanzen in der Renaissance im Europa des 15. Jahrhunderts.

Bereits im 13. Jahrhundert war in der Nähe von Paris eine Parfümindustrie entstanden, für die wahrscheinlich die *Rosa gallica* 'officinalis' angebaut wurde. Erst am Ende des 16. Jahrhunderts entstanden die ersten Beschreibungen europäischer Rosen, die präzise genug waren, um sie heute bekannten Arten zuzuordnen. Amerikanische und Asiatische Rosen folgten im Abstand von jeweils etwa 50 Jahren. Zu Beginn des 19. Jh. machte sich die Französische Kaiserin Josephine (1763-1814) um die Rosenzüchtung besonders verdient und ließ eine Sammlung aller damals in Europa bekannter Arten und Genotypen am Chateau Malmaison anlegen. Zu der Zeit war die Rose so beliebt, dass der Wert dieser Sammlung in ganz Europa bekannt und derart hoch geschätzt war, dass sogar die Britischen Truppen bei der Besetzung Paris' 1815 den Befehl hatten, die Gartenanlage zu schützen. Von Frankreich ausgehend breitete sich die Popularität der Rose in ganz Europa, Nordamerika und Australien aus. Seitdem ist die Rosenzüchtung immer internationaler und lukrativer geworden, Anbau und Kultur der Rosen findet weltweit statt. Seit 1930 sind Pflanzensorten in den USA patentierbar (United States Plant Patent Act). (nach Shepherd '54; Phillips und Rix '88; Souire und Newdick '92)

Das natürliche Verbreitungsgebiet der Gattung *Rosa* erstreckt sich über die gemäßigten und subtropischen Klimate der nördlichen Hemisphäre (Wylie '54). Einige Genotypen sind südlich des Äquators verwildert und heimisch geworden.

1.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung

Die Rose ist nach wie vor mit etwa 20.000 kommerziellen Sorten (Ma *et al.* '97; Rajapakse *et al.* '01) eine der wichtigsten Zierpflanzen und daher weltweit ein bedeutender Wirtschaftsfaktor. Sie wird als Schnittblume verkauft, in Gärten und öffentlichen Anlagen als Bodendecker, Kletter- oder Strauchrose gepflanzt und als Topfpflanze kultiviert. Aus ihren Blüten wird Rosenöl für die Kosmetikindustrie gewonnen, für das pro Gramm etwa 5 kg Blüten benötigt werden. Der Marktwert des Rosenöls, das früher mit der sechsfachen Menge in Gold aufgewogen wurde, betrug 1998 rund zwölf Millionen Dollar. Alleine in den USA wird nur mit dem Verkauf von Gartenrosen jährlich 300 Millionen Dollar verdient (Byrne *et al.* '96; Jan *et al.* '99). An den vier europäischen Blumenbörsen in der Schweiz, Italien, Deutschland und den Niederlanden betrug der Marktwert der gehandelten Rosen 2002 zusammen rund 780 Millionen Euro. Alleine in Deutschland wurden im selben Jahr 4,4 Millionen Topfrosen mit einem Marktwert von 6,38 Millionen Euro verkauft und nahezu 140 Millionen Schnittrosen im Wert von fast 30 Millionen Euro, was einem Viertel des gesamten Schnittblumenmarktes entspricht (International Statistics of Flowers and Plants '02).

1.1.3 Systematik

Die Rosen gehören zu den zweikeimblättrigen (dicotyledonen) bedecktsamigen (angiospermen) Samenpflanzen (*Spermatophyta*) und sind für die darunter angeordneten Stufen der Systematik namensgebend. Die Familie der *Rosaceae* ist in die vier Unterfamilien *Spiraeoideae*, *Maloideae*, *Prunoideae* und *Rosoideae* unterteilt. Zur letzten Unterfamilie gehört neben zahlreichen anderen die Gattung *Rosa*. Über die Anzahl der Arten, aus der sie besteht, gibt es aus zahlreichen Gründen keine abschließende Übereinkunft: Der Artbegriff wird unterschiedlich definiert, es existieren oft mehrere Synonyme für ein und dieselbe Species und viele taxonomische Merkmale werden zum einen unterschiedlich interpretiert und treten zum anderen nur in bestimmten Entwicklungsstadien auf (Millan *et al.* '96). Die große genetische Komplexität führt zu einer enormen phänotypischen Variabilität und Plastizität (Wissemann '03) und durch die enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Genomen (Wissemann '03) sind Artkreuzungen möglich (Matsumoto '98), deren Nachkommen z. T. als neue angesehen werden (Shepherd '54; Millan *et al.* '96). Auch in Publikationen jüngerer Datums wird die Zahl der Rosenarten nur ungefähr mit "mehr als ..." in Abstufungen von 100 bis 200 angegeben (Roberts *et al.* '90; Matthews *et al.* '94; Reynders-Aloisi und Bollereau '96; Matsumoto *et al.* '97, '98; Ma *et al.* '97, 2000; Debener '99; Martin *et al.* '01; Rajapakse *et al.* '01).

Das gebräuchlichste System ist die Klassifizierung nach Alfred Rehder von 1940 (Wissemann '03), das auf einem Schlüssel morphologischer Merkmale beruht. Andere Autoren haben im Laufe der Zeit weitere, bisher nicht berücksichtigte Charakteristika herangezogen (nach Grossi *et al.* '99). Bis heute sind weitere Methoden der Klassifizierung hinzugekommen, die die Rosentaxonomie ergänzt und verfeinert haben: Die Chemotaxonomie, basierend auf den Komponenten des Phenol-Stoffwechsels, und die molekulare Taxonomie, die sich der Polymorphismen von Isozymen und DNA bedient (nach Grossi *et al.* '99; Jan *et al.* '99).

Das von Wissemann 2003 ergänzte und korrigierte System von Rehder unterteilt die Gattung *Rosa* in vier Untergattungen: Zwei monotypische, *Hulthemia* mit *R. persica* und *Platyrhodon* mit *R. roxburghii*, *Hesperhodos* mit den beiden *R. stellata* und *R. minutifolia* sowie *Rosa* (früher *Eurosa*) mit allen übrigen Arten. Diese werden noch einmal oberhalb der Art-Ebene in 10 Sektionen, z. T. mit Subsektionen, eingeteilt.

1.1.4 Gartenbauliche Klassifizierung

Die gartenbauliche Klassifikation der Rosen betrifft im Wesentlichen die aus Züchtungsarbeit hervorgegangenen Genotypen und teilt sie in Klassen ein. Dabei sind immer wieder Anpassungen und Erweiterungen des Systems notwendig, um mit den Entwicklungen in der Züchtung mitzuhalten und neue taxonomische Erkenntnisse zu berücksichtigen. Das ist zuletzt am Ende des 20. Jahrhunderts unter Federführung der "American Rose Society" (ARS) geschehen und von der "World Federation of Rose Societies" (WFRS) offiziell für die internationale Registrierung von Rosen eingeführt worden. Das aktuelle System teilt die Rosen in drei Gruppen: die Wildrosen, die Alten Gartenrosen mit den 21 vor 1867 bekannten Klassen und die Modernen Rosen mit den 13 seitdem neu entstandenen Klassen. Diese werden über Merkmale der Pflanzenarchitektur und Blühbiologie, aber auch Eigenschaften wie Abstammung nach botanischer oder gartenbaulicher Klassifikation oder geografischem oder züchterischem Ursprung eingeteilt. Dabei unterscheiden sich die Gruppen oft nur in einigen Kriterien. Davon unabhängig gibt es zusätzlich ein Schema, nachdem sich die Rosensorten in 18 Gruppen entsprechend ihrer Blütenfarbe sortieren lassen (nach Cairns '03).

1.1.5 Blüten und Früchte

Die Rose hat eine 5-zählige bisexuelle Blüte mit jeweils fünf Kelch- und Kronblättern. Eine Ausnahme dieser Regel bildet *R. serica* mit meist nur je vier Kelch- und Kronblättern (Rausch '03). In gefüllten Blüten ist die Anzahl der Kronblattkreise vermehrt. Die genaue Zahl der Kronblätter ist jedoch oft kein Vielfaches von fünf und wird durch Umweltfaktoren und/oder mehrere Gene mitbestimmt. Wahrscheinlich entstehen die Kronblätter durch eine veränderte Entwicklung von Staubblättern, da Übergangsformen zwischen Antheren und Petalen vorkommen (Debener '99). Die Anzahl der Staubblätter ist sekundär vermehrt (Polyandrie). Die Fruchtblätter sind in die Blüte eingesenkt, bleiben aber frei.

Die Frucht der Rose wird Hagebutte genannt. Dabei handelt es sich um eine Scheinfrucht, da sie aus der fleischig gewordenen Blütenachse durch einen krugförmig eingesenkten Blütenboden entsteht. Sie kann auch als Sammelnussfrucht bezeichnet werden, da sie zwischen einem und 30 Samen einschließt. Im eigentlichen Sinn handelt es sich dabei allerdings um Früchte mit einem einzelnen Samen (=Achänen) (Ueda '03). Die Embryonen sind von einer dünnen Samenschale (Testa) und einem dreischichtigen verholzenden Perikarp umgeben (Dreves-Alvarez '03; Gudin '03). Das Fruchtfleisch hat einen ausgesprochen hohen Gehalt an Ascorbinsäure (Vitamin C). Er schwankt je nach Art zwischen 6 mg (*R. canina*) und 20 mg (*R. pendulina*) pro Gramm frischem Mark. Zum Vergleich: Apfelsinen enthalten 0,5 mg pro Gramm Frucht (Nickig und Rau '96).

1.1.6 Genetik und Züchtung

Das Genom der Rosen basiert auf der Grundzahl von sieben Chromosomen ($x = 7$) (Shepherd '54; Yokoya *et al.* 2000). Innerhalb der Gattung *Rosa* kommen alle Ploidiestufen zwischen diploid ($2n = 2x = 14$) und oktoploid ($2n = 8x = 56$) vor (Ueda *et al.* '01). Dabei handelt es sich bei den kommerziellen Sorten in der Regel um Tetraploide (Debener und Mattiesch '96), während viele Wildarten diploid sind. Triploide sind Nachkommen aus Kreuzungen zwischen diploiden und tetraploiden und oft steril. Die penta-, hexa- und heptaploiden gehören meist in die Sektion der *Caninae*, die sich durch eine asymmetrische Verteilung der Chromosomensätze in der Meiose auszeichnen. Insgesamt gibt es eine Korrelation zwischen Chromosomenzahl und klimatischen Bedingungen: Arten mit natürlicherweise weit nördlichem Verbreitungsgebiet haben mehr Chromosomensätze als subtropische Arten (Shepherd '54).

Die Rose hat ein relativ kleines Genom. Die Kerne diploider Rosen enthalten etwa 1 pg DNA (zwischen 0,78 und 1,29 pg, Yokoya 2000), das entspricht je nach Autor ungefähr dem 2 ½ -fachen (von Malek *et al.* 2000) bzw. dem vierfachen (Rajapakse '01) der Größe des *Arabidopsis*-Genoms.

Außerdem weisen Rosen ein hohes Maß an Heterozygotie auf (Firoozabady *et al.* '94). Sie beruht bei Wildarten auf einem Inkompatibilitätssystem (Matthews *et al.* '94), das besonders bei diploiden Arten zu einer stark eingeschränkten oder nicht vorhandenen Selbst-Kompatibilität führt. In Polyploiden greift es nicht immer, führt aber oft zu einem stark reduzierten Fruchtansatz (Cole und Melton '86).

In den Zuchtformen beruht die weitgehende Heterozygotie zusätzlich darauf, dass sie in den Anfängen der Züchtung aus Artkreuzungen hervorgegangen sind. Ein hohes Maß an Heterozygotie bleibt in der Züchtung erhalten, da neue Genotypen in der Regel aus der F_1 von Kreuzungen selektiert werden. Diese werden wieder als Kreuzungseltern eingesetzt und sind ihrerseits die weitgehend heterozygoten Nachkommen aus vorangegangenen Kreuzungen (pers. Komm. eines Züchters). Sie werden nur selten geselbstet, da die Anzahl an Nachkommen aufgrund von Inkompatibilität reduziert sein kann und um das Auftreten von Inzuchtdepression zu vermeiden. Die Selektion aus der F_1 ist möglich, da in einem heterozygoten tetraploiden System durch die Kombinationsmöglichkeiten der homologen Chromosomen und die Rekombination durch Crossover-Ereignisse in der Meiose bereits in der ersten Folgegeneration ausreichend Variation entsteht.

Obwohl in der Gattung *Rosa* mehr als 100 Arten vertreten sind, basiert die Züchtung bis heute nur auf wenigen von ihnen. Die Angaben dazu schwanken dabei in Abstufungen zwischen sieben und zehn bis 15 Arten (Wylie '54; Shepherd '54; Reynders-Aloisi und Bollereau '96; Matsumoto *et al.* '97, '98; Marchant *et al.* '98; Rajapakse *et al.* '01; Crespel und Mouchotte '03; Debener '03). Zudem weisen historische Berichte darauf hin, dass Entwicklungslinien in der Züchtung auf einzelne Pflanzen zurückgingen. Beispielsweise stammen vier sehr alte Sorten Damaszenerrosen, von denen zumindest eine schon bei den alten Griechen erwähnt wurde (Hurst '41), von denselben drei Eltern ab, wie Iwata *et al.* (2000) durch Markeranalysen zeigen konnten. Dadurch ging die Domestikation mit einer erheblichen

Einschränkung der genetischen Variabilität einher (Martin *et al.* '01) und die modernen Rosen haben einen relativ eng begrenzten genetischen Hintergrund (Matthews *et al.* '91; Marchant *et al.* '96, '98; Li *et al.* '02). Wie groß der so ungenutzt gebliebene Anteil an der Biodiversität der Gattung *Rosa* ist, blieb bisher weitgehend unbekannt (Debener '03).

Die Rosenzüchtung basiert ganz wesentlich auf der Durchführung von klassischen Kreuzungen und nahezu alle als Sorte registrierten Genotypen sind aus einer solchen hervorgegangen (Crespel und Mouchotte '03). Je nach gewählten Kreuzungspartnern entsteht unter Umständen nur eine begrenzte Anzahl an Nachkommen. Ursache dafür können eine niedrige Pollenfertilität, ein geringer Frucht- und Samenansatz (Burger *et al.* '90) und/oder die allgemein als niedrig beschriebene Keimraten sein.

Von den mehreren 10.000 Sämlingen, die in einem Züchtungsansatz produziert werden, erfüllen nur sehr wenige die Anforderungen an einen neuen Genotyp, ihre Zahl liegt in der Regel im einstelligen Bereich. Von der Durchführung der Kreuzungen bis zur Marktreife vergehen zwischen fünf und acht Jahre (pers. Mitteilung eines Züchters; Chaanin '03).

Die Mutationszüchtung, sowohl die induzierte Mutagenese als auch die Nutzung von somaklonaler Variation in der Gewebekultur, hat einen geringen Anteil an der Vielfalt der Genotypen. Es gibt mehr Sorten, die auf zufällig entstandene Varianten (= Sports) zurückgehen. Die Unterstützung bei der Selektion von Kandidaten für neue Sorten aus Kreuzungspopulationen durch (genetische) Marker hat erst kürzlich mit der Publikation von Chromosomenkarten Einzug in die Rosenzüchtung gehalten (nach Crespel und Mouchotte '03).

Im Vergleich zu gut untersuchten Nutzpflanzen gibt es bei Rosen nur sehr wenige Informationen über die Vererbung morphologischer und anderer wichtiger Merkmale und ihrer genetischen Kopplung (Debener und Mattiesch '96, von Malek *et al.* 2000). Bisher ist die Vererbung folgender Merkmale untersucht worden, die sich alle als monogenisch herausgestellt haben (Debener '03):

- Das wiederholte Blühen (=Remontieren) während eines Jahres wird rezessiv vererbt (De Vries und Dubois '84, Debener '99).
- Die Ausbildung rosa-farbener Blüten ist dominant über weiße Blütenfarbe, aber der Einfluss weiterer Gene auf die Farbe der Blüten und deren Intensität kann nicht ausgeschlossen werden (Debener '99).
- Gelbe Blütenfarbe: dominant vererbt (De Vries und Dubois '84).
- Auch das Auftreten von mehr als einem Kranz Kronblätter, also gefüllter Blüten, wird dominant vererbt, wobei der Grad der Füllung von weiteren Genen abhängt oder vermutlich eher umweltbedingt ist (Debener '99).
- Die Bestachelung ist an der Sprossachse dominant (Debener '99), an Blattstielen rezessiv (Rajapakse '01).
- Der Moos-Charakter ist dominant, aber in Kreuzungen traten verschieden starke Ausprägungen des Merkmals auf, so dass Modifikatoren vermutet wurden, die aber nicht gekoppelt vorliegen (De Vries und Dubois '84). Der Moos-Charakter kommt durch den dichten Besatz der Pflanzen-Oberfläche mit drüsigen, moosartigen Auswüchsen zustande.

- Der kleinwüchsige Charakter von Miniaturrosen ist dominant (De Vries und Dubois '87).
- Die Resistenzgene gegen Sternrußtau und Mehltau werden beide dominant vererbt (Linde und Debener '03; Von Malek und Debener '98)

Diese Merkmale beziehen sich auf wenige, zum Teil spezielle Zuchtziele. Darüber hinaus gibt es noch eine ganze Reihe weiterer Ziele der Züchtung, die entsprechend des bearbeiteten Pflanzentyps und des angestrebten Produktes verschieden sind und unterschiedlich gewichtet werden (Gudin '03). In den Ländern des Ostblocks wurden beispielsweise vor der Öffnung zum Westen auch Rosen gezüchtet, die sich durch einen besonders hohen Gehalt der Früchte an Vitaminen auszeichneten, um in der Vitaminversorgung der Bevölkerung autark zu werden (Nickig und Rau '96).

Aufgrund zunehmender gesetzlicher Einschränkungen und Vorbehalten der Verbraucher gegenüber dem Einsatz von Fungiziden, ist die Resistenzzüchtung ein zentrales Ziel von Zuchtprogrammen bei Rosen geworden (von Malek *et al.* 2000). Dabei ist die Detektion und Charakterisierung von vertikalen Resistenzen (siehe auch 1.1.7) relativ leicht möglich. Ihre dominante monogenische Vererbung erlaubt eine klare Selektion und damit eine einfache Handhabung in der Züchtung. Allerdings wirken sie nicht unbedingt gegen alle Rassen des Pathogens und werden leicht von neuen Pathotypen überwunden, so dass sie ihren Nutzen verlieren. Horizontale Resistenzen (siehe auch 1.1.7) sind schwer ausfindig zu machen und zu handhaben, weil sie sich aus dem Zusammenwirken mehrerer Gene ergeben, die auf das Genom verteilt sind. Dies bedingt, dass ihre Allele in einer Kreuzung getrennt bzw. neu kombiniert werden, so dass sich das Resistenzniveau ändert.

Da Gene für Pilzresistenzen im Genpool der heutigen kommerziellen Genotypen fehlen, müssen sie in einem zeitaufwändigen Prozess aus Wildarten eingekreuzt werden (von Malek *et al.* 2000). Zunächst muss meistens der Ploidiegrad zwischen Zucht- und Wildformen angeglichen werden. Nach erfolgreicher Kreuzung haben die Nachkommen mit der Resistenz auch zahlreiche andere, unerwünschte Wildtypeigenschaften geerbt. Die Schwierigkeit besteht darin, diese in etlichen Rückkreuzungen mit Zuchtformen wieder zu entfernen ohne auch die Resistenz dabei zu verlieren. Dies dauert sehr lange, wenn jedes Jahr nur eine neue Kreuzungsgeneration produziert werden kann, da das wiederholte bzw. ausdauernde Blühen (Remontieren) rezessiv vererbt wird und die heterozygoten Nachkommen nur eine relativ kurze Blühperiode haben. Bei der praktischen Umsetzung haben sich weitere Schwierigkeiten ergeben: Byrne *et al.* ('96) stellten bei drei aus diploiden entwickelten tetraploiden Linien eine eingeschränkte Pollenfertilität fest. Ogilvie *et al.* ('91) erzielten mit Kreuzungen zwischen modernen Sorten und aus Wildarten entwickelten Zuchtlinien nur sehr geringer Fruchtansatz und Samenertrag. Bei Walker *et al.* ('96) ging die Resistenz schon mit der ersten Rückkreuzung verloren.

Bei natürlich vorkommenden Resistenzen werden zwei Mechanismen unterschieden: Die vertikale Resistenz ist rassenspezifisch, wirkt absolut und wird monogenisch vererbt (gene-for-gene-Resistenz). Bei horizontaler oder quantitativer Resistenz wirken verschiedene Gene zusammen, die meist ungekoppelt im Genom verteilt vorliegen. Je nach Zusammensetzung der Allele wird ein mehr oder weniger hohes Resistenzniveau gegen alle Pathotypen erreicht.

In dieser Situation stellt der Gentransfer eine wichtige Komponente der Resistenzzüchtung dar. Er bietet eine elegante Möglichkeit, den Genpool der modernen Rose gezielt mit Transgenen zu ergänzen, die nicht in die molekulare Wirt-Pathogen-Wechselwirkung eingebunden sind. Dadurch ist ein breites Wirkungsspektrum zu erwarten. Auch ein Überwinden der Resistenz durch Pathogene ist weniger wahrscheinlich als bei natürlichen Resistenzen, so dass durch Kombination verschiedener Mechanismen eine nachhaltige Wirkung erreicht werden kann.

1.1.7 Pathogene Pilze und Resistenz

Wie alle Pflanzen werden auch Rosen von zahlreichen Krankheiten und Schädlingen befallen, von denen die durch Pilze verursachten die größte Schadwirkung hervorrufen. Viele Autoren beschreiben Pilzkrankheiten als ein bedeutendes Problem bei der Kultivierung moderner Rosen. Der daraus resultierende Einsatz von Fungiziden, beispielsweise bis zu 40 Anwendungen pro Jahr gegen Sternrußtau (Reddy *et al.* '92), hat für Züchter und Vermehrungsbetriebe einen nicht zu unterschätzenden ökonomischen Aspekt und geht mit den bekannten Problemen und Gefahren für Mensch und Umwelt einher. Die Vorbehalte der Verbraucher gegenüber dem Einsatz von Pflanzenschutzmitteln nehmen zu. Zudem entwickeln die Pathogene gegen die Fungizide tolerante Stämme während gleichzeitig der Einsatz von Agrochemikalien durch die Verschärfung gesetzlicher Bestimmungen immer weiter eingeschränkt wird (Debener *et al.* '97, '98; von Malek *et al.* 2000). Beides zwingt zu höheren Aufwandmengen und häufigerer Anwendung der verbliebenen Präparate. All diese Aspekte haben der Resistenzzüchtung eine stärkere Bedeutung verliehen.

Insgesamt gibt es wenig natürlich vorkommende Resistenzen gegen pathogene Pilze bei Rosen. In einem Test mit 120 Genotypen auf fünf verschiedene Pilzkrankheiten stellten Wisniewska-Grzeskiewicz und Wojdyla ('96) bei den meisten eine wenn auch verschieden stark ausgeprägte Anfälligkeit gegen alle Pathogene fest. Entsprechend stellen auch von Malek *et al.* (2000) fest, dass im Genpool der Kulturrosen bisher keine natürlichen Resistenzen bekannt sind.

In diploiden ($2n = 14$) Wildarten der Rose sind genetische Resistenzen gegen phytopathogene Pilze beschrieben worden (Ma *et al.* 2000), über ihre Vererbung und den genetischen Hintergrund ist aber fast nichts bekannt (von Malek und Debener '98). Das Vorhaben, solche Resistenzen aus Wildarten in Gartenrosen einzukreuzen, gestaltet sich sehr schwierig und aufwändig (siehe "Genetik und Züchtung").

Die wichtigsten an Rosen auftretenden Phytopathogenen Pilze sind Botrytis-Fäule (*Botrytis cinerea*), falscher Mehltau (*Peronospora sparsa*), Rost (*Phragmidium spec.*), echter Mehltau (*Podosphaera pannosa*, zuvor *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) und Sternrußtau (*Diplocarpon rosae* / *Marssonina rosae*, auch *Asteroma*, *Actinonema* oder *Marsonia*).

Botrytis-Fäule ist nicht auf Rosen beschränkt, sondern kommt auf einer großen Zahl Blüten und Früchte vor. Der Pilz befällt hauptsächlich Pflanzenmaterial während Lagerung und Transport und gehört zu den Krankheiten mit der weltweit größten Schadwirkung (Horst '95; Gleason und Helland '03).

Die anderen vier Pilze befallen die Laubblätter der Rosen, sind sehr weit verbreitet und kommen mit unterschiedlicher Intensität sowohl im Freiland (hauptsächlich Sternrußtau) als auch im Gewächshaus (hauptsächlich echter und falscher Mehltau) vor. Ihr Auftreten wird durch hohe Luftfeuchtigkeit und niedrige Temperaturen begünstigt (Xu und Pettitt '03). Die Pflanzen werden durch reduzierte Photosynthese, vermehrte Transpiration und den Verlust von Nährstoffen und Assimilaten an den Pilz geschwächt (Shattock '03). Die Symptome reichen von lokalen Nekrosen über chlorotische Blätter und vorzeitigen Blattfall bis hin zum Absterben von Teilen oder ganzen Pflanzen bei schwerem Verlauf (Xue und Davidson '98; von Malek und Debener '98).

1.1.7.1 Echter Mehltau

Der echte Mehltau ist schon vom altgriechische Philosoph Theophrastos beschrieben worden (Horst '95). Im Gegensatz zu den meisten Pflanzenpathogenen wächst sein Myzel auf der Oberfläche der Blätter und er ernährt sich über Haustorien in der Epidermis (Linde und Shishkoff '03). Innerhalb von drei bis sieben Tagen nach Infektion werden neue kettenförmig zusammenhängende Konidien vom Ende der Konidienträger abgeschnürt, die zum typischen weiß-gepulverten Aussehen der Blattoberfläche führen.

In der Anfälligkeit der Rose gegen echten Mehltau sind deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Genotypen beobachtet worden. Darüber hinaus führten Feldbeobachtungen und Laborversuche teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. Zahlreiche Neuzüchtungen zeigten zwar bei ihrer Markteinführung zunächst eine Resistenz gegen Mehltau, bei den meisten sank das Resistenzniveau aber mit der Zeit durch die Entstehung neuer Rassen (Horst '95). Als Quelle für gesteigerte Resistenz gegen echten Mehltau kann auch somaklonale Variation dienen, wie Chatani *et al.* ('96) an Regeneraten aus Blattkallus einer anfälligen Sorte zeigen konnten.

Einige Wildarten zeigten in Inokulationsversuchen ein hohes Resistenzniveau. Aus einer solchen, *R. multiflora*, stammt das Resistenzgen *Rppl*, das Linde und Debener ('03) durch Analyse von Kreuzungspopulationen charakterisiert haben.

1.1.7.2 Sternrußtau

Sternrußtau ist die bedeutendste Krankheit bei Rosen weltweit, besonders im Freiland latent vorhanden und erreicht oft epidemische Ausmaße mit verheerenden Folgen (Horst '95, Kaufmann *et al.* '03). Die einzige Möglichkeit der Bekämpfung liegt in der Resistenzzüchtung und dem wöchentlichen präventiven Einsatz von Fungiziden bis zu 40-mal pro Jahr (Reddy *et al.* '92).

Zwischen verschiedenen Isolaten konnten sowohl Unterschiede in Morphologie, Farbe und Pathogenität (Spencer und Wood '92a) als auch eindeutige DNA-Polymorphismen festgestellt werden (Dreves-Alvarez '03), so dass man von einer großen Zahl an Varianten (Rassen, Pathotypen) des Pilzes ausgeht (Spencer und Wood '92b). Dafür spricht auch, dass sich Einzelspor-Isolate von *Diplocarpon rosae* mehrfach auch als verschiedene Pathotypen

herausgestellt haben (Debener *et al.* '98; Xue und Davidson '98, Yokoya *et al.* 2000). Eine Sammlung der bekannten Rassen existiert bisher soweit bekannt nicht (Yokoya *et al.* 2000).

Die Symptome einer Infektion bestehen auf beiden Seiten der Blätter aus charakteristischen schwarzen, rund bis unregelmäßig geformten Flecken mit Rändern, die durch subkutikuläres, radiär wachsendes Myzel ausgefranst, gezackt oder sternförmig erscheinen.

Resistenz gegen Sternrußtau tritt innerhalb der Rosen selten auf. Die modernen Sorten sind alle unterschiedlich stark anfällig für eine Infektion (Horst '95, Walker *et al.* '96; Drewes-Alvarez '03). Genotypen, bei denen zunächst von einer Resistenz ausgegangen wurde, stellten sich unter anderen Bedingungen oder gegenüber einer größeren Auswahl an Pathotypen doch als anfällig heraus (Spencer und Wood '92; Walker *et al.* '96).

In einer Auswahl verschiedener und Genotypen riefen verschiedene Einzelspor-Isolate von *Diplocarpon rosae* unterschiedliche Symptomatiken hervor (Xue und Davidson '98; Yokoya *et al.* 2000). Yokoya *et al.* postulierten daraufhin die Möglichkeit, durch solche Tests in einzelnen resistenten Genotypen starke, monogenisch vererbte Resistenzen (vertikale Resistenz) detektieren und für die Züchtung nutzbar machen zu können.

Von Malek und Debener ('98) untersuchten Nachkommenschaften aus Kreuzungen mit der resistenten Art *R. multiflora* und charakterisierten als bisher einzige Resistenzgene, *Rdr1* und *Rdr2*. Die Daten für *Rdr1* wurden mit molekularen Markern verifiziert. Das Gen wird dominant vererbt und bewirkt Resistenz gegen fünf Rassen des Pathogens. Allerdings sahen von Malek und Debener('98) eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür, dass Pathotypen entstehen oder gefunden werden, bei denen diese Resistenz nicht (mehr) greift. Diese Einschätzung wurde bestätigt: Von Malek *et al.* (2000) berichteten von einem neuen Pathotyp, bei dem der Resistenzmechanismus von *Rdr1* nicht oder nicht mehr wirksam war.

1.2 Gentransfer bei genetisch komplexen, vegetativ vermehrten Pflanzen

Die Übertragung von DNA-Sequenzen mit den Methoden der Gentechnik setzt bei Pflanzen, abgesehen von speziellen *in-planta*-Transformationstechniken, Gewebekultur *in-vitro* voraus. Nach erfolgtem Gentransfer wird das dafür ausgewählte Zielgewebe wieder zu ganzen Pflanzen regeneriert. Dafür stehen im Prinzip drei Systeme zur Verfügung: Die Nutzung bereits existierender Meristeme in den Blattachsen und der Sprossspitze, die auch bei der Mikropropagation verwendet werden, die *de-novo*-Induktion von Adventivsprossen und die Induktion somatischer Embryogenese. Bei den beiden Letztgenannten erfolgt die Differenzierung entweder direkt am Explantat oder indirekt nach einer vorangehenden Kallusphase.

Soll ein Regenerationssystem für die genetische Transformation genutzt werden, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein:

- Die Zellen, die an der Regeneration beteiligt sind, müssen auch für die gewählte Transformationsmethode zugänglich und transformierbar sein.
- Es besteht die Notwendigkeit, zwischen transgenen und nicht transgenen Zellen einerseits und zwischen verschiedenen Transformationsereignissen andererseits zu diskriminieren, da es sich beim Gentransfer, unabhängig von der eingesetzten Methode, um ein jeweils zelluläres Ereignis handelt (siehe auch: Selektion).
- Die Regeneration muss möglichst effizient erfolgen, und zwar
 - sowohl im Bezug auf den Anteil an Explantaten, die Strukturen hervorbringen,
 - als auch auf die Anzahl organisierter Strukturen pro Explantat.

Diese Punkte haben einen großen Einfluss auf die Effektivität, mit der transgene Pflanzen erzeugt werden können. Bei generativ über Saatgut vermehrten Pflanzen ist der Einfluss oberhalb einer gewissen Effizienz nicht entscheidend für das Erreichen dieses Zieles. Ausgehend von der T_0 können Nachkommen erzeugt werden, die genetisch einheitlich und entweder transgen sind oder nicht, da sie aus einer einzelnen Zelle, der Zygote entstehen. Diese Folgegenerationen, nicht die T_0 , können dann Gegenstand der entsprechenden Analysen sein.

Es gibt aber zahlreiche kommerziell relevante Pflanzen, deren Vermehrung ausschließlich vegetativ erfolgt, wie Gehölze und Zierpflanzen. Anders als bei generativ vermehrten Pflanzen, bei denen eine Sorte über die Homogenität innerhalb einer Population definiert wird, sind bei vegetativ vermehrten Arten alle Pflanzen einer Sorte Klone eines Prototyps.

Eine Kreuzung oder Selbstung würde durch Rekombination die einmalige Merkmalszusammensetzung des Genotyps und damit seinen Wert zerstören. Diese Tatsache macht klonal vermehrte Pflanzen im Bezug auf genetische Transformation zu etwas Besonderem.

Wird eine solche Pflanze nach einem Gentransfer regeneriert, stellt also bereits diese T_0 das zu analysierende Produkt dar, das gegebenenfalls freigesetzt und in Verkehr gebracht wird. Das bedeutet, dass alle Voraussetzungen für Analyse und Freisetzung, die bei samenvermehrten Pflanzen durch die Produktion von Nachkommen geschaffen werden, bei

vegetativ vermehrten Pflanzen schon während der Regeneration der T₀ erreicht werden müssen:

- Die Pflanze muss genetisch uniform sein (siehe auch: genetische Chimären).
- Die Pflanze muss frei von persistierenden Agrobakterien sein, wenn diese als Vektoren eingesetzt worden sind (siehe auch: persistierende Agrobakterien).
- Die Pflanze darf nur T-DNA-Sequenzen enthalten und muss frei von “backbone“-Sequenzen des Plasmids sein (siehe auch: “backbone“-Sequenzen).

Die aufgeführten Aspekte sollen in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Rose (*Rosa*) als Pflanze mit komplexem genetischen Hintergrund und als Vertreter von Gehölzen und Zierpflanzen gleichermaßen untersucht werden.

Bisher sind bei Rosen hauptsächlich zwei Wege der Regeneration beschritten worden: Bereits 1967 machte Hill die ersten Versuche zur Spross-Organogenese und 1990 begannen de Wit *et al.* und Roberts *et al.* mit Versuchen zur somatischen Embryogenese. Seitdem hat es zu beiden Themen zahlreiche Publikationen gegeben. Dabei wurden viele verschiedene Gewebe als Ausgangsmaterial verwendet und die meisten Autoren arbeiteten mit ihrem jeweils speziellen Sortiment an Genotypen.

Für die Transformation von Rosen sind bisher fast nur Protokolle verwendet worden, die auf somatischer Embryogenese basieren. Die einzige Ausnahme machten Matthews *et al.* '94, indem sie Protoplasten für 24 Std. gemeinsam mit Agrobakterien kultivierten und anschließend transgenen Kallus und Sprosse regenerierten. Firoozabady *et al.* ('94) waren die ersten, die embryogenes Gewebe transformiert haben. Sie co-kultivierten embryogenen Kallus von Noriega und Sondahl ('91) und regenerierten neun Kanamycin-resistente Sprosse. Derks *et al.* ('95), Souq *et al.* ('95), Li *et al.* ('02, '03) und Kim *et al.* ('04) gingen nach dem gleichen Prinzip vor, verwendeten aber unterschiedliche Protokolle als Grundlage. Auch Marchant *et al.* ('98) transformierten embryogenen Kallus, allerdings als einzige durch Beschuss mit DNA-beladenen Partikeln (particle bombardment). Van der Salm *et al.* ('97) produzierten zunächst transgene Adventivwurzeln und induzierten an diesen SEG. Dohm *et al.* ('01) hingegen induzierten SEG ohne Transformation und setzten die reifen SE in die Co-Kultur ein. Aus diesen regenerierten sie über indirekte Spross-Organogenese transgene Pflanzen. Dabei handelt es sich um das Protokoll mit der geringsten Genotypen-Spezifität.

Bei den Transformationen wurden unterschiedliche Gene übertragen. Während Firoozabady *et al.* ('94) die Markergene *GUS* und *LUC* ausschließlich verwendeten, benutzten andere Autoren das *GUS*-Gen nur, um die Durchführung der Transformation zu etablieren. Später transferierten sie dann Gene von bestimmtem Interesse, wie ein oder mehrere der *rol*-Gene von *Agrobacterium rhizogenes* zur Veränderung der Pflanzenarchitektur (Souq *et al.* '95, van der Salm *et al.* '97), das antibakterielle Cecropine B (Derks *et al.* '95) oder Chalkonsynthase in Antisense-Orientierung zur Veränderung der Blütenfarbe (Souq *et al.* '95).

Drei Gruppen setzten wie in dieser Arbeit Gene mit antifungal wirksamen Produkten ein: Marchant *et al.* ('98) transformierten eine Chitinase aus Reis (*Oryza sativa*), Li *et al.* ('03) das antimikrobielle Protein-Gen *Ace-AMP1* und Dohm *et al.* ('01) arbeiteten mit vier verschiedenen Genen, entweder einzeln oder kombiniert zu zweit und mit oder ohne eine

Signalsequenz für den Transport in den apoplasmatischen Raum: ein Typ I Ribosomen-inhibierendes-Protein, eine Klasse II Chitinase und eine Klasse II beta 1,3-Glucanase aus Gerste sowie ein Lysozymgen aus dem T4-Phagen.

Die Selektion erfolgte fast immer mit Kanamycin. Nur Kim *et al.* (04) verwendeten ein GFP-Gen und optische Selektion.

1.2.1 Agrobakterien-vermittelte Transformation

Das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* ruft bei Infektion von Pflanzen ein tumorartiges Wachstum (Wurzelhalsgallen) der infizierten Zelle hervor. Dies geschieht durch Übertragung des DNA-Abschnitts (T-DNA) eines Plasmids (Ti-Plasmid) in die Zelle und seine Integration durch illegitime Rekombination in das Pflanzengenom, wo die darauf befindlichen Gene exprimiert werden. Da dieser Mechanismus nur von den die T-DNA flankierenden unvollständigen Sequenzwiederholungen abhängt, ist es möglich, die dazwischen befindliche Sequenz auszutauschen. Auf diese Weise wird das *Agrobacterium* zur "Genfähre" für den Transfer gewünschter Gene in Pflanzen.

Eine Voraussetzung für die Infektion von Zellen ist die Verletzung des pflanzlichen Gewebes, so dass einerseits möglichst viele Zellen als Ziel des Gentransfers für die Bakterien erreichbar sind und andererseits Wundsubstanzen der Pflanze frei werden, die als Signal die T-DNA-Übertragung in Gang setzen. Eine Möglichkeit dazu bietet die Behandlung mit Ultraschall.

1.2.1.1 Ultraschall

Die Bildung von Blasen in Flüssigkeiten und deren Verhalten wird als Kavitation bezeichnet. Ausgangspunkte (Kerne) dafür sind in natürlichen Systemen winzige Gasblasen (Taschen) deren Existenz durch Fremdstoffe und bestimmte Mechanismen, z.B. an der Grenzfläche akkumulierte Ionen, ermöglicht wird.

Ist ein so stabilisierter Kern einem akustischen Feld ausgesetzt, wird oberhalb einer bestimmten Amplitude (Kavitations-Schwelle) akustische Kavitation ausgelöst. Sie hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Flüssigkeit ab. Wird sie überschritten, entsteht aus einem Kern innerhalb weniger Zyklen eine dampf- oder gasgefüllte Blase, die in ihrer Größe oszilliert und schließlich kollabiert.

Dies hat verschiedene Auswirkungen auf die Umgebung: Durch asymmetrisches Pulsieren der Blasen rotiert die Flüssigkeit mit hoher Geschwindigkeit um sie herum (akustische Strömung), was zu starken Scherkräften führt. Je nach einwirkender Amplitude erreicht die Temperatur im Inneren der Blase fast 3.000 Kelvin. Beim Kollabieren einer Blase entstehen mechanische Schäden durch hohe Drücke von bis zu mehreren 1.000 *bar* aufgrund der Schockwelle, die von der Implosion ausgeht. Ist die Blase an einer Oberfläche lokalisiert, kann durch ihren Kollaps ein Flüssigkeitsstrom durch sie hindurch entstehen, der aufgrund der Wucht des Aufpralls Schäden auf der Oberfläche verursacht.

Für diese Effekte gibt es zahlreiche sehr unterschiedliche Anwendungen wie beispielsweise die Reinigung von Oberflächen oder die Induktion chemischer Reaktionen. Der Einsatz von Ultraschall in der Biotechnologie beschränkte sich zunächst auf den Aufschluss von Zellen.

In pflanzlichen Geweben kommt es durch Ultraschall zum Abbau von Proteinen und zur Zerstörung von Makromolekülen, Teile des Cytoplasmas werden zum Rotieren gebracht und die Struktur des Nukleus wird zerstört. Die Wachstumsrate ist vorübergehend reduziert, die Synthese von DNA, RNA und Proteinen wird unterdrückt und es entstehen elliptische Zonen zerstörter Zellen (Atchley '88; Frizzell '88).

Dann fand man heraus, dass Ultraschall bei entsprechender Dosierung die Transformation von Pflanzenzellen mit nackter Plasmid-DNA günstig beeinflusst (Joersbo und Brunstedt '90; Zhang *et al.* '91a, b; Wyber *et al.* '97; Sawahel '97).

Auch für die Transformation von Pflanzen mittels Agrobakterien ist die Verletzung von Gewebe durch Ultraschall ein geeignetes Mittel, um die Effizienz zu steigern, wie Trick und Finer ('97) zum ersten Mal beschrieben. Sie bezeichneten diese Methode als SAAT (sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation). Der Effekt basiert auf Mikro-Verletzungen durch Kavitation im Gewebe, so dass die Agrobakterien das Gewebe besser besiedeln und damit mehr Zellen erreichen und transformieren können. Eine Steigerung der Transformationsrate durch eine Behandlung der Explantate mit Ultraschall haben inzwischen zahlreiche Autoren in unterschiedlichen Systemen sowohl auf transienter als auch auf stabiler Ebene bestätigt (Amoah *et al.* '01; González *et al.* '02; Santarém *et al.* '98; Tang '01; Trick und Finer '98; Weber *et al.* '03). Daher kommt diese Methode auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

1.2.1.2 "backbone"-Sequenzen

Bei Kontakt von *Agrobacterium tumefaciens* mit pflanzlichen Wundsubstanzen werden die plasmidcodierten *vir*-Gene aktiviert. Durch ihre Expression wird die T-DNA des Ti-Plasmids als Einzelstrang mobilisiert, um in eine Pflanzenzelle transferiert zu werden. Dazu wird sie an ihren Enden, der rechten (RB) und linken "border" (LB), von VirD-Proteinen endonukleolytisch gespalten. VirD2 bleibt kovalent am 5'-Ende der T-DNA gebunden und vermittelt ihr damit eine Polarität (Brandt '04).

Dieser Ablauf kann in der Praxis nicht immer bestätigt werden. Von zahlreichen Autoren sind transgene Pflanzen beschrieben worden, die Sequenzen des Plasmidrückgrads in ihr Genom integriert hatten. Sie waren entweder über die linke "border" oder über die rechte "border" mit der T-DNA verbunden, auf beiden Seiten von ihr flankiert oder unabhängig von ihr übertragen worden. Die Häufigkeit solcher Ereignisse lag zwischen 20 % (De Buck *et al.* 2000) und 75 % (Kononov *et al.* '97).

Dieses Phänomen wird ursächlich auf eine zu geringe Expression der *vir*-Gene zurückgeführt. Dadurch wird bei der Mobilisierung des T-DNA-Einzelstranges das Plasmid nicht immer vom VirD1-Protein an der linken "border" besetzt und geschnitten. Es ergeben sich daraus zwei Mechanismen für die Übertragung von "backbone"-Sequenzen: Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Entstehung des T-DNA-Einzelstranges über die LB hinaus fortgesetzt wird. Sie endet dann entweder bei Erreichen einer der nächsten "border"-Sequenzen, wenn das Plasmid dort geschnitten wurde, oder an einer beliebigen Stelle durch einen zufälligen Strangabbruch. Bei der zweiten Möglichkeit wird die LB statt vom VirD1 vom VirD2 erkannt

und geschnitten, das dann am 5'-Ende der "backbone"-Sequenz gebunden bleibt. Von dort startet die Einzelstrangbildung des "backbone". Er bleibt entweder separat oder wird über die RB mit der T-DNA verbunden. Die genannten Mechanismen werden in unterschiedlicher Kombination und Häufigkeit beobachtet (Wenck *et al.* '97; Kononov *et al.* '97; Kuraya *et al.* '04; De Bond *et al.* 2000; Shou *et al.* '04).

Das Auftreten von "backbone"-Sequenzen gehört zu den unerwünschten Ereignissen bei Transformationen und macht eine gründlich Analyse der transgenen Pflanzen notwendig. Da es sich um Sequenzen bakteriellen Ursprungs handelt, können sie zum einen aufgrund ihrer Sequenz zur Methylierung des DNA-Abschnitts und dadurch zum "silencing" der Transgene führen. Zum anderen können die Sequenzen, die auch ein Resistenzgen enthalten, nach Freisetzung der Pflanze von Bakterien in funktioneller Form aufgenommen, in ihr Erbgut integriert und weitergegeben werden. Und schließlich muss eine transgene Pflanze für die Zulassung zur Markteinführung frei von Vektor-"backbone"-Sequenzen sein (De Buck *et al.* 2000).

Der Nachweis von "backbone"-Sequenzen erfolgte in dieser Arbeit mit drei Primerpaaren und PCR sowie einer Sonde im Southern Blot.

Die beiden Primerpaare LB und RB überspannen jeweils die entsprechenden "border"-Sequenzen, mit dem dritten Primerpaar wurde ein Fragment des *nptIII*-Gens auf dem Vektor amplifiziert. Dieses Fragment diente auch als Sonde für die Southern-Analysen.

1.2.1.3 Persistierende Agrobakterien

Nach Transformation von pflanzlichen Explantaten durch Co-Kultur mit Agrobakterien werden den Kulturmedium Antibiotika zugesetzt mit dem Ziel, das Wachstum der Bakterien zu unterbinden und sie so aus dem pflanzlichen Gewebe zu eliminieren. Bei samenvermehrten Pflanzen ist dieses Ziel ganz einfach durch die Produktion der T₁ zu erreichen, da Agrobakterien nicht auf folgende Generationen übertragen werden. Bei vegetativ vermehrten Pflanzen hingegen besteht die Notwendigkeit, dies in der T₀ zu realisieren, da die nach Transformation erhaltenen Regenerate (T₀) direkt Gegenstand von Analysen sind und gegebenenfalls freigesetzt werden.

Ein Aspekt dabei ist sowohl praktischer als auch sicherheitstechnischer Natur und betrifft das "containment" gentechnisch veränderter Organismen (GVO) (Domínguez *et al.* '04). Agrobakterien können in Pflanzen über lange Zeit existieren, wie zahlreiche Beispiele belegen (El Khalifa *et al.* '73; Mogilner *et al.* '93; Barrett *et al.* '96; Matzk *et al.* '96). Auch in Rosen haben pathogene Agrobakterien jahrelang existiert, oft ohne Symptome hervorzurufen (Ricci *et al.* '96), und konnten aus den Pflanzen reisoliert werden (Martí *et al.* '99). Wenn also Agrobakterien, die noch aus der Co-Kultur stammen, in T₀-Pflanzen persistieren, die freigesetzt werden sollen, so würde das auch eine Freisetzung transgener Bakterien bedeuten. Sie können über die Wurzeln ins Erdreich übergehen und genetisches Material auf andere Agrobakterienstämme und weitere Mikroorganismen übertragen (Dietz '93). Dadurch wäre eine weite, unerwünschte Verbreitung möglich, da DNA durch unterschiedliche Mechanismen zwischen Bakterien verschiedenster Gruppen (Lorenz und

Wackernagel '93) sowie zwischen Prokaryonten und Eukaryonten (Bundock *et al.* '95; López-Pila und Scheler '93; Brandt '04) ausgetauscht werden kann.

Ein zweiter Punkt betrifft den Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse bei der Analyse der potenziell transgenen Pflanzen. Solange die Agrobakterien, mit denen die Co-Kultur durchgeführt wurde, in einer regenerierten Pflanze vorkommen, ist es nicht möglich ihre Transgenität mittels PCR nachzuweisen. Alle Ergebnisse der PCR-Analysen bleiben zweifelhaft, da nicht entschieden werden kann, ob das entsprechende Amplifikat tatsächlich von einem transgenen Locus in der pflanzlichen DNA stammt oder von Plasmiden der persistierenden Bakterien (Barrett *et al.* '96).

Zum Nachweis persistierender Agrobakterien wurde in dieser Arbeit eine PCR mit Primern für das Gen *pica* gewählt, ein durch Pflanzenextrakt im Medium induzierbarer Locus im Genom von *Agrobacterium tumefaciens* (Rong *et al.* '90, '91; Yusibov *et al.* '94).

1.2.2 Selektion

Nach Gentransfer in pflanzliche Explantate liegen in der Regel mehrere, unabhängige Transformationsereignisse eingebettet in überwiegend nicht transgenes Gewebe vor. Während der anschließenden Regeneration muss neben der Induktion organisierter Strukturen die Trennung von transgenen und nicht transgenen Bereichen erfolgen. Dazu wird zusätzlich zum "gene of interest" in der Regel ein Selektionsmarker übertragen. Dieser vermittelt die Resistenz gegen eine Substanz, durch deren Zugabe zum Nährmedium eine Selektion ermöglicht wird: Das Wachstum nicht transgener Zellen wird unterdrückt oder sie werden zum Absterben gebracht, während transgenes Gewebe durch Expression des Resistenzgens davon ungehindert proliferieren kann. Das gebräuchlichste System bei der Herstellung transgener Pflanzen war die Verwendung von Kanamycin oder eines anderen Antibiotikums und die Übertragung des *nptII*-Gens.

Bereits 1991 forderte Sharples für die Herstellung transgener Pflanzen die Vermeidung genetischer Marker, deren Wirkung auf der Resistenz gegen Antibiotika beruht. Auch wenn Antibiotika-Resistenzen natürlicherweise ubiquitär in Populationen von Mikroorganismen vorkommen (Dietz '93), von denen wir unzählige mit der Nahrung aufnehmen, gibt es in der Öffentlichkeit keine Akzeptanz für Antibiotika-Resistenzen in Pflanzen. Eine Alternative dazu bieten Resistenzen gegen Herbizide. Die entsprechenden Gene sind natürlichen Ursprungs und die Mikroorganismen, aus denen sie stammen, sind weit verbreitet.

Eine solche Herbizidresistenz wird beispielsweise durch das *pat*-Gen vermittelt, das aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 stammt. Das in dieser Arbeit verwendete *bar*-Gen aus *S. hygroscopicus* (Thompson *et al.* '87) weist eine signifikante Sequenzhomologie zum *pat*-Gen auf (Dröge *et al.* '92, Devine *et al.* '93). Beide codieren für das Enzym Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (PAT). Es vermittelt die Resistenz gegen Glufosinat, das Racemat aus D- und L-Phosphinothricin (PPT = Homoalanin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure). Es wirkt als Breitspektrum-Kontaktherbizid, das das Enzym Glutaminsynthetase (GS) aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Glutamat kompetitiv hemmt (Dröge *et al.* '92). Von dem Enzym PAT jedoch wird ein Acetyl-Rest von Acetyl-

CoA auf PPT übertragen. Dadurch entsteht Acetyl-PPT, das keine herbizide Wirkung mehr besitzt, da es seine Bindungsfähigkeit an GS verloren hat.

Glutaminsynthetase ist ein Schlüsselenzym für den Einbau von anorganischem Stickstoff in Glutaminsäure. Es ist sowohl für die Stickstoffassimilation von entscheidender Bedeutung, als auch für das Recycling von Ammonium, das bei der Photorespiration und Deaminierungsreaktionen entsteht (Devine *et al.* '93). Wird die GS gehemmt, kommt es zu einer schnellen Anhäufung von Ammonium, so dass das Zytoplasma alkalisiert und der Elektronentransport entkoppelt wird. Gleichzeitig kommt die Photosynthese zum Erliegen und die Chloroplastenstruktur wird zerstört (Devine *et al.* '93).

Das System PAT – PPT ist bereits gründlich untersucht. Die Abbauprodukte von PPT im Boden und in resistenten wie sensitiven Zellkulturen und Pflanzen sind analysiert (Dröge *et al.* '92, Metz *et al.* '98; Engelhardt *et al.* 2000) und der Verbleib des Transgens im Kompost untersucht (Peters *et al.* 2000). Bei resistenten Pflanzen sind noch keine pleiotropen Effekte beobachtet worden, auch nicht auf so sensible, komplexe Merkmale wie Pollenfertilität und Samenertrag (Donn und Eckes '92). Des Weiteren wurden noch keine durch Mutation entstandenen falsch-positiven Pflanzen beobachtet, wie dies gelegentlich bei Antibiotika-Resistenzgenen auftritt (Donn und Eckes '92).

1.2.3 Genetische Chimären

Das Sprossscheitelmeristem von Angiospermen besteht aus mehreren Initialzellen in drei Schichten (L1, L2, L3). Jede dieser Zellen ist entsprechend ihrer Position im Meristem der Ausgangspunkt einer Zelllinie, die aufgrund der Geometrie der Zellteilungen einen bestimmten Teil der Pflanze bildet. Unterscheiden sich die Initialzellen genetisch voneinander, entsteht eine chimäre Pflanze, indem die Abkömmling der Zellen jeweils Sektoren (Sektorialchimäre) oder Schichten (Periklinalchimäre) bilden. Dabei entscheidet die relative Position der entsprechenden Zellen im Meristem über die Art und Ausdehnung des chimären Charakters, sowie die Dauer seines Auftretens. Die Zusammensetzung der Initialzellen des Apikalmeristems kann sich ändern, wenn für die einzelnen Zelltypen unterschiedlich günstige Bedingungen herrschen, so dass ihr Anteil entsprechend zu- oder abnimmt. Der chimäre Zustand eines unregelmäßigen Mosaiks (Meriklinalchimäre) kann durch Propagation aus Blattachselknospen stabilisiert werden, wenn bei der Bildung der Lateralmeristeme eine Periklinal- oder Sektorialchimäre entsteht (Szymkowiak '96).

Bei der genetischen Transformation von pflanzlichem Gewebe finden Transformationsereignisse unabhängig von der eingesetzten Methode immer in einzelnen Zellen statt (Schuermann und Dandekar '93), so dass ein Mosaik von unterschiedlicher genetischer Konstitution entsteht. Während bei der somatischen Embryogenese sowohl Einzelzellen als auch Gruppen von Zellen den Ursprung organisierter Strukturen bilden können (z.B. Christou und Ford '95), gehen *de-novo* induzierte Sprosse normalerweise auf mehrere Zellen zurück (Mathews *et al.* '95), so dass aus chimärem Gewebe chimäre Regenerate entstehen (DeKathen und Jacobsen '90). Das Auftreten genetischer Chimären ist demnach ein wichtiger Aspekt bei der Transformation von Pflanzen (Zhan *et al.* '97) und in

diesem Zusammenhang ein unerwünschter Effekt (Geier und Sangwan '96; Zuker *et al.* '99). Er ist wohl eher die Regel als die Ausnahme (Mathews *et al.* '95) und kann nur durch ein geeignetes Selektionsschema eingeschränkt werden (Berthomieu *et al.* '94).

Die Entstehung von Chimären nach Transformation wird zwar oft als Phänomen beschrieben, Publikationen, in denen sie untersucht und diskutiert wird, sind indes rar. Der Hinweis auf Chimären ist in der Regel nur ein Nebenprodukt der Transformationsversuche und fast nie das ursprüngliche Thema der Arbeiten. Ausnahmen davon sind bei Schmülling und Schell ('93) (Tabak, *Nicotiana*), Dong und McHughen ('93) (Flachs, *Linum usitatissimum*), Berthomieu *et al.* ('94) (*Brassica oleracea*), Fladung ('96) (Kartoffel, *Solanum*) und Geier und Sangwan ('96) (*Kohleria*) zu finden.

Sonst wurden Ergebnisse, die auf Chimären hindeuteten, oft nicht näher untersucht und die entsprechenden Pflanzen ausgesondert (Berthomieu *et al.* '94). Entsprechende Beispiele gibt es bei *Brassica campestris* (Mukhopadhyay *et al.* '92), Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) (Chen *et al.* '01), Soja (*Glycine max*) (Parrott *et al.* '89), Erbse (*Pisum sativum*) (DeKathen und Jacobsen '90), Flachs (*Linum usitatissimum*) (McSheffrey *et al.* '92). Bei Pflanzen wie diesen, die über Saatgut vermehrt werden, kann mit Chimären in der T₀ weiter gearbeitet werden, indem sie geselbstet oder gekreuzt werden. Zwar ist unter Umständen die Zahl der transgenen Nachkommen reduziert, diese sind dann aber sicher genetisch einheitlich, da sie von einer einzigen Zelle, der Zygote, abstammen. Aus diesem Grund sollten Expressionsstudien nicht direkt an regenerierten Pflanzen (T₀), sondern nur an deren Nachkommen (T₁, T₂, ...) durchgeführt werden (Berthomieu *et al.* '94). Genau das ist aber bei Pflanzen nicht möglich, die vegetativ vermehrt werden. Die spezielle Kombination von Eigenschaften eines Genotyps kann bei ihnen nur durch klonale Vermehrung erhalten werden. Daher hängt die genetische Konstitution einer vegetativ vermehrten Pflanze nach einer Transformation alleine vom Regenerationsgeschehen ab, so dass dabei die Produktion von Chimären beobachtet und vermieden werden muss (Robinson und Firoozabady '93; Mathews *et al.* '95; Domínguez *et al.* '04).

Gelingt dies nicht, ist diese Pflanze sowohl in wissenschaftlicher als auch in praktischer Sicht nur eingeschränkt nutzbar: Während der Propagation kann es zu einer Veränderung in der Zusammensetzung des Gewebes kommen. Daher besteht immer Unsicherheit über die transgene genetische Konstitution und damit auch über die dadurch vermittelte(n) Eigenschaft(en) eines bestimmten Individuums. Unter Umständen ist der Verlust des transgenen Charakters möglich.

Der Einsatz solcher Pflanzen in Zuchtprogrammen würde zu einer nicht vorhersagbaren Vererbung der Transgene führen und ihre Anmeldung als neue Sorte muss unterbleiben.

Bei Analyse wäre es weder möglich, Ergebnisse einzelner Proben zu verallgemeinern, noch die Resultate mehrerer Tests zu vergleichen oder verschiedener Untersuchungsmethoden auf einander zu beziehen. Zuverlässige Aussagen über Anzahl und Art der transgenen Loci sowie über ihre Expression einschließlich der damit verbundenen Effekte sind daher ausgeschlossen.

2 Material

2.1 Geräte

Autoklav	Tuttnauer, Systec 5075 ELV
Binokular	Leica, Wild M 37
	Wild Makroskop M 420
Brutschränke	Memmert, Modell 400
Gelapparatur	BioRad / Polymehr
Hybridisierungsöfen	Biometra / H.Saur Laborbedarf
Inkubator	Heidolph Inkubator 1000
Mikrowellenherd	Thomson Micro M422
pH-Meter	WTW pH 422
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000
Schüttler	Heidolph Unimax 1010
Sterilwerkbank	Biohit, Antares
Thermocycler	Biometra, T3
Ultraschallbäder:	
Sonorex RK 255 S	Bandelin electronic
transsonic digital S	elma
UV-Tisch	Vilbert Lourmat TF 35M
Vortex	Heidolph REAX top
Waagen	Sartorius, Handy und 3705
Zentrifugen	Eppendorf 5415C; Sigma 302

2.2 Kulturgefäße

24-Well-Platten	Sarstedt
Becher mit Deckel aus Polypropylen:	
250 mL (ca. 8 cm ø x 5 cm hoch)	Polarcup
500 mL (ca. 8 cm ø x 10 cm hoch)	Polarcup
Glasröhrchen mit Metallkappe	cap-o-test
Petrischalen (9 cm ø)	Greiner
Pflanzgefäße, versch. Größen	Pöppelmann

2.3 Verbrauchsmaterial

biologischer Pflanzenschutz	Neudorff / e-nema
Glasflaschen	Schott
Nylonmembran	Roche
Perligran G	Deutsche Perlite GmbH, Dortmund
Plastikverbrauchsmaterial	Sarstedt
Röntgenfilme	Kodak Biomax
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt
Substrate	Biohum, Dransdorf
Whatman-Papier	Schleicher und Schnell

2.4 Reagenzien, Chemikalien und Enzyme

2,4-Dichlorophenoxy Essigsäure	Duchefa
6-Benzylaminopurin	Duchefa
Agar-Agar	Roth
Agarose HEEO Ultra Qualität	Roth
Ammonium-Glufosinat PESTANAL®	Riedel-de Haën
Anti-DIG-AP-Konjugat	Roche
Anti-Digoxygenin-AP Fab fragments	Roche
β-Mercaptoethanol	Roth
BASTA®	Bayer
CDP Star	Roche
Cefotaxime	Duchefa
Chloroform	Roth
Combactam	Pfizer
Concert™ Plant RNA Reagent	Invitrogen, Cat. No. 12322-012
CTAB	Roth, Sigma
D(+)-Saccharose	Roth
DIG DNA Labelling Mix	Roche
Dig Easy Hyb	Roche
DIG-Marker II	Roche
DNA Ladder 1 kb	MBI Fermentas
DNA Ladder 100bp plus	MBI Fermentas
dNTP Mix	MBI Fermentas
EcoRI	MBI Fermentas
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Gelrite	Roth
Gibberillinsäure 3	Serva/Duchefa

HCl 6M	Riedel-de Haën
Hefeextrakt	Roth
IBA	Duchefa
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Kanamycin Sulfat	Duchefa
λ-DNA (50 kb)	MBI Fermentas
Ladepuffer, 6-fach (loading dye)	MBI Fermentas
Maleinsäure	Roth
MES Puffer	Biomol
Methanol	Roth
MOPS	Biomol
Murashige & Skoog Medium (Makro-und Mikrosalze incl. Vitamine)	Duchefa
Murashige & Skoog Medium (Makro-und Mikrosalze incl. Vitamine, verändert nach van der Salm)	Duchefa
Myo-inositol	Serva
N-Lauroyl-Sarcosine	Sigma
NAA	Duchefa
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumhypochlorit	Roth
Nucleo Spin RNA Plant	Macherey-Nagel Cat. No. 740949
Pepton, tryptisch verdaut	Roth
Phenol	Roth
Plant Agar	Duchefa
Reverse Transkriptase	MBI Fermentas
RNase I	Quiagen
RNase Inhibitor	MBI Fermentas
Sarcosyl (Na-)	Sigma
SDS	Roth
Taq Polymerase (Red Taq)	Natutec
Thidiazuron	Duchefa
Ticarcillin	Duchefa
Tris-HCL	Roth
Tween20	Roth

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 für DNA-Isolation

K1-Puffer

Tris-HCl	50 mM	6,05 g/L
EDTA	5 mM	1,86 g/L
Sorbitol	0,35 M	63,77 g/L
PEG 6000	10 %	100 g/L
pH 8 mit KOH einstellen		
β-mercapto-Ethanol	1 %	10 mL/L

R-CTAB-Puffer

Tris-HCl	100 mM	12,1 g/L
EDTA	30 mM	11,16 g/L
NaCl	1,4 M	81,8 g/L
CTAB	3 %	30 g/L
PVP 40	3 %	30 g/L
Sarkosyl	1 %	10 g/L
pH 8 mit KOH einstellen		
β-mercapto-Ethanol	1 %	10 mL/L

Chloroform-Isoamylalkohol-Mix (CI-Mix)

Chloroform	23 Volumenteile
Isoamylalkohol	1 Volumenteil

Ammoniumacetat-Lösung 7,5 M 578 g/L

Waschpuffer für DNA-Isolation

Ethanol (absolut)	76 % (v/v)	760 mL/L
Ammoniumacetat	10 mM	1,34 mL der 7,5 M Lösung

TE-Puffer (mit RNase)

Tris-HCl	10 mM	1,21 g/L
EDTA	1 mM	372 mg/L
pH 8 mit KOH einstellen		
RNase A		10 µg/mL

2.5.2 für Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)

Tris/HCl	40 mM	4,84 g/L
Eisessig	20 mM	
EDTA	1 mM	372 mg/L
pH	7,5	

6 x Probenpuffer (MBI Fermentas)

EDTA	50 mM	18,6 g/L
Ficoll 40	25 % (w/v)	250 g/L
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	2,5 g/L
Xylene-Cyanol FF	0,25 % (w/v)	2,5 g/L

2.5.3 für Southern-Blot-Analyse

Denaturierungspuffer

NaOH	0,5 M	2,0 g/L
NaCl	1,5 M	8,7 g/L

Neutralisierungspuffer

Tris HCl	0,5 M	78,80 g/L
NaCl	3,0 M	175,32 g/L

20 x SSC

NaCl	3,0 M	175,32 g/L
tri-Na Citrat	3,0 M	88,23 g/L als Dihydrat
pH	7,0	

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	0,1 M	11,61 g/L
NaCl	0,15 M	8,76 g/L
pH	7,5	

Block – Lösung

Blocking Reagenz von Roche	10 g/L
Maleinsäurepuffer	ad 1 L

Antikörper – Lösung

Block – Lösung	50 mL
Anti-DIG-Fab	2,5µL

Waschpuffer

Maleinsäurepuffer		1 L
Tween	0,3 %	3 mL/L

Detektionspuffer

Tris-base	0,1 M	12,11 g/L
NaCl	0,1 M	5,84 g/L
pH	9,5	

DEA-Puffer

DEA	100 mM	
MgCl ₂	1 mM	

Strippingpuffer

NaOH	0,2 M	0,8 g/L
SDS	0,1 %	1 mL/L

2.6 Pflanzenmaterial

Rosen sechs verschiedener Genotypen waren von Rosenzüchtern als Containerpflanzen bereitgestellt worden. Dabei handelte es sich um Zuchtmaterial, das nicht als Sorte angemeldet wurde. Um eine Behandlung unabhängig von ihrer Herkunft zu gewährleisten und um rechtliche Auflagen zu erfüllen, wurden sie alphabetisch mit den Buchstaben `A` bis `F` benannt.

Von den beiden Sorten `Heckenzauber` (Hz) und `Pariser Charme` (PC) wurden dankenswerter Weise verschiedene *in-vitro*-Kulturen von Frau Dr. Dohm, Institut für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg, zur Verfügung gestellt. Die Sprosskulturen sind *in-vitro* vermehrt und durch regelmäßige Subkultur erhalten worden. Die Kulturen von etablierten embryogenen Kalluslinien sollten ebenfalls vermehrt und für die Produktion reifer somatischer Embryonen für die Transformation genutzt werden.

2.7 Bakterienstämme

Für die Transformation wurde *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt. Es handelte sich um die beiden Stämme EHA 101 und EHA 105.

2.8 Medien

Alle Medien wurden für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wie GA₃, Zeatin, TDZ, Glufosinat, Combaktam und die Antibiotika wurden sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren dem schon etwas abgekühlten Medium zugesetzt.

2.8.1 Bakterienkultur

YEP-Medium, flüssig und fest

Hefeextrakt	1,0 %	10 g/L
Pepton, tryptisch verdaut	1,0 %	10 g/L
Natriumchlorid	0,5 %	5 g/L
und für Festmedium		
Agar Agar	1,5 %	15 g/L

Minimal A-Medium, flüssig

K ₂ HPO ₄	60,0 mM	10,5 g/L
KH ₂ PO ₄	33,0 mM	4,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,5 mM	1,0 g/L
tri-Na-Citrat	1,8 mM	500 mg/L als Dihydrat
MgSO ₄	0,4 mM	100 mg/L als Heptahydrat
Thiamin HCl	14,8 µM	5,0 mg/L
MES - Puffer	0,2 %	2,0 g/L
Glucose	0,2 %	2,0 g/L
pH	7,0	

2.8.2 Pflanzliche Gewebekultur

Etablierung von *in-vitro* Sprosskulturen (Etablierungs-Medium)

MS Salze und Vitamine mit Fe-EDDHA, van der Salm-Modifikation (v. d. Salm *et al.* 1994)

MES - Puffer	0,1 %	1,0 g/L
Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
Ca-Panthenat	0,01 %	0,1 g/L
BAP	4,0 µM	ca. 1 mg/L
NAA	0,02 µM	ca. 0,004 mg/L
GA ₃	1,0 µM	ca. 0,35 mg/L
pH	5,4	
Plantagar	0,6 %	6,0 g/L

Sprosskultur-Medium

MS Salze und Vitamine, mit EDDHA-Eisenkomplex (van der Salm-Modifikation)

MES - Puffer	0,1 %	1,0 g/L
Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
Ca-Panthenat	0,01 %	0,1 g/L
BAP	4,0 μ M	ca. 1 mg/L
NAA	0,02 μ M	ca. 0,004 mg/L
GA ₃	0,5 μ M	ca. 0,13 mg/L
pH	5,4	
Plantagar	(0,7 %)	7,0 g/L

Organogenese-Induktions-Medium

MS Salze	in halber Konzentration	
MS Vitamine	in voller Konzentration	
MES – Puffer	0,1 %	1,0 g/L
Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
TDZ	7,0 μ M	ca. 1,5 mg/L
NAA	0,3 μ M	ca. 0,05 mg/L
pH	5,4	
Plantagar	0,7 %	7,0 g/L

Organogenese-Spross-Medium

MS Salze und Vitamine		
MES – Puffer	0,1 %	1,0 g/L
Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
BAP	2,2 μ M	(ca. 0,5 mg/L)
NAA	0,05 μ M	(ca. 0,01 mg/L)
GA ₃	0,3 μ M	(ca. 0,1 mg/L)
pH	5,4	
Plantagar	0,7 %	7,0 g/L

Induktions-Medien für embryogenen Kallus

MS Salze und Vitamine		
Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
pH	5,8	
Plantagar	0,7 %	7,0 g/L

Hormone im Induktions-Medien für embryogenen Kallus:

für die ersten vier Wochen

2,4-D 5 bis 15 μM (ca.1 bis 3 mg/L)

für Woche fünf bis zur Bildung von embryogenem Kallus

Zeatin 10 bis 20 μM (ca. 1,5 bis 4,5 mg/L)

oder

TDZ 10 bis 20 μM (ca. 1,5 bis 4,5 mg/L)Medium für kontinuierliche Kultur von embryogenem Kallus

MS Salze und Vitamine

Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
NAA	1,3 μM	(ca. 0,25 mg/L)
Zeatin	7,0 μM	(ca. 1,5 mg/L)
GA ₃	3,0 μM	(ca. 1,0 mg/L)
pH	5,8	
Plantagar	0,7 %	7,0 g/L

Co-Kultur-Medium

MS Salze und Vitamine

MES - Puffer	0,2 %	2,0 g/L
Saccharose	1,0 %	10,0 g/L
Glucose	1,0 %	10,0 g/L
pH	5,4	
Plantagar	0,7 %	7,0 g/L

Phytohormone entsprechend des Explantat-Typs

Regenerations-Medium für Blattachselknospen

MS Salze und Vitamine

MES - Puffer	0,1 %	1,0 g/L
Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
Ca-Panθοthenat	0,01 %	0,1 g/L
BAP	10,0 μM	(ca. 2,2 mg/L)
NAA	0,02 μM	(ca. 0,004 mg/L)
GA ₃	0,3 μM	(ca. 0,1 mg/L)
pH	5,4	
Plantagar	0,7 %	7,0 g/L

Regenerations-Medium für somatische Embryonen

MS Salze und Vitamine

MES - Puffer	0,1 %	1,0 g/L
Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
Ca-Panθοthenat	0,01 %	0,1 g/L
BAP	9,0 μM	(ca. 2,0 mg/L)
IBA	0,05 μM	(ca. 0,01 mg/L)
GA ₃	0,3 μM	(ca. 0,1 mg/L)
pH	5,4	
Plantagar	0,7 %	7,0 g/L

Bewurzelungs-Medium

MS Salze	in halber Konzentration	
MS Vitamine	in voller Konzentration	
MES - Puffer	0,1 %	1,0 g/L
Saccharose	3,0 %	30,0 g/L
Ca-Panθοthenat	0,01 %	0,1 g/L
Basacel®	0,5 mL/L	(0,05 %)
IBA	0,5 μM	(ca. 0,1 mg/L)
NAA	0,3 μM	(ca. 0,05 mg/L)
pH	5,4	
Plantagar	0,6 %	6,0 g/L

Medienzusätze nach Co-Kultur

Cefotaxim	400 mg/L bzw. 250 mg/L
Ticarcillin	100 mg/L bzw. 50 mg/L
Combactam	100 mg/L bzw. 50 mg/L

2.9 Nukleinsäuren**2.9.1 Transformationsvektoren**

Beide verwendeten binären Plasmide enthalten auf der T-DNA das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* als selektives Markergen (Thompson *et al.* '87), welches durch den *nos*-Promotor konstitutiv exprimiert wird und eine Resistenz gegen PPT vermittelt. Darüber hinaus befindet sich auf dem Rückgrat der Vektoren eine bakterielle Kanamycin-Resistenz (*nptIII*).

pIBgus:

Die T-DNA beinhaltet das *gusA*-Gen, das für β-Glucoronidase codiert und durch den *nos*-Promotor reguliert wird.

pHKvst:

Das Plasmid beinhaltet auf der T-DNA das *vst1*-Gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), das für das Enzym Stilbensynthase codiert. Es steht unter der Kontrolle des eigenen UV- und Elicitor-induzierbaren Promotors und enthält ein Intron von 356 bp Länge.

Das Genkonstrukt wurde dankenswerter Weise von Prof. Dr. R. Hain, Bayer Crop Science, zur Verfügung gestellt.

2.9.2 Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgeführten Primersequenzen wurden für die Amplifikation bestimmter Nukleotidsequenzen mittels PCR sowie für die Herstellung der Sonden für die Southern-Blot-Analyse verwendet.

Zielsequenz	Name	Sequenz	Fragmentgröße (bp)
Stilben-synthase aus <i>Vitis vinifera</i>	RT vst sense	5'-TCTACCAGTCTGATTATGCTGA-3'	611 (DNA)
	RT vst antisense	5'-TCTTTAAGAGCCTTCAATGC-3'	255 (RNA)
	vst Sonde 1 forw	5'-GATGTTTATCAGGCTCATAT-3'	937
	vst Sonde 1 rev	5'-ATACTTAAGTGATCCACGAA-3'	
	vst Sonde 2 forw	5'-TTGTACCATCAAGGTTGCTA-3'	906
	vst Sonde 2 rev	5'-ACTTGCAGTTTCATCCACTT-3'	
<i>bar</i> -Gen aus <i>Streptomyces</i>	bar sense	5'-GCAGGAACCGCAGGAGTGGA-3'	264
	bar antisense	5'-AGCCCGATGACAGCGACCAC-3'	
linke Border der T-DNA	Bin19 LB forw 5008	5'-GGGTTTATTGCTCGTGATG-3'	537
	Bin19 LB rev 5545	5'-CCAAAGGAAGTAGGTTAAA-3'	
Kanamycin-resistenz <i>nptIII</i>	sf kanr forw	5'-ATAAACCCAGCGAACCATTTGAGGT-3'	1150
	sf kanr rev	5'-TACGCAGCGGTATTTTTTCGATCAGT-3'	
rechte Border der T-DNA	Bin19 RB forw 9055	5'-TTGCTAGCTGATAGTGAC-3'	1161
	Bin19 RB rev 10216	5'-CCAACAGTGAAGTAGCTGA-3'	
<i>picA</i> -Gen aus <i>Agrobacterium</i>	picA 1	5'-ATGCGCATGAGGCTCGTCTTCGAG-3'	550
	picA 2	5'-GACGCAACGCATCCTCGATCAGCT-3'	

Tabelle 1: Oligonukleotid-Primer

3 Methoden

3.1 *in-vitro* Sprosskulturen

Für alle Sprosskulturen wurde ein modifiziertes MS-Medium verwendet, in dem der Eisen-EDTA-Komplex durch den stabileren Fe-EDDHA-Komplex ersetzt ist (Van der Salm *et al.* '94).

Wenn nicht anders angegeben, wurde als Geliertmittel für alle Medien Plantagar verwendet (Podwyszynska und Olszewski '95).

3.1.1 Etablierung

Das Ausgangsmaterial der sechs von Züchtern zur Verfügung gestellten Genotypen bildeten Containerpflanzen im Gewächshaus. Um von diesem Ausgangsmaterial Sprosskulturen *in-vitro* zu etablieren, wurden die Blätter oberhalb des Blattgrundes abgetrennt und die Zweige in Segmente zerteilt. Diese wurden für eine halbe Stunde in einem Becherglas unter fließendes Wasser gestellt (Salehi und Khosh-Khui '97; Ibrahim und Debergh '01). Anschließend erfolgte die Oberflächensterilisation für etwa eine Minute in 70 % Ethanol und für 30 Minuten in 1,2 % Natriumhypochlorit (NaOCl) mit 0,1 % Tween 20 unter permanenter Bewegung. Es folgte dreimaliges Waschen mit sterilem destilliertem Wasser. Diese Vorgehensweise ist von zahlreichen Autoren in ähnlicher Weise beschrieben worden. Von den Sprosstücken wurden Segmente von etwa ein bis 1,5 Zentimetern Länge geschnitten, so dass sich an jedem eine einzelne Blattachselknospe befand. Jedes Segment wurde einzeln in einem Glasröhrchen mit 10mL Etablierungs-Medium kultiviert, das mit einer Metallkappe verschlossen wurde. Die Segmente wurden horizontal platziert, so dass sich die ehemalige Sprossachse mit den Schnittflächen im Medium und die Achselknospe auf der Oberfläche befanden. Die Inkubation erfolgte bei 22 +/- 1°C im Dunkeln. Hatte der sich entwickelnde Spross eine Länge von drei bis vier cm erreicht, wurde er abgetrennt und auf Sprosskultur-Medium im 16-Stunden-Tag bei 25 +/- 1°C weiter kultiviert.

Um eine Verringerung der Kontaminationen und des Anteils verbräunter Explantate zu erreichen, wurden zu Beginn der Arbeiten einige Parameter wie Zeit und Konzentration der NaOCl-Behandlung, Geliertmittel (Plantagar/Gelrite), Präparation der Segmente und Art der Kulturgefäße (Petrischalen/24-Well-Platten/Glasröhrchen) variiert, sowie die Überschichtung mit 0,1 %iger Chinolin-Lösung getestet.

3.1.2 Mikropropagation

Die Kultur der *in-vitro*-Sprosse erfolgte zu jeweils sieben Explantaten in einem Becher (250-mL) auf etwa 60 mL Sprosskultur-Medium für vier Wochen. Dann wurden das Festmedium mit zehn bis 12 mL Flüssigmedium überschichtet und die Sprosse für weitere vier Wochen kultiviert, ähnlich wie bei De Riek *et al.* (1997). Nach acht Wochen hatten sich aus den Einzelsprossen verzweigte Sprossbüschel gebildet. Diese wurden wieder in einzelne Sprosse

zerteilt und auf neues Festmedium gesteckt. Die Inkubation erfolgte bei 24 +/- 1°C im 16-Stunden-Tag.

Zu Beginn der Arbeiten wurden die Konzentrationen der Phytohormone variiert (GA₃ 0 – 0,5 µM / BAP 2 – 20 µM), um deren Einfluss und eine geeignete Kombination herauszufinden.

3.2 Spross-Organogenese

Die Induktion von Adventivsprossen wurde mit Blättern von Pflanzen aus dem Gewächshaus durchgeführt. Dafür wurden die Spitzen im Wachstum begriffener Trieben mit 70 % Ethanol für etwa eine Minute und 1,2 % Natriumhypochlorit (NaOCl) mit 0,1 % Tween 20 für 30 Minuten oberflächlich sterilisiert und anschließend dreimal mit autoklaviertem destillierten Wasser gewaschen. Junge Blätter deren Spreite noch nicht voll entfaltet war, wurden für die Präparation der sechs Explantat-Typen verwendet: Die Blättchen wurden quer zur Mittelrippe in drei etwa gleich große Segmente geteilt und der Blattstil in einen verzweigten und einen unverzweigten Teil sowie den Blattgrund getrennt. Die Explantate wurden mit der abaxialen Seite auf Organogenese-Induktions-Medium gelegt und bei 24 +/- 1°C für neun Tage im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie auf Organogenese-Spross-Medium subkultiviert und ab dann im 16-Stunden-Tag bei Schwachlicht kultiviert. Die sich entwickelnden Sprosse wurden vom Explantat getrennt und auf Sprosskultur-Medium weiter kultiviert.

3.3 Somatische Embryogenese

3.3.1 Induktion von embryogenem Kallus

Die Induktion von embryogenem Kallus erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Dohm *et al.* ('01). Die jeweils jüngsten drei Blätter acht Wochen alter Sprosskulturen wurden quer zur Mittelrippe in drei Segmente geteilt oder die Spreite blieb intakt und nur die Mittelrippe jedes Blättchens wurde mehrfach durchtrennt. Beide Arten von Explantaten wurden mit der adaxialen Seite auf Induktions-Medien für embryogenen Kallus mit 2,4-D gelegt und bei 24 +/- 1°C im 16-Stunden-Tag inkubiert. Im Folgenden wurden die Explantate jeweils nach vier Wochen für drei weitere Kulturphasen á vier Wochen auf Induktions-Medium umgesetzt, das statt 2,4-D nun verschiedene Konzentrationen von TDZ oder Zeatin enthielt.

3.3.2 Proliferation von embryogenem Kallus und Produktion somatischer Embryonen

War im Verlauf der Induktion embryogener Kallus entstanden, wurde er auf einem Filterpapier auf Proliferationsmedium für embryogenen Kallus ausgestrichen. Die Kultur erfolgte bei 24 +/- 1°C im 16-Stunden-Tag. Nach vier Wochen wurde der Kallus selektiv subkultiviert, indem Cluster von Proembryonen und somatische Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien zusammen mit einem Teil der weißlichen weichen Zellmasse auf neuem Filterpapier ausgestrichen wurden.

3.4 Transformation

3.4.1 Anzucht der Agrobakterien

25 mL YEP-Medium wurden in 100-mL-Erlenmeyerkolben gegeben und mit je 250 μ L eines Glycerinstocks angeimpft. Nach Zugabe von 50 mg/L Kanamycin entsprechend der Resistenz der Bakterienstämme erfolgte die Inkubation auf einem Rundschüttler bei 27°C und 250 Upm über Nacht im Licht bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 2,0. Am folgenden Tag wurde die Suspension mit minimalA-Medium auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt (1:10). Es wurde Acetosyringon bis zu einer Konzentration von 1 mM zugegeben und 100 mL der Suspension in 250-mL-Erlenmeyerkolben für weitere zwei bis vier Stunden auf dem Schüttler bei 27°C und 100 Upm im Licht inkubiert, bis die optische Dichte (OD_{600}) größer als 0,5 war.

3.4.2 Transformation von Blattachselknospen

Acht Wochen alte Sprosskulturen wurden in einzelne, unverzweigte Sprossachsen zerlegt. Die Blätter wurden entfernt und für einen Teil der Versuche die Sprosse sofort in etwa fünf mm lange Segmente geteilt. Die Explantate wurden in der Agrobaktériensuspension verschiedenen Intensitäten von Ultraschall ausgesetzt. Zur Kontrolle blieb ein Teil der Explantate unbehandelt oder wurde in Medium ohne Agrobakterien sonifiziert. Nach etwa einer Stunde Inkubation wurden die Suspension dekantiert und die Explantate auf Co-Kultur-Medium ausgelegt.

3.4.3 Transformation somatischer Embryonen

Ausgereifte somatische Embryonen wurden von vier Wochen altem embryogenem Kallus abgesammelt und in 50 mL der Agrobakterien-Suspension in 100-mL-Erlenmeyerkolben inkubiert. Jeweils ein Drittel der Explantate wurde für zwei bzw. vier Minuten einer Ultraschallbehandlung im Wasserbad ausgesetzt. Während der Schallapplikation wurde der Erlenmeyerkolben leicht geschwenkt. Nach etwa einer Stunde in der Bakteriensuspension wurden die SE wieder herausgenommen und auf Co-Kultur-Medium ausgelegt.

3.4.4 Co-Kultur

Die Co-Kultur dauerte drei Tage und erfolgte im Dunkeln bei 24 \pm 1°C. Im Anschluss wurden die Explantate in 50-mL-Röhrchen gesammelt und mehrfach mit sterilem dest.-Wasser gewaschen, bis der Überstand klar blieb. Ein letzter Waschschrift wurde mit flüssigem MS-Medium durchgeführt, das 400 mg/L Cefotaxime, 50 mg/L Ticarcillin und 50 mg/L Combactam enthielt. Dann wurden die Explantate auf das entsprechende Regenerations-Medium aufgelegt, das die gleichen Mengen Antibiotika enthielt.

3.5 Regeneration und Selektion

3.5.1 Sprosse aus Blattachselknospen

Waren die Sprossachsen bisher im Ganzen verwendet worden, wurden sie für die Regeneration in Segmente von fünf mm Länge geschnitten und horizontal auf das Regenerations-Medium aufgelegt. Wenn die Achselknospen zu kleinen Sprossen ausgewachsen waren, wurden die Segmente noch weiter zerteilt, so dass sich jeweils nur ein neuer Spross an jedem Segment befand. Oft lösten sich die neuen Sprosse bei der Präparation von der Sprossachse und wurden dann alleine weiter kultiviert. Die entstehenden Sprosse wurden wie die der Stammkulturen behandelt, aber alle vier Wochen auf neues Festmedium umgesetzt. Mit der Selektion wurde nach etwa fünf Wochen mit einem Milligramm pro Liter Glufosinat begonnen und die Konzentration mit jeder Subkultur um ein halbes Milligramm pro Liter gesteigert. Als Kontrollen wurden beschallte (Ultraschall-Kontrolle) oder unbehandelte Explantate (Positivkontrolle) ohne Selektion und Antibiotika kultiviert, unbehandelte Segmente nur mit Antibiotika (~kontrolle) oder nur mit Glufosinat (Negativ-Kontrolle) im Regenerations-Medium oder co-kultivierte ohne Selektion (Transformations-Kontrolle).

3.5.2 Sprosse aus somatischen Embryonen

Die transformierten somatischen Embryonen wurden alle drei bis vier Wochen auf neues Regenerations-Medium umgesetzt. Mit der Selektion wurde bei einer Hälfte der Explantate sofort begonnen und mit der anderen mit Beginn der vierten Woche nach der Co-Kultur. Die Konzentration von Glufosinat wurde von zwei über fünf und 7,5 bis auf 10 Gramm pro Liter gesteigert und dann konstant gehalten. Bei jeder Subkultur wurden die braunen und nekrotischen Bereiche des sich entwickelnden Kallus entfernt und nur die grünen Teile umgesetzt. Dabei wurde der Kallus unter Umständen in mehrere Stücke aufgeteilt oder zerfiel von selbst. Alle Teile eines Explantates wurden zusammen kultiviert und bekamen eine einheitliche Nummer (z.B. 18), so dass ihr gemeinsamer Ursprung erkennbar blieb. Die Kultur erfolgte bei 24 +/- 1°C im 16-Stunden-Tag zunächst in Petrischalen. Wurde der Kallus größer und eine Differenzierung begann, wurde auf Polypropylenbecher (250 mL) umgestellt. Hatten sich aus den Strukturen Sprosse entwickelt, wurden diese abgetrennt, bekamen eine zweite Nummer, die den Sprossklon bezeichnete (z.B. 18-10), und wurden auf Sprosskultur-Medium mit Antibiotika und Glufosinat weiter kultiviert. Sie wurden wie die Stammkulturen vermehrt, aber alle vier Wochen auf frisches Festmedium umgesetzt. Um das Resistenzniveau der Sprosse zu testen, wurde der Selektionsdruck für etablierte Sprosslinien in Schritten von 5 mg/L mit jeder Subkultur auf schließlich 50 mg/L erhöht. Als Negativkontrolle fungierten Sprosse der Stammkulturen, die auf Selektions-Medium gesetzt wurden.

3.5.3 Bewurzelung

Die Sprosse, die im Zuge der Subkultur nicht für die Propagation benötigt wurden, konnten für die Bewurzelung eingesetzt werden. Sie wurden als einzelne, unverzweigte Sprosse in etwa 100 mL Bewurzelungs-Medium in Polypropylenbechern (500 mL) gesteckt und unter Selektionsdruck von 20 oder 50 mg/L Glufosinat bewurzelt. Als Negativkontrolle wurden Sprosse der Stammkulturen auf Medium mit 10 mg/L Glufosinat gesetzt.

3.5.4 Akklimatisierung

Nach vier bis acht Wochen wurden die bewurzelten Sprosse vorsichtig vom Agar befreit und in eine Mischung aus Pikiererde und Perlite (ca. 4:1 v/v) in Kunststofftöpfe von 11 cm Durchmesser getopft. Diese wurden entweder einzeln mit einer durchsichtigen Plastiktüte verschlossen oder zu mehreren in ein Minigewächshaus gestellt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu erzeugen. In beiden Fällen wurde die Abdeckung schrittweise geöffnet, so dass die Bedingungen für die Pflanzen nach und nach denen der Umgebung angepasst wurden. Der zeitliche Ablauf richtete sich dabei entsprechend der Jahreszeit nach dem Wachstum der Pflanzen und den klimatischen Gegebenheiten im Gewächshaus.

3.5.5 Kulturführung im Gewächshaus

Waren die jungen Pflanzen angewachsen und hatten mehrere neue Blätter gebildet, wurden sie in größere Töpfe umgesetzt. Dafür wurde ein Substrat für Gehölze mit relativ hohem Sandanteil verwendet, dem Perlite (ca. 1:5 v/v) zugesetzt worden war. Die Düngung erfolgte mit dem Langzeitdünger Osmokote. Die Belichtungszeit von 16 Stunden wurde durch zusätzliches Assimilationslicht erreicht.

Einzelne Pflanzen, die zur selben Sprosslinie gehörten, wurden durch Buchstaben individuell kenntlich gemacht (z.B. 18–10a, 18–10b etc., siehe zur Nummerierung auch 3.5.2).

Die Bekämpfung von tierischen Schädlingen erfolgte weitgehend mit biologischen Methoden. In Ausnahmefällen und gegen Pilzkrankheiten wurden auch chemische Pflanzenschutzmittel eingesetzt.

3.5.6 Histochemischer GUS-Assay

Die Detektion von GUS-Aktivität in Sprossen aus transformierten Achselknospen erfolgte wie bei Jefferson *et al.* ('87) beschrieben, allerdings ohne die anfängliche Fixierung in Formaldehyd.

3.5.7 Herbizidresistenz

3.5.7.1 “leaf paint“

Das jeweils endständige Fiederblättchen mehrerer Blätter einer Pflanze wurde mit einem Pinsel mit Basta® -Lösung (0,6 oder 1,2 g/L Glufosinat) bestrichen und das Blatt auf einer benachbarten Fieder markiert. Als Negativkontrollen wurden Blätter von nicht transformierten Pflanzen verwendet. Die Auswertung erfolgte nach zwei bis vier Wochen, indem das behandelte Blättchen als resistent (unverändert vital) oder sensitiv (abgestorben) bewertet wurde.

3.5.7.2 Spritzung mit Herbizid

Um die Stichprobengröße an untersuchten Blättern sowohl insgesamt als auch pro Pflanze zu erhöhen, sind 48 Pflanzen ausgewählt und komplett mit Basta® -Lösung behandelt worden. Sie wurden mit einer Konzentration von einem Gramm pro Liter Glufosinat von der Ober- und Unterseite tropfnass gespritzt.

3.6 Nachkommenschaft der T₀

Die regenerierten Pflanzen (T₀) wurden zur Produktion einer Folgegeneration durch Selbstung verwendet. Die Nachkommenschaft wird analog zur T₀ als T₁ bezeichnet.

3.6.1 Selbstung und Ernte

Die Selbstung wurde in den Morgenstunden mit den Blüten durchgeführt, die sich an diesem Tag öffnen würden oder damit begonnen hatten (De Vries und Dubois `83). Die Kelch- und Kronblätter wurden entfernt und die Antheren mit den noch geschlossenen Staubblättern in 2-mL-Reaktionsgefäßen gesammelt. Sie wurden für einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet. Am folgenden Tag wurden die Pollen durch Schütteln der Gefäße aus den Staubbeuteln freigesetzt und anschließend auf die Narben der eigenen Blüte aufgebracht.

Blütenknospen, die nicht für die Selbstung verwendet wurden, sind rechtzeitig entfernt worden, so dass eine unkontrollierte Bestäubung ausgeschlossen war.

Die Hagebutten wurden geerntet, wenn sie sich rot gefärbt hatten, und für mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert (Gudin `94).

3.6.2 Aussaat und Keimung

Nach mehrwöchiger Lagerung im Kühlschrank wurde das Fruchtfleisch der Hagebutten entfernt und die enthaltenen Achänen gezählt. Die Aussaat erfolgte in Pikiererde im Gewächshaus. Das Saatgut wurde leicht mit Substrat bedeckt und dieses kontinuierlich feucht gehalten.

War eine T₁-Pflanze gekeimt, wurde die Nummerierung des Elters (z.B. 18–10, siehe zur Nummerierung auch 3.5.2 und 3.5.5) erweitert, indem zusätzlich zur Nomenklatur die

Hagebutte, aus der sie stammte, durch die Anzahl ihrer Samen als Zahl in Klammern kenntlich gemacht wurde. Außerdem wurden die Keimlinge einer Hagebutte in der Reihenfolge ihres Erscheinens mit römischen Ziffern nummeriert. Der dritte Keimling aus einer Hagebutte mit neun Samen von dem Elter aus obigem Beispiel hatte demnach die Bezeichnung:

18–10 (09) III

Hatten die jungen Pflänzchen einige Blätter gebildet, wurden sie aus der Aussaatschale in Töpfe mit demselben Kultursubstrat wie ihre Eltern umgesetzt und zur Blüte gebracht.

3.7 Molekulare Analysen

3.7.1 DNA-Isolation

Das Volumen der Isolation richtete sich nach der angestrebten Ausbeute und dem Verwendungszweck der DNA: Für PCR-Analysen wurden 100 bis 200 mg Blattmaterial verarbeitet und die DNA in 2-mL-Reaktionsgefäßen isoliert, während für Southern-Blot-Analysen ein bis zwei Gramm Blattmasse in 50-mL-Röhrchen eingesetzt wurden. Der eigentlichen Isolation vorausgehend wurde für großvolumige Ansätze eine Aufreinigung des Probenmaterials mit dem ersten Abschnitt des Protokolls von Kobayashi *et al.* ('98) durchgeführt. Anschließend wurde mit der CTAB-Methode auf der Grundlage des in einigen Punkten modifizierten Protokolls von Doyle und Doyle ('90) gearbeitet. Am Ende schloss sich ein Verdau verbliebener Kohlenhydrate mit dem Enzym Driselase an (von Malek *et al.* 2000).

Möglichst junge Blätter wurden von Gewächshauspflanzen gesammelt, gewogen, für drei Tage in Petrischalen mit feuchtem Filterpapier im Dunkeln bei 24 +/- 1°C inkubiert (Kaufmann *et al.* '03) und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proben für Ansätze mit kleinen Volumina wurden mit einem speziellen kleinen Stößel unter Stickstoff direkt im Reaktionsgefäß zerstoßen, während die Proben für großvolumige Isolationen im Stickstoff-gekühlten Mörser gründlich zu feinem Pulver zermahlen wurden.

Im Folgenden ist der Ablauf der DNA-Isolation dargestellt:

- Aufreinigungs-Schritt nach Kobayashi: Zu den gemörserten Proben wurden 40 mL kalter (4°C) K1-Puffer gegeben und unter Bewegung bei 4°C inkubiert, bis eine homogene Suspension entstanden war. Dann wurde bei ca. 2.000 x g für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Vorgang wurde mit 30 mL Puffer und Zentrifugation bei 700 x g wiederholt.

Das Pellet konnte nun für eine spätere Bearbeitung bei -80°C eingefroren oder, wie auch das zerstoßene Blattmaterial für kleinvolumige Ansätze, in die Isolation eingesetzt werden.

Abweichend vom Protokoll von Doyle und Doyle erfolgte

- der Aufschluss der Zellen in 65°C warmem R-CTAB-Puffer (siehe Material),
- die Zentrifugationen bei 6.000 x g in kleinvolumigen und 10.000 x g in großvolumigen Isolationen

- die Chloroform-Extraktion bei Isolationen für Southern-Blot-Analysen zweimal,
- die Fällung mit $\frac{3}{4}$ Volumenteilen eiskaltem (-20°C) Isopropanol,
- die Inkubation in Waschpuffer für zehn Minuten
- die Fällung nach RNase-Verdau ohne vorheriges Verdünnen der Lösung.
- Schließlich wurde die DNA bei Raumtemperatur in 80 % und 100 % Ethanol für je fünf Minuten gewaschen, der Überstand dekantiert und zum Schluss quantitativ abgenommen.

Da der Driselase-Verdau erst ab einem relativ späten Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit eingesetzt wurde, zu dem ein großer Teil der Proben bereits isoliert war, musste er nachträglich auf die bereits in TE-Puffer vorliegenden DNA angewendet werden. Bei den letzten Isolationen wurde er mit dem Pellet nach RNase-Verdau durchgeführt:

- Die DNA-Lösung wurde im Verhältnis von 1:1 (v/v) mit Driselase in MES-Puffer versetzt, so dass sich eine 10 mM MES-Lösung mit 5 mg/mL Driselase ergab. Der Verdau fand bei 22°C für 30 Minuten statt.

Anschließend wurde die DNA wie in der Isolation gefällt, gewaschen und getrocknet. Am Ende wurde das Pellet in TE-Puffer aufgenommen und für einen Tag bei 4°C gelöst.

Die DNA wurde bei -20°C oder für längere Zeit bei -80°C gelagert.

3.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen entsprechend ihrer Größe wurde durch Elektrophorese in horizontalen Agarose-Gelen durchgeführt. Agarose für eine Gelstärke zwischen 0,75 und 1 % wurde entsprechend in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und auf etwa 50°C abgekühlt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid-Stammlösung im Verhältnis 1:20.000 versetzt, so dass eine Endkonzentration von $0,5\ \mu\text{g/mL}$ entstand, und in entsprechende Gelträger gegossen. Ein Kamm wurde so eingesetzt, dass an einer Seite des Gels Taschen entstanden, in die die Proben pipettiert werden konnten. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden sie in der Regel mit 6-fachem Probenpuffer versetzt. Nur für Proben aus einer PCR mit BioTherm Red Polymerase war das nicht notwendig, da der PCR-Puffer bereits entsprechend zusammengesetzt war. Um die Größe der DNA-Fragmente im Gel abschätzen zu können, wurden geeignete Größenstandards parallel zu den Proben mit aufgetragen und aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für Southern-Gele bei einer Spannung von 40 Volt und für alle anderen Anwendungen bei 80 bis 120 Volt.

3.7.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Ausbeute nach einer Isolation unter Verwendung der Substanz CTAB war nicht im Photometer möglich, da diese ähnliche optische Eigenschaften wie Nukleinsäuren hat (Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm). Unterschiedliche Rückstände in der DNA-Lösung würden dadurch die Messergebnisse verfälschen.

Stattdessen wurde die DNA-Konzentration im Agarose-Gel mit Ethidiumbromid abgeschätzt. Dazu wurden neben den Proben ein Standard (λ -DNA, 50 kb) in Abstufungen von 50 ng aufgetragen und die Intensität der Banden unter UV-Licht mit denen der Proben verglichen.

3.7.4 Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis transgener DNA-Sequenzen im Pflanzengenom und für den Ausschluss von persistierenden Agrobakterien als Ursache für positive Ergebnisse wurde die Polymerase – Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Dabei wurde jeweils ein μL der DNA-Lösung aus einer Isolation als Ausgangsmaterial für die Reaktion eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde für die PCR mit *picA*-Primern eine Suspension der Agrobakterien verwendet, mit denen die Co-Kultur durchgeführt worden war, und für alle übrigen das für die Transformation verwendete Plasmid.

Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die Verlaufs-Protokolle ergeben sich aus den Darstellungen in den Tabellen eins und zwei.

Komponenten	Volumen je Ansatz in μL
H ₂ O reinst	18,3
10 x Puffer	2,5
dNTPs 5 mM	1
Primer A 10 μM	1
primer B 10 μM	1
red-Taq (5 U/ μL)	0,2
Probe	1
gesamt	25

Tabelle 2: Zusammensetzung analytischer PCRs

PCR-Schritte	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in Sekunden	Anzahl der Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	180	1
Denaturierung	94	60	30
Annealing	60	90	
Elongation	72	90	
finale Elongation	72	300	1
Kühlung am Ende der PCR	4	∞	
Initiale Denaturierung	94	180	1
Denaturierung	94	60	30
Annealing	53	60	
Elongation	72	60	
finale Elongation	72	300	1
Kühlung am Ende der PCR	4	∞	

Tabelle 3: Bedingungen für PCR-Analysen
oben mit *vst*-, *bar*-, *nptIII* und *picA*-Primern
unten mit LB- und RB-Primern

3.7.5 Southern-Blot-Analyse

Um die Anzahl der ins Pflanzengenom integrierten transgenen Sequenzen feststellen zu können, wurde die Southern-Blot-Analyse angewendet. Durch sie und das Bandenmuster, hervorgerufen durch Integration an unterschiedlichen Orten, sollte auf den gemeinsamen oder unterschiedlichen Ursprung der Pflanzen und rückblickend auf den Ablauf der Transformation sowie der Regenerationsereignisse geschlossen werden.

3.7.5.1 Restriktionsverdau genomischer DNA und Fällung

Für den Restriktionsverdau wurden in der Regel jeweils 10 µg genomische DNA zunächst mit 30 oder 40 Units des Restriktionsenzym EcoRI in entsprechendem Puffer bei 37°C für mindestens zwölf Stunden fragmentiert. Das Volumen der Ansätze richtete sich nach der Konzentration der genomischen DNA nach der Isolation. Um sicherzustellen, dass der Verdau vollständig an allen Schnittstellen stattgefunden hatte, wurden weitere 10 oder 15 Units Enzym zugegeben und die Ansätze noch einmal für weitere vier Stunden bei 37°C inkubiert. Die Vorgehensweise ist der von Marchant *et al.* ('98) vergleichbar.

Um den Erfolg des Restriktionsverdaus zu kontrollieren, wurden jeweils 500 ng DNA aus den Ansätze zusammen mit 200 ng λ-DNA (50 kb) und 4 µL des DNA Ladder 100bp plus als Größenstandards auf ein 0,75 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und bei 100 Volt für etwa 60 Minuten aufgetrennt.

Die Aufreinigung der DNA nach dem Verdau erfolgte ähnliche wie bei der Isolation:

- Zugabe von ½ Volumenteilen Ammoniumacetat (7,5 M) und 2,5 Volumenteilen eiskalten Ethanol. Nach vorsichtigem Durchmischen der Lösung wurde die DNA bei 6.000 x g für 15 Minuten pelletiert und der Überstand dekantiert.
- Lösen des DNA-Pellets bei Raumtemperatur für fünf bis zehn Minuten in TE-Puffer.
- Zugabe von 2,5 Volumenteilen eiskalten Ethanol und Zentrifugation wie zuvor.
- Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, bis das Ethanol vollständig verdampft war, in 40 µL TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 24°C gelöst.

3.7.5.2 Southern Gel

Die fragmentierte DNA in 40 µl TE-Puffer wurde für fünf Minuten auf 65°C erhitzt, um sie sicher vollständig in Lösung zu bringen, mit 8 µL (1/6 Vol.) Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel (1%) mit Ethidiumbromid aufgetragen. Als Größenstandard wurden zwölf µl (ca. 100 ng) des DIG-Marker II eingesetzt.

Als Positivkontrolle wurden jeweils vier µL der entsprechenden PCR-Produkte einer 1:1.000-Verdünnung etwa zwei Stunden vor Ende des Gel-Laufes in die Tasche einer freien Bahn aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA im Gel erfolgte bei 40 V für 20 Stunden. Sie wurde am Ende der Elektrophorese mit einem Foto dokumentiert, um für die Auswertung der Southern-Analyse herangezogen werden zu können. Dabei ist die Auftrennung polymorpher

Banden zu erkennen, die durch eine hohe Zahl von Restriktionsfragmenten einer bestimmten Größe aufgrund repetitiver Sequenzen entstehen.



Abbildung 1: Southerngel mit verschieden starker Beladung und z. T. unvollständigem Verdau

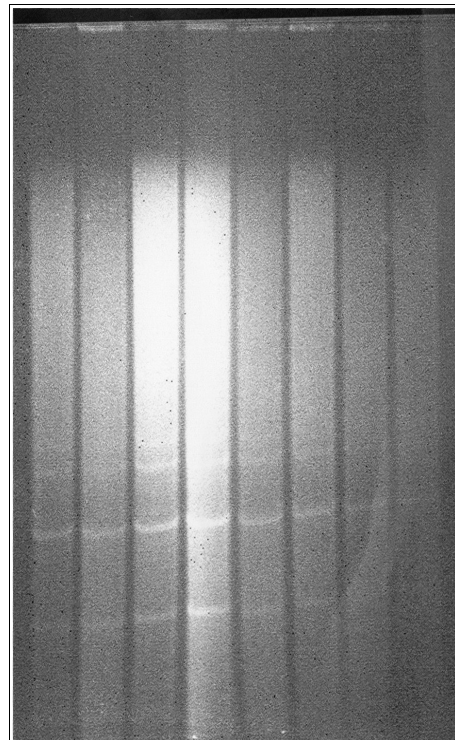


Abbildung 2: Southerngel mit gleichmäßiger Beladung und vollständig verdauter DNA

3.7.5.3 Southern Transfer

Die Vorbehandlung des Gels und der Kapillarblot auf die positiv geladene Nylonmembran wurden im Wesentlichen durchgeführt, wie im "DIG Application Manual for Filter Hybridisation" der Firma Roche unter 3.1.2.2 beschrieben.

Abweichend davon

- wurde das Gel ohne Equilibrierung in 20-fach SSC geblottet,
- wurden mehrere Lagen feuchtes Whatman-Papier für den Blotaufbau verwendet,
- war eine Kunststofffolie mit einem Ausschnitt in der Größe des Gels unter diesem platziert, um einen kapillaren Flüssigkeitsstrom am Gel vorbei zu verhindern und
- ist die Membran vor dem Auflegen auf das Gel in 20-fach SSC equilibriert worden.

Nach etwa 20 Stunden wurde der Blot abgebaut. Das Gel wurde für 30 Minuten im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und unter UV-Licht auf verbliebene DNA überprüft. Wenn der Transfer der DNA erfolgreich verlaufen war, wurde die Nylonmembran in Whatman-Papier und Alufolie eingeschlagen und die DNA bei 120°C für 30 Minuten auf ihr fixiert. Die Membran wurde so bis zur weiteren Verwendung trocken und bei Raumtemperatur gelagert.

3.7.5.4 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden

Die Sonden für eine nicht-radioaktive *vst*-, *bar*- und *nptIII*-Detektion wurden mittels PCR hergestellt und dabei mit Digoxigenin markiert, für die zum Teil entsprechende Nukleotide eingesetzt wurden. Im Folgenden sind die Zusammensetzung und der Ablauf der PCR dargestellt:

Komponenten	Herstellung der Sonden (μL)	Kontroll-PCR (μL)
H ₂ O reinst	37,35	18,3
10 x Puffer	5	2,5
dNTPs 5 mM	0,25	1
Primer A 10 μM	2	1
primer B 10 μM	2	1
Plasmid	1	1
DIG labelling mix	2	--
red-Taq (5U/ μL)	0,4	0,2
gesamt	50	25

Tabelle 4: Zusammensetzung der PCRs zur Herstellung DIG-markierter Sonden

PCR-Schritte	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in Sekunden	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	180	1
Denaturierung	94	60	40
Annealing	58	90	
Elongation	72	90	
Finale Elongation	72	300	1
Kühlung am Ende der PCR	4	∞	

Tabelle 5: Programm der PCR zur Herstellung DIG-markierter Sonden

Ein Teil der PCR-Produkte (5 μL der Sonde und 5 bzw. 10 μl der Kontrolle) wurde auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, um den Erfolg der Sondenherstellung zu kontrollieren. Dabei sollte die Bande der Sonde eine der Kontrolle vergleichbare Intensität aufweisen und aufgrund der größeren Molekülgröße etwas langsamer gelaufen sein. Die Verbliebenen 45 μL PCR-Ansatz mit Sonde wurden in 45 mL DIG-Easy-Hybridisierungslösung gegeben und bei -20°C eingefroren.

3.7.5.5 Hybridisierung

Die Hybridisierung bestand aus folgenden Schritten:

- Equilibrierung der Nylonmembran mit gebundener DNA in DIG-Easy-Hybridisierungslösung bei 42 °C für mindestens eine Stunde.
- Denaturierung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde in Hybridisierungslösung bei 65° C für fünf Minuten.
- Austausch der Equilibrierungs-Lösung gegen diejenige mit der Sonde.
- Hybridisierung der entsprechenden Zielsequenzen mit der Sonde bei 42°C für etwa zwölf Stunden.
- zweimaliges Waschen mit 2 x SSC-Lösung + 0,1 % SDS bei 42°C für jeweils 5 Minuten
- Waschen der Membran mit 0,5 x SSC-Lösung + 0,1 % SDS bei 65°C für 15 Minuten
- Waschen der Membran mit 0,1 x SSC-Lösung + 0,1 % SDS bei 65°C für 15 Minuten

3.7.5.6 Antikörperbindung, Detektion und “stripping“

Antikörperbindung, Detektion und das Entfernen der Sonde (=“stripping“) wurden weitgehend so durchgeführt, wie im “DIG Application Manual for Filter Hybridisation“ der Firma Roche unter 4.1.2.1 und 5.2.1 beschrieben.

Abweichend davon

- erfolgte der initiale Wasch-Schritt mit Maleinsäurepuffer,
- waren die Antikörper in der Antikörperlösung nur halb konzentriert,
- wurde nur etwa die Hälfte des DEA-Puffers auf eine Folie aufgetragen und die Membran darauf ausgerollt und
- erfolgte die erste Exposition eines Filmes nach 30 Minuten.

Je nach Intensität der Leuchtreaktion dauerte die Exposition zwischen einer und 90 Minuten. Anschließend wurde der Film entwickelt und fixiert.

- Nach dem “stripping“ wurde die Membran mit Reinstwasser gewaschen.

3.7.6 Transkriptionsnachweis mit RT-PCR

Für die Isolation von RNA aus Pflanzengewebe wurden je Ansatz 150 mg junger, noch nicht vollständig entfalteter Blätter von Gewächshauspflanzen verwendet. Da das *vst1*-Gen, dessen Transkription nachgewiesen werden sollte, unter der Kontrolle seines eigenen, induzierbaren Promotors stand, wurden die Blätter auf Wasseragar ausgelegt und darauf für fünf Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden sie im Dunkeln bei 24°C für 20 Stunden inkubiert, so dass sich die Expression voll entfalten konnte. Dann wurden die Blattproben in flüssigem Stickstoff gefroren und in gekühlten sterilen Mörsern zu möglichst feinem Pulver zerrieben.

3.7.6.1 RNA-Isolation

Die Isolation wurde in 2-mL-Reaktionsgefäßen unter Verwendung des “Concert™ Plant RNA Reagent“ der Firma Invitrogen wie folgt durchgeführt:

- Zugabe von 500 µL kaltem Reagenz und Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten.
- Zentrifugation bei 10.000 x g für fünf Minuten. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt.
- Zugabe von nacheinander 100 µL NaCl-Lösung (5 M) und 300 µL Chloroform.
- Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C für zehn Minuten. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt.
- Nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C für zehn Minuten. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert.
- Das Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und dieses quantitativ wieder abgenommen.
- Die RNA wurde in 50 µL RNase-freiem Wasser gelöst, für 30 Sekunden bei 10.000 x g zentrifugiert und die RNA-Lösung in ein neues Gefäß überführt.

Ein DNase-Verdau war nicht notwendig, da das *vst*-Gen ein Intron trug, aufgrund dessen Amplifikate von DNA- und RNA-Templates anhand der Fragmentgröße unterscheidbar sind.

Ein Teil der Lösung wurde im Verhältnis 1:200 verdünnt und für die photometrische Konzentrationsbestimmung im Photometer bei $\lambda = 260$ nm eingesetzt.

3.7.6.2 Reverse Transkription und RT-PCR

Die reverse Transkription erfolgte mit fünf µg RNA wie nachfolgend beschrieben:

- Volumen der Probe mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl auffüllen.
- Zugabe von 1 µL Oligo-dT-Primer (100 pmol, 18er-mer) und Inkubation bei 70°C für zehn Minuten.
- Abkühlung auf Raumtemperatur und Zugabe von 4 µl des Puffers für die Reverse Transkriptase (5 x Puffer), 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl RNase Inhibitor.
- Nach Zugabe von 1 µL MMLV-RT, einer RNA abhängigen DNA-Polymerase aus dem *Moloney murine leukemia virus* erfolgte die Reverse Transkription bei 37°C für 70 Minuten.

Die erhaltene cDNA wurde unter den gleichen Bedingungen in die PCR eingesetzt, wie für genomische DNA beschrieben. Die zu erwartende Bande hat eine Größe von 255 bp im Gegensatz zu 611 bp beim Einsatz von Plasmid als Kontrolle oder DNA, da die cDNA aus mRNA synthetisiert wurde, der das Intron der DNA fehlt. Insofern ist der Größenunterschied zwischen den Banden der Proben und der Plasmid-Kontrolle gleichzeitig die Möglichkeit, DNA-Kontaminationen auszuschließen.

4 Ergebnisse

4.1 *in-vitro* Sprosskulturen

Von drei Rosenzüchtern waren Gewächshauspflanzen von sechs Genotypen zur Verfügung gestellt worden, die mit den Buchstaben `A` bis `F` bezeichnet worden sind. Von diesen wurden nach oberflächlicher Sterilisation *in-vitro* Sprosskulturen etabliert. Die Effizienz lag dabei im Durchschnitt bei etwa 40 %. Die Verluste kamen durch Kontaminationen und durch Verbräunung der Explantate zustande. Ein Zusammenhang zwischen dem Erfolg bei der Induktion von Sprosswachstum aus Blattachselknospen und Eigenschaften der Explantate wie Alter, Position an der Pflanze, Durchmesser des Zweiges oder der Grad seiner Verholzung war nicht festzustellen.

Das Wachstum der Sprosse aus den Achselknospen erfolgte gleichermaßen mit und ohne Licht. Allerdings waren die im Dunkeln gewachsenen Sprosse erwartungsgemäß länger und damit eher geeignet, abgeschnitten und dann separat im Licht weiter kultiviert zu werden. Daher wurde in der Folge dieser Bedingung der Vorzug gegeben.



Abbildung 3: Sprosswachstum *in-vitro* aus Blattachselknospen im Dunkeln



Abbildung 4: Sprosswachstum *in-vitro* aus Blattachselknospen im Licht

Nach Etablierung der Sprosskulturen können sie durch regelmäßige Subkultur in der Regel zeitlich unbegrenzt aufrechterhalten werden. Die dabei erzielte Multiplikationsrate der *in-vitro* Sprosse war sowohl von der BAP- als auch von der GA₃-Konzentration im Medium abhängig. Der Grad der Verzweigungen nahm mit steigender BAP- und sinkender GA₃-Konzentration zu. Die Größe der Blättchen nahm mit zunehmendem BAP-Gehalt des Mediums ab.

4.2 Spross-Organogenese an Blättern

Die Induktion von Adventivsprossen an verschiedenen Teilen der Blätter von Gewächshaus-Pflanzen war bei allen sechs Genotypen möglich. Je nach Genotyp verhielten sich die verschiedenen Arten von Explantaten unterschiedlich: Während bei Genotyp C nur der Blattgrund mit Sprossbildung reagierte und bei Genotyp A nur der basale Teil der Blattspreite, zeigten die übrigen vier Genotypen an mehreren Arten von Explantaten Regeneration. Am mittleren Segment der Blättchen und an der Spitze der Blattspreite wurden keine Sprosse gebildet.

Genotyp \ Explantat	Basis Fiederblättchen	Blattstil	Blattgrund
A	1,0%	--	--
B	2,3%	6,5%	42,9%
C	--	--	13,3%
D	1,5%	6,7%	5,0%
E	2,9%	4,2%	17,6%
F	4,1%	7,7%	10,5%

Tabelle 6: Induktion von Spross-Organogenese an Blattexplantaten

Die Ergebnisse basieren für die Genotypen B und E auf jeweils zwei Versuchen, bei den übrigen Sorten auf je einem. Die Anzahl der eingesetzten Explantate pro Versuch lag bei der Basis der Fiederblättchen zwischen 65 und 107, bei Blattstielen zwischen 15 und 80 und beim Blattgrund zwischen zehn und 20.

Im Durchschnitt lag die Regenerationsrate für die Basis der Blattspreite bei 2,2 %, für Blattstiele (Petiolen) bei 4,6 % und für Blattgrund-Explantate bei 17,4 %. An jedem regenerierenden Explantat entstand jeweils ein einzelner Spross.

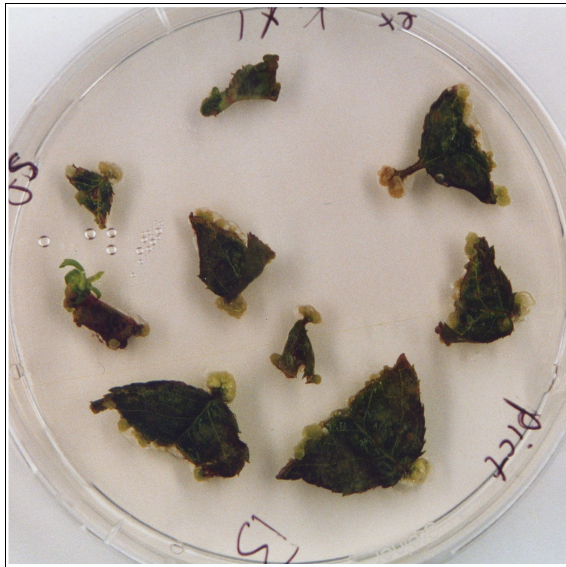


Abbildung 5: Spross-Organogenese an Blattspreite-Explantaten von Genotyp B

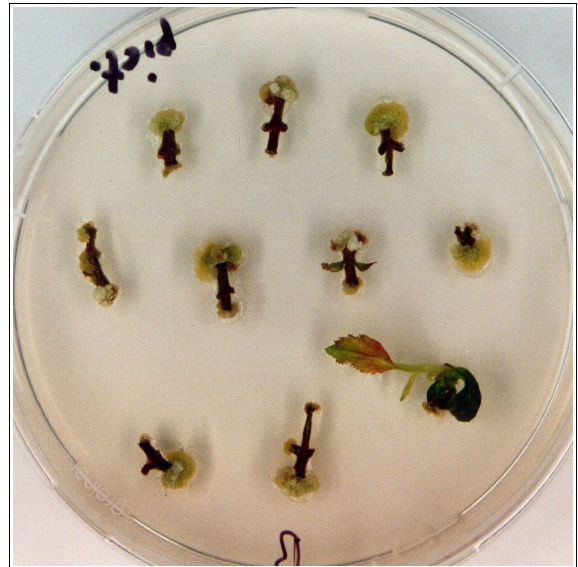


Abbildung 6: Spross-Organogenese an Blattstiel-Explantaten von Genotyp B

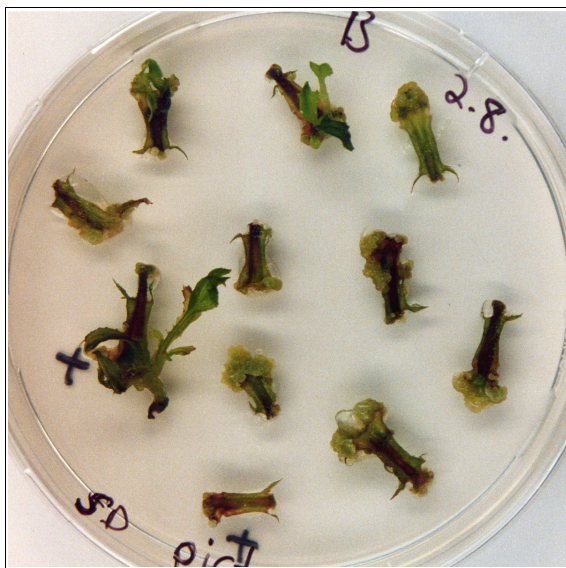


Abbildung 7: Spross-Organogenese an Blattgrund-Explantaten von Genotyp B



Abbildung 8: Detailsicht der Spross-Organogenese von Genotyp B

4.3 Transformation von Meristemen

Im Zuge der Transformation von Blattachselknospen mit dem GUS-Konstrukt wurden die Explantate mit Ultraschall behandelt, um Mikroverletzungen zu erzeugen und dadurch die Axialmeristeme für Agrobakterien besser zugänglich zu machen. Sechs Wochen nach der Co-Kultur war die Anzahl an Sprossen, die aus den Blattachselknospen ausgewachsen waren, deutlich größer, wenn sie nicht sonifiziert worden waren. Nach Beschallung brachten die Explantate weniger Sprosse hervor. Eine Korrelation zwischen der Abnahme der Sprossanzahl und einer gesteigerten Ultraschall-Intensität in Wattsekunden (Ws) ist nicht eindeutig festzustellen.

Genotyp	Ultraschall	Explantate		Sprosse	
		Art	eingesetzt	nach 5-6 Wochen	in %
C	ohne		108	100	92
	225 Ws	Sprossachsen	103	46	44
	450 Ws		111	34	30
	637,5 Ws		109	56	51
E	ohne		400	47	11
E	300 Ws	Sprosssegmente	420	21	5
	600 Ws		360	9	2
	H _z		ohne	250	277
H _z	150 Ws	Sprosssegmente	250	111	44
	300 Ws		250	75	30
	450 Ws		250	71	28
	600 Ws		250	61	24
PC	ohne		260	175	67
	300 Ws	Sprosssegmente	269	141	52
	600 Ws		280	104	37

Tabelle 7: Effekt von Ultraschall auf Sprosswachstum aus *in-vitro*-Blattachselknospen nach der Co-Kultur

Die Ergebnisse in obiger Tabelle basieren für Sorte C auf zwei Versuchen mit jeweils 35 bis 70 Sprossachsen pro Ansatz, mit den drei übrigen Sorten wurde jeweils ein Versuch durchgeführt.

Nach Transformationen mit dem Ziel der Übertragung des *gus*-Gens war bei zahlreichen Sprossen eine partielle Blaufärbung im GUS-Test zu sehen. Diese beschränkte sich jedoch im Wesentlichen auf die Wundflächen, an denen die Sprossachsen durch die Präparation verletzt worden waren, und die Ansatzstellen der Blätter. An einigen Explantaten konnte die Blaufärbung auch in Bereichen in der Epidermis und in einigen Blattachselknospen

beobachtet werden. Nach mehreren Subkulturen wurde keine GUS-Aktivität mehr in den Sprossen nachgewiesen.



Abbildung 9: Explantat ohne GUS-Expression

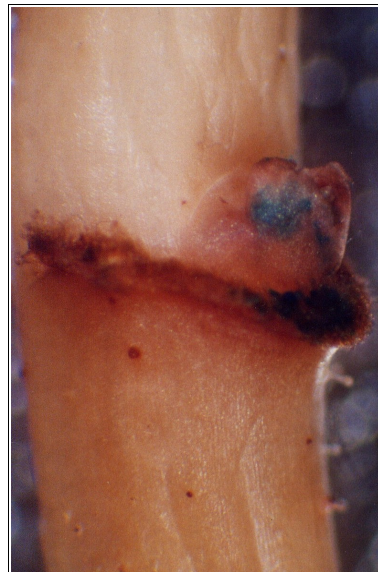


Abbildung 10: GUS-Expression in der Blattachselknospe



Abbildung 11: GUS-Expression in/unter der Epidermis

Wurden die nach der Transformation aus den Blattachselknospen gewachsenen Sprosse auf Selektions-Medium mit Glufosinat kultiviert, waren ein deutlich verlangsamtes Wachstum und die Ausbildung kleinerer Blätter im Vergleich zur unbehandelten Positivkontrolle zu verzeichnen.



Abbildung 12: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz nach Transformation unter Selektionsdruck von 1 mg/L Gf

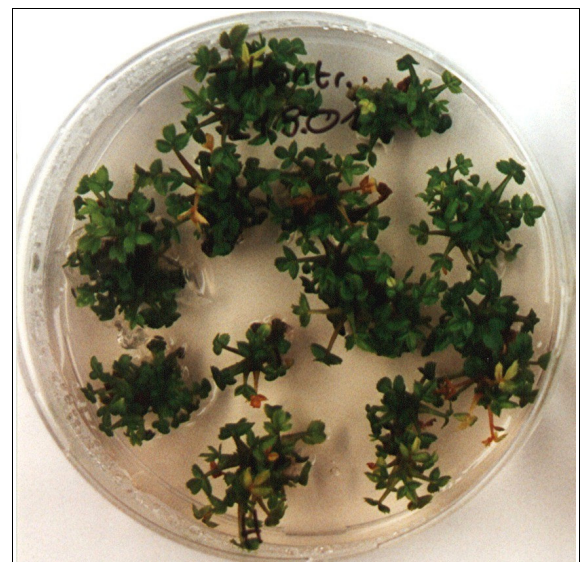


Abbildung 13: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz ohne Transformation, Ultraschall und Selektion (Positivkontrolle)

Die Ultraschall-Behandlung oder die Co-Kultur mit Agrobakterien alleine bewirkte diesen Effekt nicht, wie die entsprechenden Kontrollen zeigten.

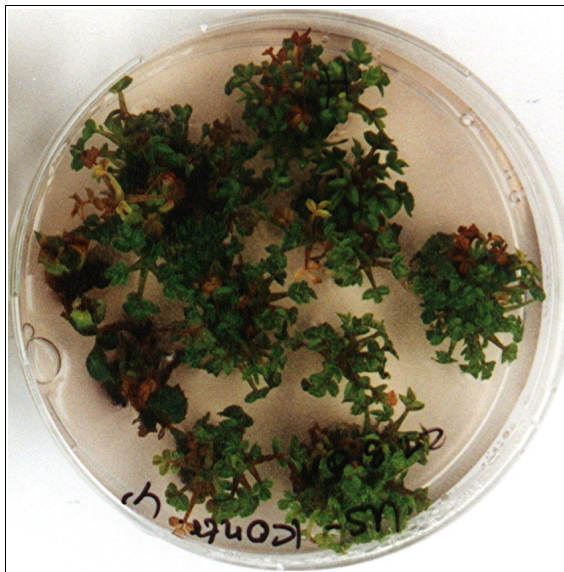


Abbildung 14: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz nach Ultraschall für vier Minuten ohne Selektion (Ultraschallkontrolle)

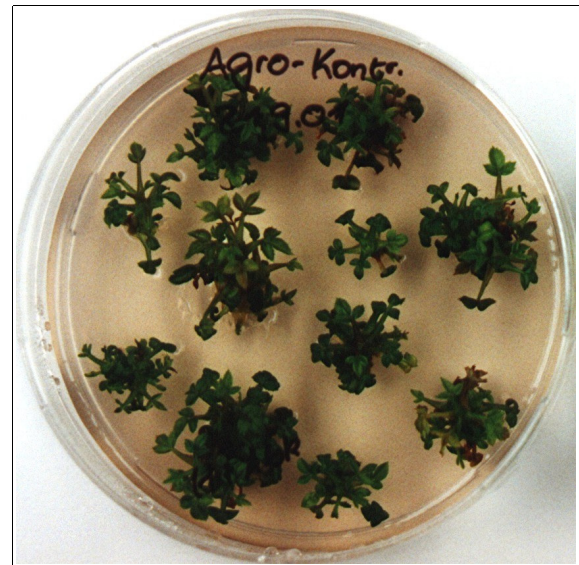


Abbildung 15: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz nach Transformation ohne Selektion (Agrobakterienkontrolle)

Die untransformierten Sprosse der Negativkontrolle starben unter Selektionsdruck ab.

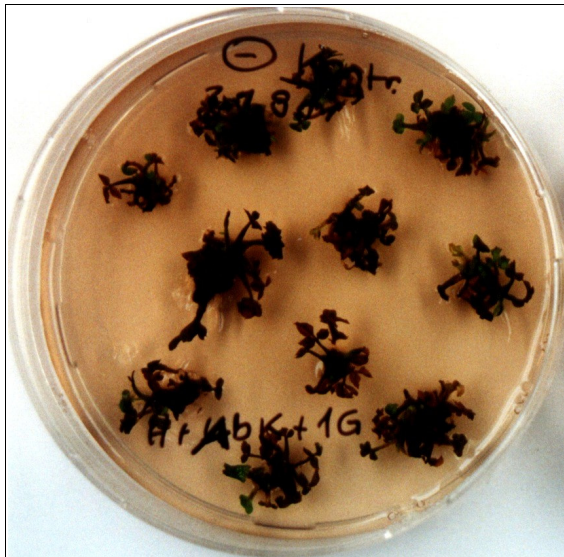


Abbildung 16: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz ohne Transformation und Ultraschall aber mit Selektion (Negativkontrolle)

Zusätzlich zum verlangsamten Wachstum war eine schrittweise Abnahme der Anzahl der Sprosse mit steigender Glufosinat-Konzentration zu verzeichnen. Nachdem eine Konzentration von 3 mg/L Glufosinat erreicht war, starben in den beiden folgenden Kulturphasen die letzten bisher noch übrigen Sprosse ab, obwohl zu der Zeit mit der Selektion ausgesetzt worden war.

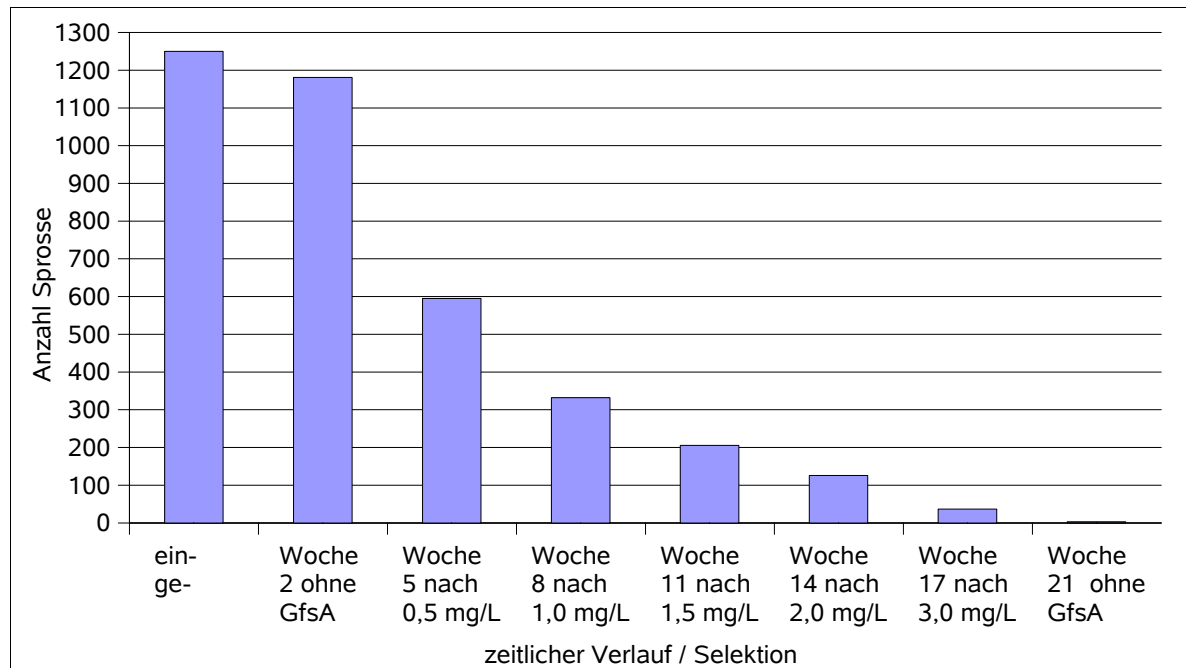


Abbildung 17: Entwicklung der Sprosse unter Selektion am Beispiel des Genotyps Hz

Es konnten mit dieser Methode keine transgenen Sprosse selektiert werden. Allerdings überlebten einige Sprosse nach Transformation länger auf Selektions-Medium, als die unbehandelten der Negativkontrolle.

4.4 Somatische Embryogenese

4.4.1 Induktion von embryogenem Kallus

Wenn als Explantate Blätter im Ganzen auf das Medium aufgelegt wurden und nur die Mittelrippe der Blättchen an drei Stellen durchtrennt war, wurde sowohl bei Genotyp PC als auch bei Hz keine Induktion organisierter Strukturen erreicht. Waren die Blättchen hingegen vom Blattstiel getrennt und jeweils in drei Segmente geteilt worden, wurden an einigen organisierte Strukturen gebildet. Bei Genotyp D handelte es sich dabei ausschließlich um embryogenen Kallus.

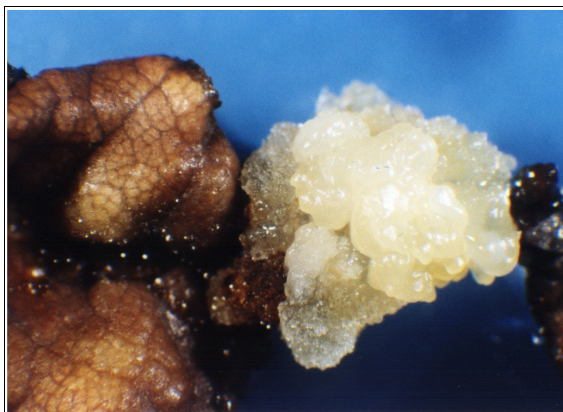


Abbildung 18: Embryogener Kallus an Blattexplantat von Genotyp D

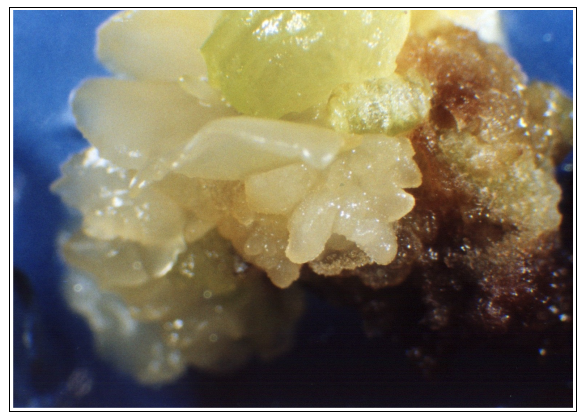


Abbildung 19: Somatische Embryonen an Blattexplantat von Genotyp D

Bei Genotyp P entwickelte sich an den Segmenten einiger Blätter nicht nur embryogener Kallus, sondern an anderen auch Adventivsprosse. An einigen Blättern waren beide Strukturen zu beobachten (bis 12,5 %).

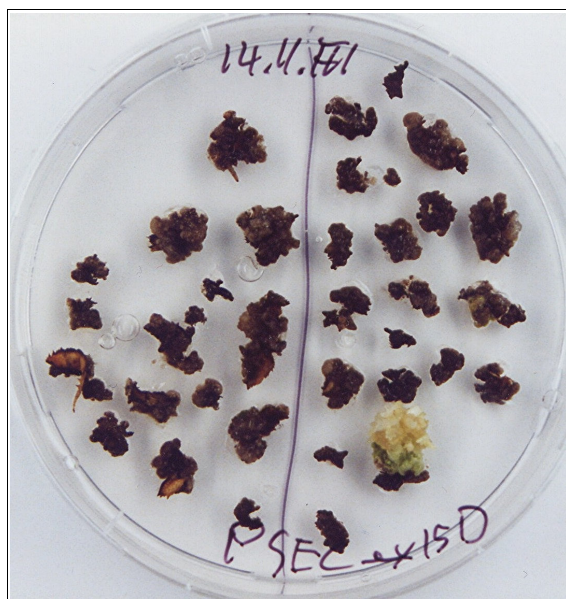


Abbildung 20: Somatische Embryogenese an Blattexplantaten von Genotyp PC



Abbildung 21: Spross-Organogenese an Blattexplantaten von Genotyp PC

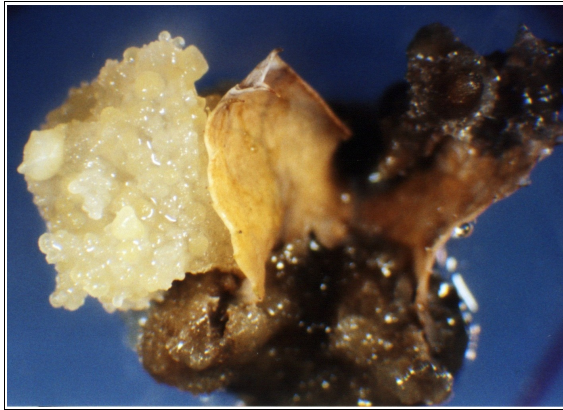


Abbildung 22: Embryogener Kallus an Blattexplantat von Genotyp PC

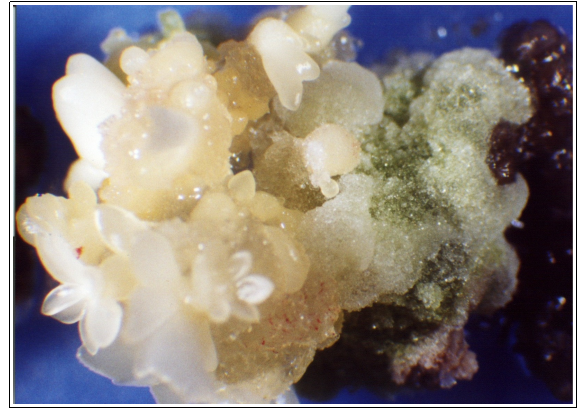


Abbildung 23: Somatische Embryonen von Genotyp PC

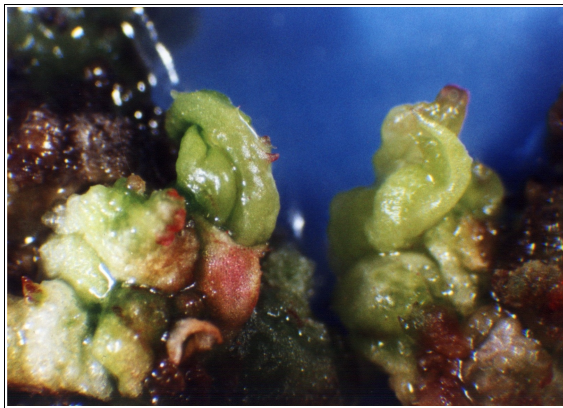


Abbildung 24: Sprossprimordien an Blattexplantat von Genotyp PC

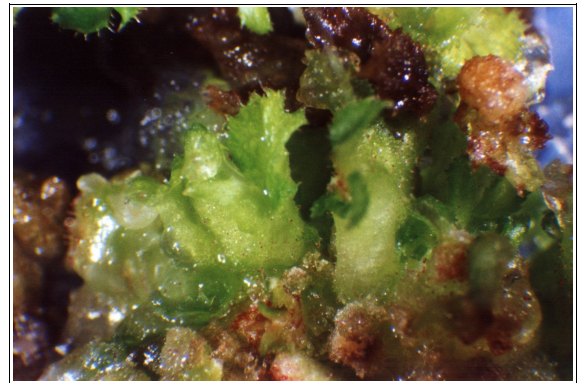


Abbildung 25: sich entwickelnde Adventivspresse an Blattexplantat von Genotyp PC

Beide Regenerationswege traten bei allen vier eingesetzten 2,4-D-Konzentrationen auf. Eine Korrelation zwischen der Hormonkonzentration und der Regenerationsrate oder der Art der Entwicklung ist nicht zu erkennen.

Genotyp	Präparation der Blätter	2,4-D in μM (für vier Wochen)	Anzahl Blätter			
			gesamt	mit embryogenem Kallus	mit Adventivsprossen	mit beidem
PC	Mittelrippe durchtrennt	5	40	--	--	--
		10	40	--	--	--
		15	40	--	--	--
		50	40	--	--	--
	Blättchen segmentiert	5	40	3	5	1
		10	32	5	2	2
		15	38	2	10	0
		50	40	5	10	5
Hz	Mittelrippe durchtrennt	5	44	--	--	--
		10	44	--	--	--
		15	44	--	--	--
		50	44	--	--	--
D	Blättchen segmentiert	5	38	5	--	--
		10	36	1	--	--

Tabelle 8: Gewebereaktion nach verschiedener Präparation und 2,4-D-Konzentration

Bei sieben der acht verwendeten Genotypen ließ sich somatische Embryogenese induzieren (siehe auf den folgenden beiden Seiten).

Die Effizienz der Induktion lag je nach verwendeter Hormonkombination bei den Genotypen D, E und Hz bei 4%, bei C bei maximal 16,6 % und erreichte bei A bis zu 37,5 %. In einigen Fällen wurde nur an einem Blättchen aus einer Hormonkombination embryogener Kallus gebildet. Allerdings unterschieden sich die Genotypen in ihrer Reaktion auf die unterschiedlichen Behandlungen:

- Bei Genotyp F ließ sich keine Regeneration induzieren, weder über somatische Embryogenese noch über Spross-Organogenese.
- Einige Genotypen sprachen nur auf einzelne Kombinationen der Phytohormonkonzentrationen an (B und Hz auf zwei, D auf vier)
- Die Genotypen A, C und PC reagierten auf ein breites Spektrum von Konzentrationskombinationen.

Allen respondierenden Genotypen gemeinsam war, dass die Verwendung von Zeatin zu mehr SEG führte als der Einsatz von TDZ.

Von jedem Genotyp wurden 24 Blättchen á drei Segmente in 18 verschiedene Hormonbehandlungen, also insgesamt 1296 Explantate pro Genotyp eingesetzt.

Genotyp	Konzentrationen		Fiederblättchen		Konzentrationen		Fiederblättchen	
	2,4-D ¹ in μM	Zeatin ² in μM	gesamt	mit embry- genem Kallus	2,4-D ¹ in μM	TDZ ² in μM	gesamt	mit embry- genem Kallus
A	5	10	24	5	5	10	24	-
		15	24	3		15	24	1
		20	24	9		20	24	1
		10	24	2		10	24	1
	10	15	24	1	10	15	24	-
		20	24	4		20	24	-
		10	24	2		10	24	-
		15	24	-		15	24	-
B	5	10	24	-	5	10	24	-
		15	24	-		15	24	-
		20	24	3		20	24	-
		10	24	-		10	24	1
	10	15	24	-	10	15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	-		10	24	-
		15	24	-		15	24	-
C	5	10	24	1	5	10	24	1
		15	24	3		15	24	1
		20	24	2		20	24	1
		10	24	-		10	24	1
	10	15	24	4	10	15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	2		10	24	2
		15	24	1		15	24	-
D	5	10	24	1	5	10	24	1
		15	24	-		15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	-		10	24	-
	10	15	24	1	10	15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	-		10	24	-
		15	24	-		15	24	-

Tabelle 9: Reaktion der Genotypen A, B, C, D auf verschiedene Hormonkonzentrationen

Genotyp	Konzentrationen		Fiederblättchen		Konzentrationen		Fiederblättchen	
	2,4-D ¹ in µM	Zeatin ² in µM	gesamt	mit embryo- genem Kallus	2,4-D ¹ in µM	TDZ ² in µM	gesamt	mit embryo- genem Kallus
E	5	10	24	1	5	10	24	-
		15	24	1		15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	1		10	24	-
	10	15	24	-	10	15	24	-
		20	24	-		20	24	1
		10	24	-		10	24	-
		15	24	1		15	24	-
F	5	10	24	-	5	10	24	-
		15	24	-		15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	-		10	24	-
	10	15	24	-	10	15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	-		10	24	-
		15	24	-		15	24	-
Hzb	5	10	24	-	5	10	24	-
		15	24	1		15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	-		10	24	-
	10	15	24	-	10	15	24	-
		20	24	-		20	24	-
		10	24	-		10	24	-
		15	24	-		15	24	-
PC	5	10	24	1	5	10	24	2
		15	24	-		15	24	3
		20	24	3		20	24	-
		10	24	1		10	24	-
	10	15	24	1	10	15	24	-
		20	24	2		20	24	-
		10	24	-		10	24	1
		15	24	-		15	24	1

Tabelle 10: Reaktion der Genotypen E, F, Hz, PC auf verschiedene Hormonkonzentrationen

4.4.2 Proliferation von embryogenem Kallus und Produktion somatischer Embryonen

Innerhalb von vier Wochen nach dem Umsetzen von embryogenem Kallus auf neues Medium bildeten sich in den Petrischalen drei verschiedene Strukturen:

1. eine festes aber bröckeliges Gemisch in cremeweiß / hellgelb / hellbeige aus Proembryonen und SE verschiedener Entwicklungsstadien.

Die Embryonen waren zum Teil ungewöhnlich gestaltet, wie oft bei SEG beschrieben. Einige besaßen nur ein Keimblatt oder mehr als zwei Kotyledonen oder diese waren zu einer becherförmigen Struktur verwachsen.



Abbildung 26: Proliferierender embryogener Kallus von Genotyp Heckenzauber



Abbildung 28: Cluster somatischer Embryonen



Abbildung 27: Zwei SE, vorne links mit verwachsenen Kotyledonen

2. grüner fester, z. T. globulärerer Kallus.

An diesem wuchsen gelegentlich Strukturen von Embryonen, diese waren aber nie vollständig, sondern an der Stelle, an der sich der Wurzelpol hätte befinden sollen, mit dem Kallusgewebe fest verwachsen. Teilweise handelte es sich auch nur um einzelne Kotyledonen-artige Strukturen.

3. eine weiche bis matschige, strukturlose Zellmasse in weiß oder verschiedenen Abstufungen von braun. Diese Zellen brachten keine SE hervor und zeigten auch sonst keine organisierten Strukturen.

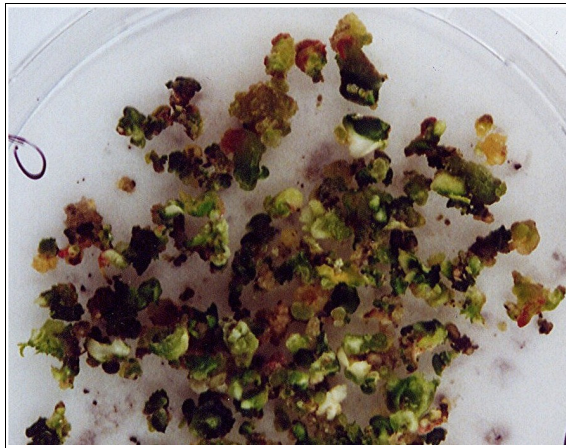


Abbildung 30: aus embryogenem Kallus entstandene grüne harte Strukturen



Abbildung 29: aus embryogenem Kallus entstandene überwiegend weiche strukturlose Kallusmasse

Der Anteil an den beiden zuletzt genannten Gewebetypen nahm im Verlauf mehrerer Subkulturen trotz der Selektion auf embryogene Strukturen immer weiter zu, bis die Kalluslinie ihren embryogenen Charakter verloren hatte. Eine dauerhafte Kultur von embryogenem Kallus und die permanente Produktion von SE waren damit bei allen untersuchten Genotypen nicht möglich.

4.5 Transformation somatischer Embryonen

Für die Transformation wurden somatische Embryonen der Genotypen Hz und PC eingesetzt, da von diesen ausreichend Material zur Verfügung stand. Alle nach Co-Kultur regenerierten Pflanzen stammen aus einem großen Transformationsansatz mit 700 SE der Sorte Hz, deren Entwicklung im Folgenden dargestellt ist.

4.5.1 Regeneration und Selektion von Kallus

Nach Beendigung der Co-Kultur entwickelten sich die somatischen Embryonen auf Regenerations-Medium zunächst zu festen grünen Kallusstrukturen. Innerhalb der ersten 15 Wochen, in denen der Selektionsdruck schrittweise bis zu einer Glufosinat-Konzentration von 10 mg/L gesteigert wurde, zeigten die Kalli unterschiedlich starke Nekrosen und viele starben ab. Die überlebenden Kalli wuchsen weiter und zerfielen entweder durch das Entfernen der nekrotischen Teile in mehrere Stücke oder wurden zerteilt, wenn sie für das Kulturgefäß zu groß geworden waren. Die Kalluslinien, zu denen sich die Explantate entwickelten, unterschieden sich sowohl im Volumen des gebildeten Gewebes als auch in der Anzahl der entstandenen Teile. Vier Monate nach der Co-Kultur war noch Kallus von 17 % der ursprünglichen Explantate vorhanden. In dieser Phase der Regeneration zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen (drei Ultraschallzeiten und zwei Selektionsschemata):

Selektion	Ultraschall- dauer in Min.	Anzahl Explantate bei Co-Kultur	Anzahl Kalluslinien			
			nach 18 Tagen		nach 15 Wochen	
			absolut	in %	absolut	in %
direkt ab Co-Kultur	0	120	22	18,3	15	12,5
	2	120	26	21,7	16	13,3
	4	110	29	26,4	14	12,7
	gesamt	350	77	22,0	45	12,9
ab der 3. Woche nach Co- Kultur	0	120	53 *	44,2	19	15,8
	2	120	30 *	25,0	28	23,3
	4	110	37 *	33,6	28	25,5
	gesamt	350	120	34,3	75	21,4

Tabelle 11: Kallusentwicklung unter Selektionsdruck

* bis zu diesem Zeitpunkt ohne Selektion

- bei Selektion direkt ab Co-Kultur ist nach knapp drei Wochen nur noch von etwa 20 % der Explantate Kallus übrig, während ohne Selektionsdruck ein Drittel überlebt hat.
- Nach 15 Wochen hat sich die Zahl der Explantate, die sofort selektiert wurden, auf fast ein Achtel reduziert, während bei späterer Selektion noch mehr als 20 % vorhanden sind. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit für diesen Verlauf liegt bei $p < 0,06$.

- Innerhalb der Gruppe der sofort selektierten Explantate gibt es zu beiden Zeitpunkten nur geringe Unterschiede zwischen den drei Behandlungszeiten mit Ultraschall.
- In der Gruppe der später selektierten Explantate haben in den ersten drei Wochen ohne Beschallung fast 45% überlebt, während der Anteil nach Sonifizierung mit 25 % und 33 % geringer ausfällt. Nach 15 Wochen hat sich das Bild umgekehrt: Ohne Ultraschall überlebten nur knapp 16 % der Explantate, während mit Beschallung noch bis zu einem Viertel übrig war.

4.5.2 Regeneration und Selektion von Sprossen

Während der folgenden acht bis 18 Monate Kultur auf Regenerationsmedium unter Selektionsdruck starben weiterhin Kalluslinien ganz oder teilweise ab, während sich aus den vitalen Bereichen organisierte Strukturen entwickelten. Diese sprossähnlichen Strukturen bildeten sich an 19 (2,7%) Kalluslinien. An elf von diesen (1,6%) differenzierten sie sich zu Sprossen, die von der Unterlage abgetrennt und separat weiter kultiviert werden konnten. Das war bei 7 Linien erfolgreich (1 % der eingesetzten Explantate).

Selektion	Ultraschall- dauer in Min.	Anzahl Explantate bei Co-Kultur	Anzahl Kalluslinien mit		
			organisierten Strukturen	differenzierten Sprossen	etablierten Sprosslinien
direkt ab Co-Kultur	0	120	1	0	0
	2	120	5	1	0
	4	110	6	5	3
ab der 3. Woche nach Co-Kultur	0	120	0	0	0
	2	120	7	5	4
	4	110	0	0	0
gesamt		700	19	11	7

Tabelle 12: Sprossdifferenzierung unter Selektionsdruck

Die regenerierten Sprosse stammten aus drei der sechs Versuchsansätze (drei Ultraschallzeiten und zwei Selektionsweisen):

- Ohne Ultraschallbehandlung konnten aus keinem Explantat Kallus und daraus transgene Sprosse gewonnen werden.
- Sowohl zwischen den Beschallungszeiten von 2 und 4 Minuten als auch zwischen den beiden zeitversetzten Selektionsschemata war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von Kalluslinien festzustellen, aus denen Sprosse regeneriert werden konnten.

4.5.3 Etablierung PPT-resistenter Sprosslinien

Die Anzahl der gebildeten Sprosse variierte zwischen den Kalluslinien und lag zwischen drei Regeneraten von Explantat zwei und über 100 von Kalluslinie 18. Im Durchschnitt gingen aus einer Kalluslinie 46 Sprosse hervor. Allerdings konnten nicht alle vom Kallus getrennten Sprosse auch separat auf Sprosskultur-Medium unter Selektionsdruck von 10 mg/L

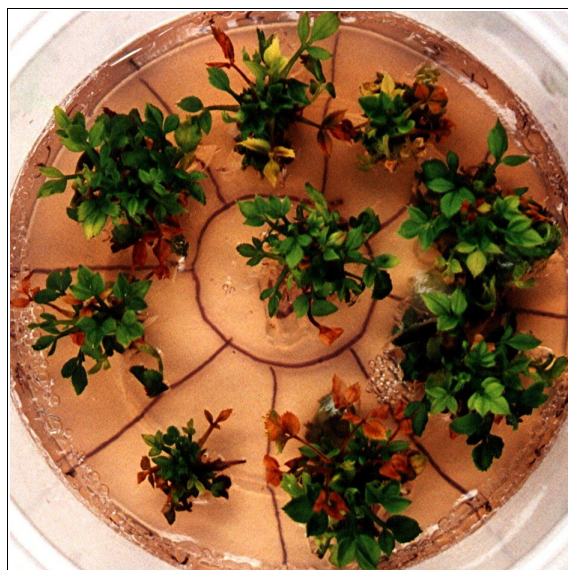


Abbildung 31: Sprosse mit z. T. abgestorbenen Blättern auf Medium mit 40 mg/L Gfs

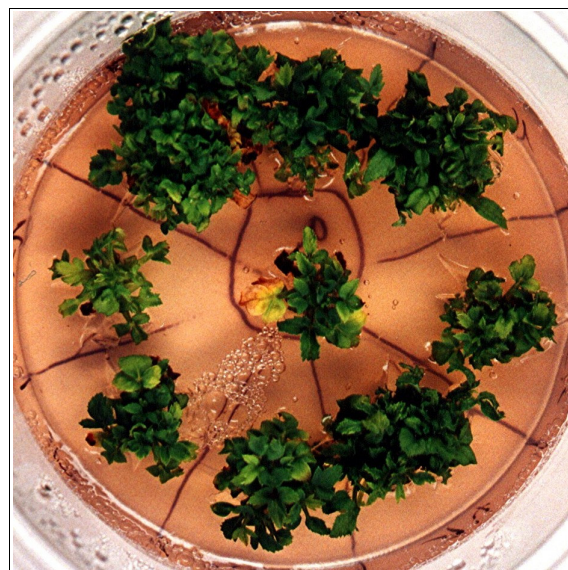


Abbildung 32: im Ganzen vitale Sprosse auf Medium mit 40 mg/L Gfs

Glufosinat weiter kultiviert werden. Zwischen 14 und 45 Sprosslinien wurden von den sieben Kalluslinien etabliert, das sind rund 36 % der ursprünglich gewonnenen Sprosse.

Auch wenn ein Spross vermehrt wurde und als Linie etabliert war, kam es bei einigen wiederholt zum Absterben von Blättern aus bestimmten Bereichen der Sprossbüschel.

Selektion	Ultraschall-dauer in Min.	Kalluslinien	separierte Sprosse	etablierte Sprosslinien	in %
direkt ab Co-Kultur	0	0	--	--	--
	2	8	6	(5)*	--
		9	56	14	25
	4	12	4	(4)*	
		16	88	25	28
		18	125	45	36
	gesamt	273	84	30	
ab der 3. Woche nach Co-Kultur	0	0	--	--	--
	2	2	3	0	0
		3	7	0	0
		13	69	24	34
		14	19	19	100
		17	87	18	20
		19	49	36	73
		gesamt	234	97	41
4	0	--	--	--	

Tabelle 13: Etablierung von Sprosslinien nach Transformation unter Selektionsdruck

* Verlust durch Kontamination

Als Negativkontrolle wurden Sprosse aus der *in-vitro*-Kultur auf Medium mit 3 mg/L Glufosinat kultiviert. Nach drei Wochen waren sie alle verbräunt und abgestorben.

4.5.4 Bewurzelung PPT-resistenter Sprosse

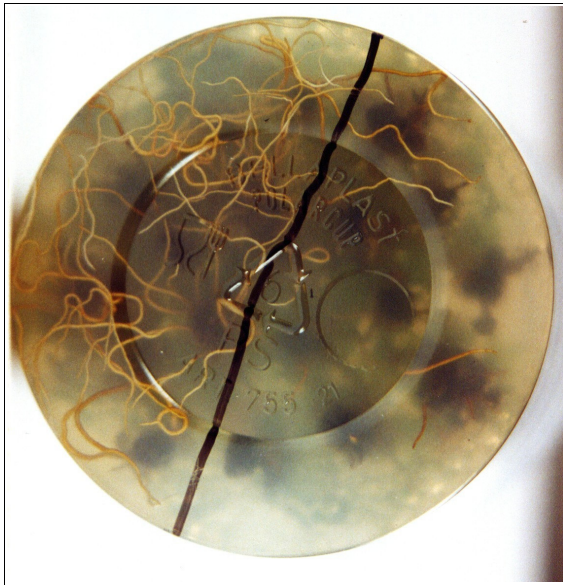


Abbildung 33: selektierte Sprosse mit guter (links) und schwacher (rechts) Wurzelbildung

Die von sieben Kalluslinien erhaltenen Sprosse wurden durch Mikropropagation vermehrt, so dass überzählige Sprosse der verschiedenen Linien zur Bewurzelung eingesetzt werden konnten. Im Durchschnitt war die Bewurzelung in 60 % der Fälle erfolgreich. Allerdings variierte die Effizienz deutlich zwischen den Kalluslinien: Während von Nr. 19 mehr als 80 % der Sprosse bewurzelt, war das bei Kalluslinie 14 nur in 15 % der Fälle. Aber auch zwischen den Sprosslinien zeigten sich Unterschiede in der Bewurzelung: Die Sprosse einzelner Linien bildeten gar keine Wurzeln und bei anderen war nur ein bestimmter Teil der Sprosse einer Linie bewurzelungsfähig. Auch ohne Wurzelbildung blieben die meisten Sprosse im Gegensatz zur Negativkontrolle grün und vital.

Bei der Positivkontrolle hingegen, d.h. bei nicht transformierten Sprossen ohne Selektion, lag die Wurzelbildung bei nahezu 100 %.



Abbildung 34: nicht transgene Sprosse auf Bewurzelungsmedium ohne Selektion (Positivkontrolle)



Abbildung 35: nicht transgene Sprosse auf Bewurzelungsmedium mit Selektion (Negativkontrolle)

Die nicht transformierten Sprosse der Negativkontrolle bildeten unter Selektionsdruck keine Wurzeln, verbräunten und starben innerhalb von drei Wochen ab.

Kalluslinie	Anzahl einzelner Sprosse		
	eingesetzt	bewurzelt	in %
9	74	56	75
13	277	171	61
14	172	25	14
16	195	138	70
17	165	61	36
18	73	51	69
19	207	169	81
gesamt	1163	671	57
+ Kontrolle	50	48	96
- Kontrolle	49	0	0

Tabelle 14: Bewurzelung selektierter Sprosse

4.5.5 Akklimatisierung

Von den Linien, von denen potenziell transgene Sprosse bewurzelt werden konnten, sind Pflanzen im Gewächshaus etabliert worden, auch wenn nicht alle *in-vitro* bewurzelten Pflänzchen abgehärtet werden konnten.

Abbildung 36: frisch getopfte Pflänzchen aus *in-vitro* Kultur

Abbildung 37: akklimatisierte junge Pflanze im Gewächshaus

Die Pflanzen von Kalluslinie 14 konnten zwar zum Teil an die Bedingungen im Gewächshaus adaptiert werden, zeigten aber im Gegensatz zu allen anderen ein stark eingeschränktes Wachstum, blieben sehr klein und sind eingegangen, bevor Proben für molekulare Analysen genommen worden waren.

4.5.6 Test auf Herbizidtoleranz an Pflanzen im Gewächshaus

4.5.6.1 "leaf paint"-Assay mit Basta®

Vier Wochen, nachdem die Fiederblättchen mit der Basta®-Lösung behandelt worden waren, zeigte sich an einigen Pflanzen ein eindeutiges Ergebnis in Form von abgestorbenen oder unverändert vitalen Blättchen, unabhängig von der verwendeten Konzentration. Bei manchen



Abbildung 38: "leaf paint", Wasserkontrolle



Abbildung 39: "leaf paint", Blättchen mit leichten Symptomen nach Behandlung mit 600 mg/L Glufosinat

Pflanzen gab es Blättchen mit Symptomen, die nicht so deutlich wie bei der Negativkontrolle ausgeprägt waren. Sie konnten daher zwar nicht als resistent, aber auch nicht als in vollem Maße sensitiv klassifiziert werden.



Abbildung 40: "leaf paint", Negativkontrolle nach Behandlung mit 600 mg/L Glufosinat



Abbildung 41: "leaf paint", resistentes Blättchen nach Behandlung mit 600 mg/L Glufosinat

Sowohl die eindeutigen als auch die nicht eindeutigen Ergebnisse traten mitunter an einer Pflanze auf und waren zum Teil einzelnen Zweigen zuzuordnen, wie z.B. bei Pflanze 17-23.

Pflanze	an Anzahl Zweigen	Anzahl Blättchen *			
		gesamt	vital	abgestorben	nicht eindeutig
16 – 02	3	15	15	--	--
16 – 03	3	15	15	--	--
16 – 10	3	10	10	--	--
		5	2	--	3
16 – 12	3	10	10	--	--
		5	3	--	2
16 – 21	3	15	15	--	--
17 – 02 a	3	15	--	--	15
17 – 20 a	3	5	5	--	--
		10	--	--	10
17 – 23	3	5	5	--	--
		5	--	5	--
		5	--	--	5
17 – 38	3	15	15	--	--
19 – 33 a	5	23	8	11	4
19 – 37 b	2	12	12	--	--
19 – 41 a	2	12	--	12	--
19 – 42	3	15	--	2	13
19 – 45	3	15	7	--	8
19 – 48 a	3	15	9	--	6

Tabelle 15: "leaf paint" mit 1 g/L Basta® nach 4 Wochen

* je ein Fiederblättchen pro Blatt

4.5.6.2 Spritzung ganzer Pflanzen mit Basta®

Um die Stichprobengröße an behandelten Blättern nach den wenig eindeutigen Ergebnissen der "leaf paint"-Assays sowohl insgesamt als auch pro Pflanze zu erhöhen, wurden 48 Pflanzen komplett mit Basta® gespritzt. Sie reagierten sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit dem Herbizid. Drei von ihnen ließen keine Toleranz erkennen und starben ab. Die übrigen 45 zeigten verschieden starke Schäden: Einige verloren einen großen Teil ihrer Blätter oder es starben einzelne Zweige ab. Bei anderen beschränkte sich der Verlust auf wenige Blätter, manchmal sogar nur auf einzelne Blättchen von Fiederblättern. Ein Zusammenhang zwischen dem betroffenen Gewebe und einer gemeinsamen Eigenschaft wie Alter oder Blattstellung war nicht herzustellen. Nach kurzer Zeit war bei den 45 überlebenden Pflanzen ein erneuter Austrieb zu beobachten, sowohl an den Zweigspitzen als auch aus den Blattachselknospen, sofern die Sprossachse vital geblieben war.



Abbildung 42: nicht transgene Pflanze ist nach Spritzung mit Basta® vollständig abgestorben (Negativkontrolle)



Abbildung 43: potenziell transgene Pflanze nach Spritzung mit Basta® mit schweren Symptomen und Neuaustrieb (Pfeile)



Abbildung 44: potenziell transgene Pflanze nach Spritzung mit Basta® mit leichten Symptomen



Abbildung 45: chimäres Blatt mit zwei unterschiedlich stark geschädigten Fiedern (Pfeile) nach Spritzung mit Basta®

4.6 Erzeugung einer Nachkommenschaft aus der T₀ von Genotyp Hz

4.6.1 Selbstung

von Kalluslinie	Anzahl Pflanzen	Anzahl Blüten	
		geselbstet	mit Früchten
9 –	1	1	0
13 –	3	3	0
16 –	3	4	0
16 –	2	3	3
17 –	3	3	0
18 –	14	18	0
18 –	8	17	12
19 –	34	71	0
19 –	1	5	1
gesamt	69	125	16
Kontrollen	3	7	3

Tabelle 16: Fruchtansatz nach Selbstung, Genotyp Hz

An elf der transgenen Pflanzen führte die Bestäubung zum Fruchtansatz, so dass 16 Hagebutten geerntet werden konnten. Daraus wurden insgesamt 147 Achänen gewonnen. Ihre Anzahl pro Hagebutte variiert zwischen vier bei Pflanze 18-02 und jeweils 14 bei vier anderen Pflanzen. Die Samenzahl lag im Durchschnitt bei 10,9 pro Blüte. An untransformierten Kontrollpflanzen reiften drei Hagebutten heran, die insgesamt 13 Achänen enthielten.

4.6.2 Keimung und Wachstum der T₁-Pflanzen

Die Samen verschiedener Pflanzen unterschieden sich deutlich in ihrer Keimfähigkeit.



Abbildung 46: Keimling der T₁



Abbildung 47: junges Pflänzchen der T₁

Von Pflanze 18-126 ist keiner der sechs Samen gekeimt und von Pflanze 18-135 nur einer von 14 Achänen. Andererseits keimten alle vier Samen von Pflanze 18-04. Im Durchschnitt lag die Keimrate bei einem Drittel. Außerdem war die Zeit, die bis zur Keimung verging, sehr unterschiedlich und betrug zwischen einigen Wochen und mehreren Monaten.

Von den 13 Samen der untransformierten Kontrollpflanzen waren 6 gekeimt.

Nummer		Anzahl	
der Kalluslinie	der Sprosslinie	der Samen	der Keimlinge
16	- 10	19	7
	- 21	5	1
18	- 01	10	4
	- 02	4	4
	- 04	43	13
	- 14	14	6
	- 15	14	6
	- 19	14	5
	- 126	6	0
- 135	14	1	
19	- 09	4	2
T ₁ gesamt		147	49
Kontrolle		13	6

Tabelle 17: Keimung der T₁

Die F₁-Pflanzen unterschieden sich sowohl im Aussehen als auch in ihrem Wuchsverhalten. Einige starben schon kurz nach der Keimung ab, manche blieben relativ klein und zeigten eine Art Zwergen-Phänotyp und auch die Wachstumsgeschwindigkeit gleichzeitig gekeimter Pflanzen unterschied sich. Leichte Unterschiede waren in Form und Farbintensität der Laubblätter zu erkennen. Am größten waren jedoch die Unterschiede zwischen den Blüten:

Am auffälligsten variierte die Nachkommenschaft in Farbe und Gestalt der Blüten. Es waren Blüten sowohl mit einem einfachen Kranz Kelchblätter (Petalen) entstanden, als

auch unterschiedlich stark gefüllte. Die Farbe war entweder weiß oder rosa in verschiedenen Abstufungen von Helligkeit und Intensität. Einige tendierten auch ins gelbe oder orange. Dabei überwog die Anzahl an gefüllten und an rosafarbenen Blüten. In der Gruppe der nicht transgenen Nachkommen traten intensivere und dunklere Rottöne auf als bei den transgenen.



Abbildung 48: Blütenknospe von nicht transgener Pflanze, Genotyp Hz

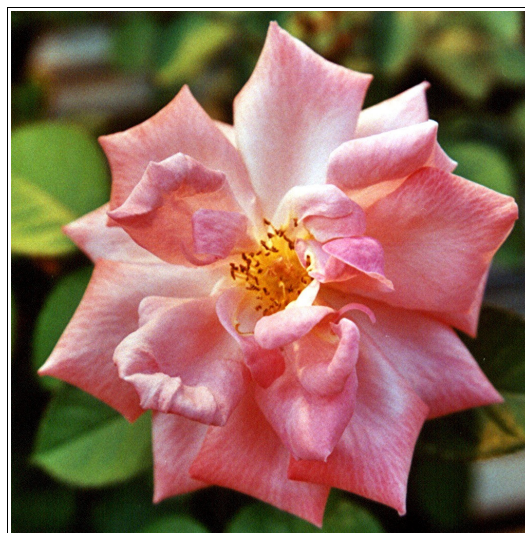


Abbildung 49: voll geöffnete Blüte von nicht transgener Pflanze, Genotyp Hz

Die Abbildungen auf der folgenden Seite zeigen beispielhaft Blüten von transgenen (die oberen sechs) und nicht transgenen Nachkommen (die unteren sechs).



Abbildung 50: 18-01 (10) II



Abbildung 51: 18-04 (07) I

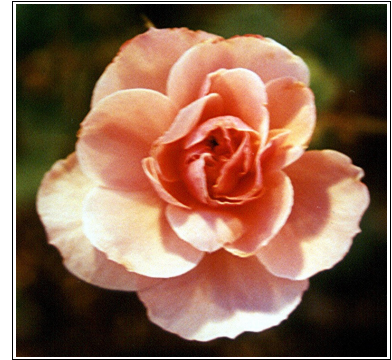


Abbildung 52: 18-04 (10) I



Abbildung 53: 18-14 (14) I



Abbildung 54: 18-14 (14) IV

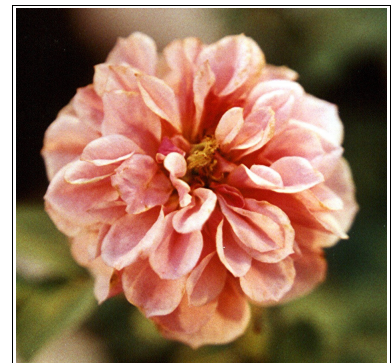


Abbildung 55: 18-19 (14) I

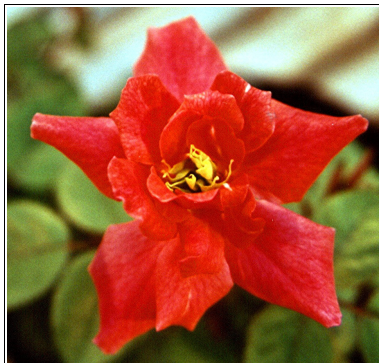


Abbildung 56: 18-14 (14) V



Abbildung 57: 18-15 (09) II

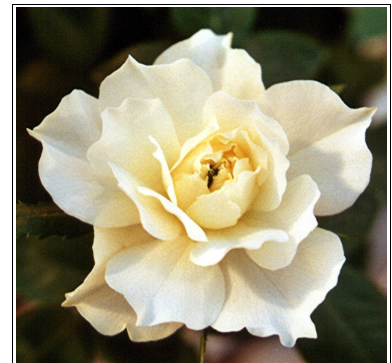


Abbildung 58: 18-15 (09) IV



Abbildung 59: 18-19 (14) VI

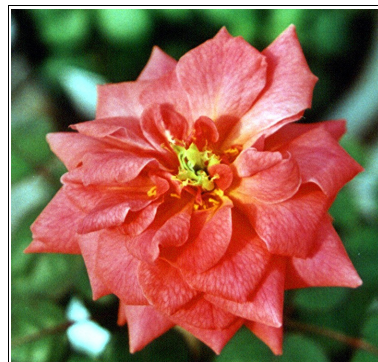


Abbildung 60: K 02 (04) II

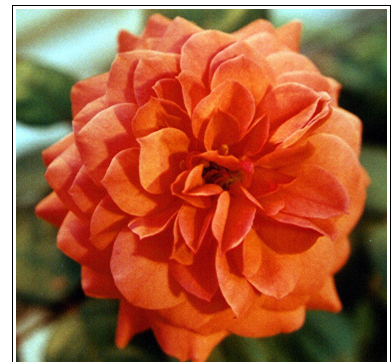


Abbildung 61: K 02 (06) I

4.7 Molekulare Analysen

4.7.1 PCR

Sowohl die regenerierten Pflanzen (T_0) als auch ihre Nachkommen (T_1) sind mittels PCR charakterisiert worden. Sie wurden auf die Integration der T-DNA und von "backbone"-Sequenzen sowie auf persistierende Agrobakterien untersucht. Die PCR-Analysen wurden mir ein bis drei unabhängigen Proben je Pflanze durchgeführt.

4.7.1.1 Gene der T-DNA

Von den regenerierten Pflanzen (T_0) sind 86 mittels *vst*-PCR als transgen charakterisiert worden. Bei 51 Pflanzen wurde dieses Ergebnis durch *bar*-PCRs bestätigt.

Mit sechs einzelnen Proben waren die PCRs mit *vst*-Primern negativ. Für Pflanze 17-04 bestätigte sich das Ergebnis im Southern Blot mit zwei weiteren unabhängigen Proben (siehe dort).

In der T_1 Generation sind 42 Pflanzen mittels PCR darauf untersucht worden, ob sie transgene Sequenzen geerbt haben oder nicht. Von diesen waren 17 negativ und 25 positiv (= transgen). Damit hatten knapp 60 % der Nachkommen mindestens einen transgenen Locus geerbt. Die transgenen T_1 waren in ungleicher Weise auf die Eltern verteilt: Während von 16-10 und 18-04 alle sechs bzw. acht untersuchten Nachkommen PCR-positiv waren, war das bei 18-15 nur bei einer von sechs der Fall. Die Pflanzen 18-02, 18-135b und 19-09b hatten keine transgenen Nachkommen. Die untransformierten Kontrollen und deren Nachkommen waren in den PCR-Analysen alle negativ.

4.7.1.2 "backbone"-Sequenzen

Von den regenerierten transgenen Pflanzen sind 57 auf Plasmidsequenzen außerhalb der T-DNA mittels PCR untersucht worden. Rund 40 % von ihnen waren für die Sequenz, die die linke "border" (LB) überspannt in der PCR positiv. Mit Ausnahme von vier Pflanzen waren sie dann auch für ein Fragment des Kanamycin-Resistenzgenes (*npt III*) auf dem Plasmidrückgrat in der entsprechenden PCR positiv.

Das Fragment, das die rechte "border" (RB) überspannt, wurde in keiner Probe nachgewiesen. Im Bezug auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit von "backbone"-Sequenzen zeigten die Pflanzen der Nachkommenschaft der T_0 überwiegend das selbe Ergebnis wie ihr jeweiliger Elter. Von dieser Regel gab es fünf Ausnahmen: Die Elternpflanzen 16-10, 16-21, 18-01 und 18-04 zeigten alle ein Signal in der LB- und der *nptIII*-PCR. Ihre entsprechenden Nachkommen 16-10(07)I, 16-21(05)I, 18-01(10)IV, 18-04(07)II und 18-04(15)III hingegen waren in beiden PCRs negativ, für *vst* und *bar* jedoch positiv. Die Befunde basieren auf bis zu sieben PCR-Ansätzen aus bis zu drei Proben je Pflanze und Primerpaar.

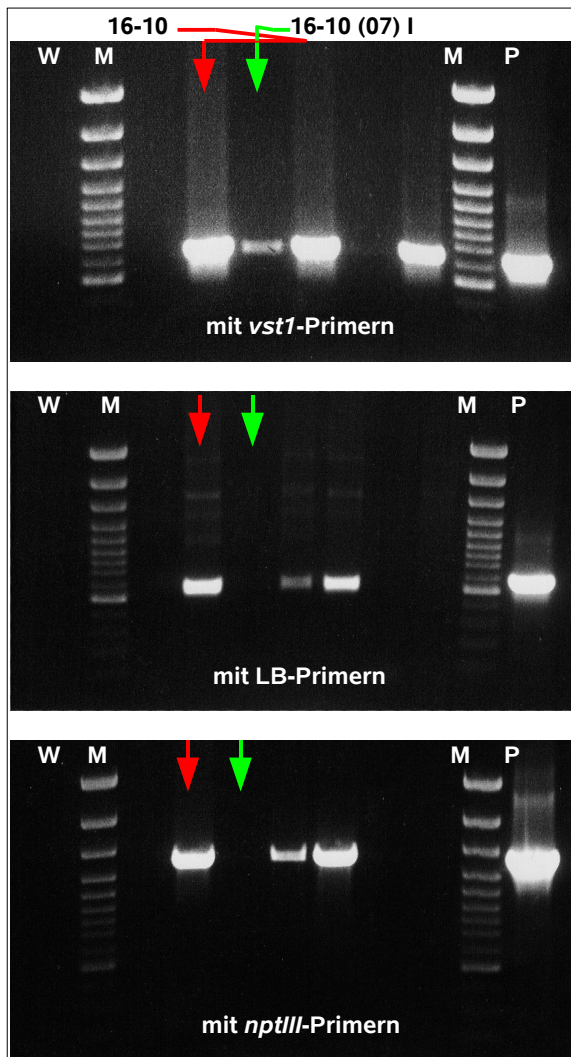


Abbildung 62: Vergleich von T₀ und T₁ in der PCR
 Elter 16-10 (->) ist mit allen drei Primerpaaren positiv, Nachkomme 16-10 (07) I (->) nur in der *vst1*-PCR.
 W Wasser-Kontrolle; M Marker 100bp+;
 P Plasmid-Kontrolle

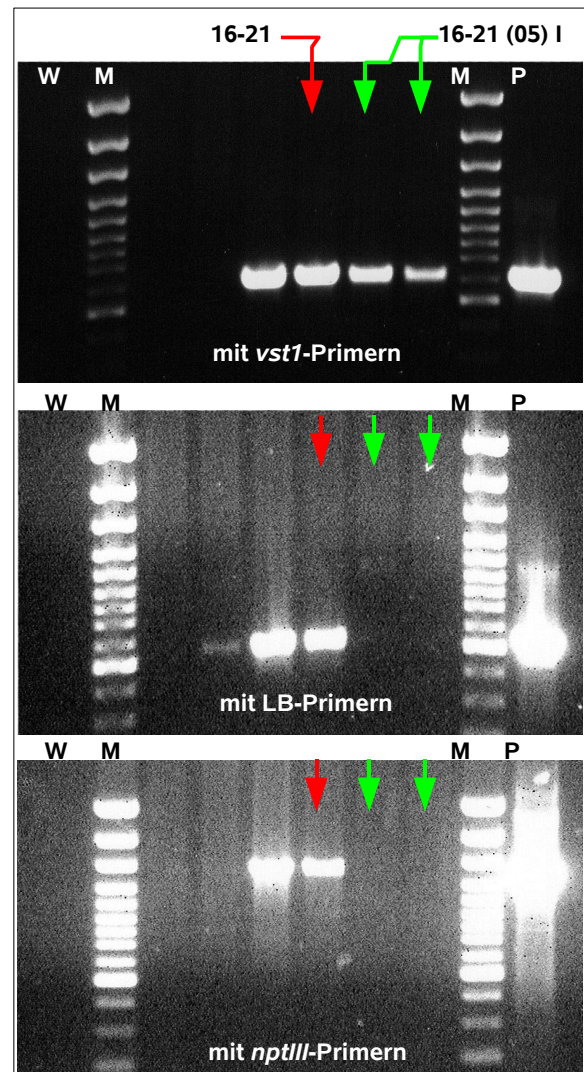


Abbildung 63: Vergleich von T₀ und T₁ in der PCR
 Elter 16-21 (->) ist mit allen drei Primerpaaren positiv, Nachkomme 16-21 (05) I (->) in beiden Proben nur in der *vst1*-PCR.
 W Wasser-Kontrolle; M Marker 100bp+;
 P Plasmid-Kontrolle

4.7.1.3 Bakteriell Gen *picA*

In einigen Proben von T₀-Pflanzen wurde in der PCR ein Fragment des *picA*-Gens aus dem Agrobakterien-Genom nachgewiesen.

Bei Pflanze 18-15 beispielsweise zeigten Proben, die für *picA* positiv waren, auch mit allen anderen Primerpaaren ein positives PCR-Ergebnis.

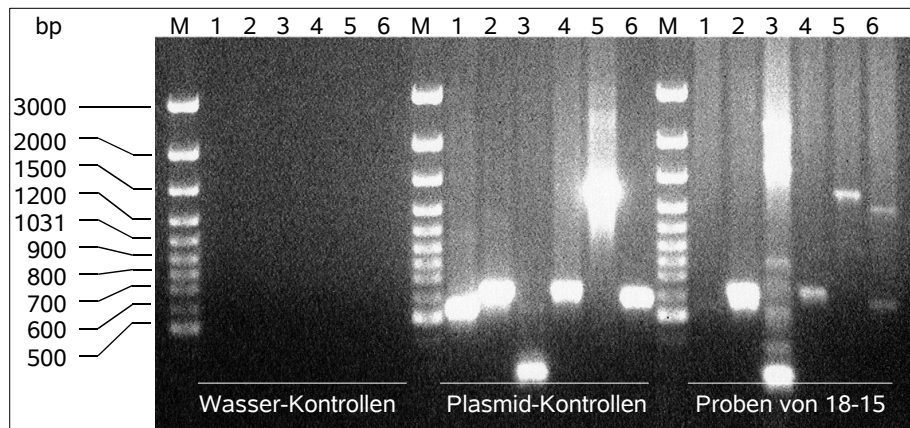


Abbildung 64: falsch-positive PCR Ergebnisse in Proben von Pflanze 18-15 durch Agrobakterien

M Marker 100bp+; Bahnen 1-6 verschiedene Primerpaare: 1 RB; 2 *vstI*; 3 *bar*; 4 LB; 5 *npIII*; 6 *picA*

In *picA*-negativen DNA-Proben dieser Pflanze konnten die Fragmente für die “border“- und “backbone“-Sequenzen aber nicht nachgewiesen werden und auch in der Southern-Blot-Analyse waren nur *vstI* und *bar* nachweisbar.

Mit keiner der Proben von Pflanzen der F₁-Generation wurde ein Amplifikat mit *picA*-Primern detektiert.

Nr. des Elter (T ₀)	Nr. der T ₁ -Pflanze	PCR mit Primerpaaren						Nr. des Elter (T ₀)	Nr. der T ₁ -Pflanze	PCR mit Primerpaaren					
		vst	bar	LB	npt III	RB	pic A			vst	bar	LB	npt III	RB	pic A
16-10	Elter	+	+	+	+	-	-	18-14	Elter	+	+	+	+	-	-
	7 I	+	+	-	-	-	-		14 I	+	+	+	+	-	-
	7 II	+	+	+	+	-	-		14 II	-	-	-	-	-	-
	7 III	+	+	+	+	-	-		14 III	-	-	-	-	-	-
	7 IV	+	nd	nd	nd	nd	nd		14 IV	+	+	+	+	-	-
	12 I	+	+	+	+	-	-		14 V	-	-	-	-	-	-
	12 II	+	+	+	+	-	-		14 VI	+	+	+	+	-	-
16-21	Elter	+	+	+	+	-	-	18-15	Elter	+	+	-	-	-	-
	5 I	+	+	-	-	-	-		5 I	-	-	-	-	-	-
18-01	Elter	+	+	+	+	-	-		5 II	-	-	-	-	-	-
	10 I	+	+	+	+	-	-		9 I	+	+	-	-	-	-
	10 II	+	+	+	+	-	-		9 II	-	-	-	-	-	-
	10 III	-	-	-	-	-	-	9 III	-	-	-	-	-	-	
10 IV	+	+	-	-	-	-	9 IV	-	-	-	-	-	-		
18-02a	Elter	+	+	-	-	-	-	18-19	Elter	+	+	+	+	-	-
	4 I	-	-	-	-	-	-		14 I	+	+	+	+	-	-
	4 II	-	-	-	-	-	-		14 II	+	+	+	+	-	-
4 III	-	-	-	-	-	-	14 III		+	+	+	+	-	-	
18-04a	Elter	+	+	+	+	-	-		14 IV	-	-	-	-	-	-
	7 I	+	+	+	+	-	-		14 VI	-	-	-	-	-	-
	7 II	+	+	-	-	-	-	18-35 b	Elter	+	+	-	-	-	-
	10 I	+	+	+	+	-	-		14 I	-	-	-	-	-	-
	11 I	+	+	+	+	-	-	19-09 b	Elter	+	+	-	-	-	-
	11 II	+	+	+	+	-	-		5 I	-	-	-	-	-	-
	15 I	+	+	+	+	-	-		5 II	-	-	-	-	-	-
	15 II	+	+	+	+	-	-								
15 III	+	+	-	-	-	-									

Tabelle 18: PCR-Ergebnisse der Eltern und Nachkommen
nd = nicht durchgeführt

4.7.2 Southern Blot-Analyse

Pflanzen, die von verschiedenen Explantaten und damit von unterschiedlichen Kalluslinien stammten, zeigten im Southern Blot erwartungsgemäß verschiedene Bandenmuster.

Pflanzen, die von derselben Kalluslinie regeneriert worden sind, zeigten in einigen Fällen das gleiche Bandenmuster, stellten also einen Klon dar.

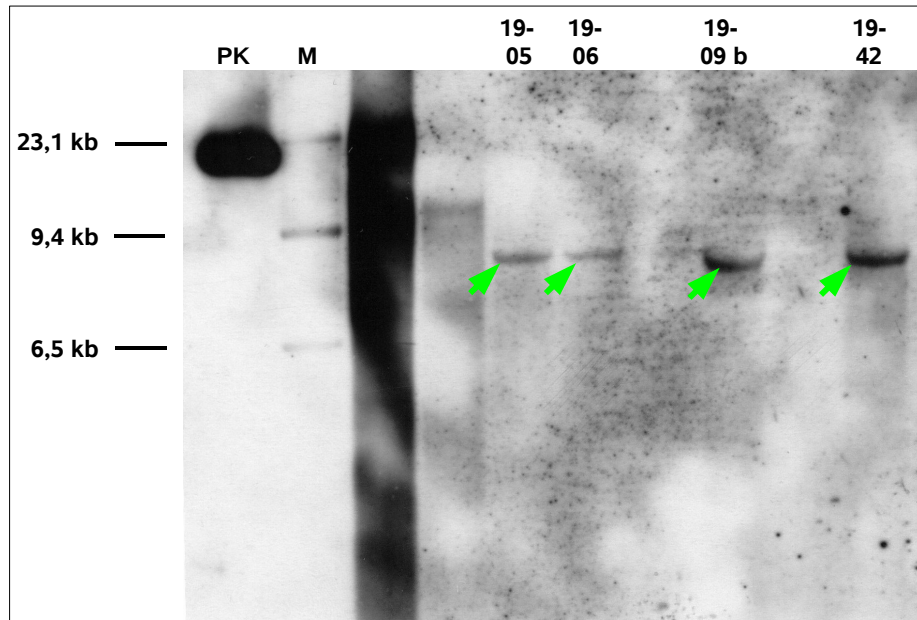


Abbildung 65: Southern Blot von Pflanzen desselben Explantates mit gleichen Banden (->) in allen vier Pflanzen, Hybridisierung mit *vst*-Sonde
PK = Positivkontrolle mit PCR-Produkt, M = DIG-Marker

In manchen Fällen unterschieden sich die Regenerate desselben Explantats im Southern Blot.

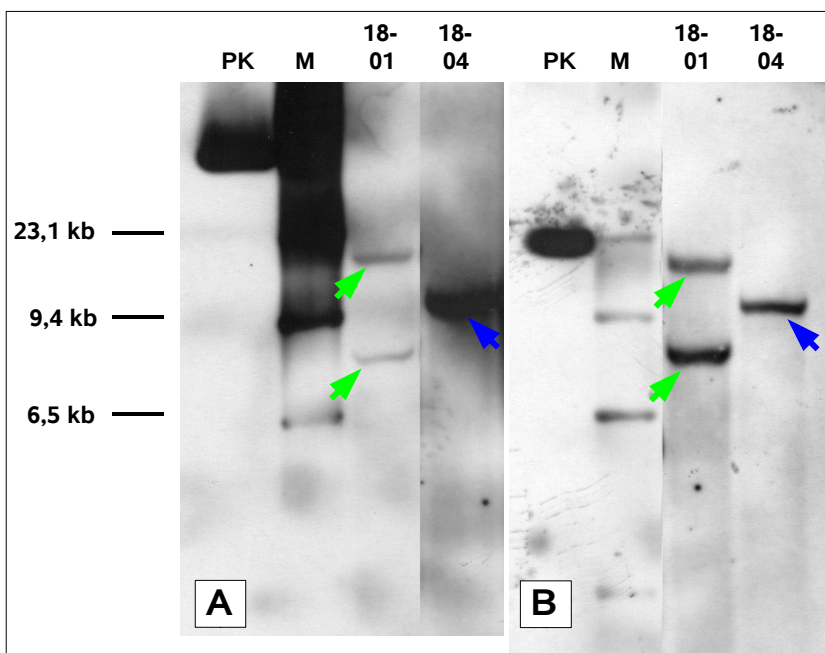


Abbildung 66: Southern Blot von Pflanzen desselben Explantates mit verschiedenem Bandenmuster, Hybridisierung mit *vst*-Sonde jeweils zwei unabhängige Proben in zwei verschiedenen Blots
PK = Positivkontrolle mit PCR-Produkt, M = DIG-Marker

Beide Befunde, gleiche Banden sowie ein verschiedenes Integrationsmuster bei Regeneraten von einem Explantat traten jeweils etwa bei einem Drittel der Pflanzen auf.

Die Pflanzen der restlichen Gruppe hatten einige Banden gemeinsam und unterschieden sich gleichzeitig in anderen, wie am Beispiel der Regenerate von Explantat 13 zu erkennen ist:

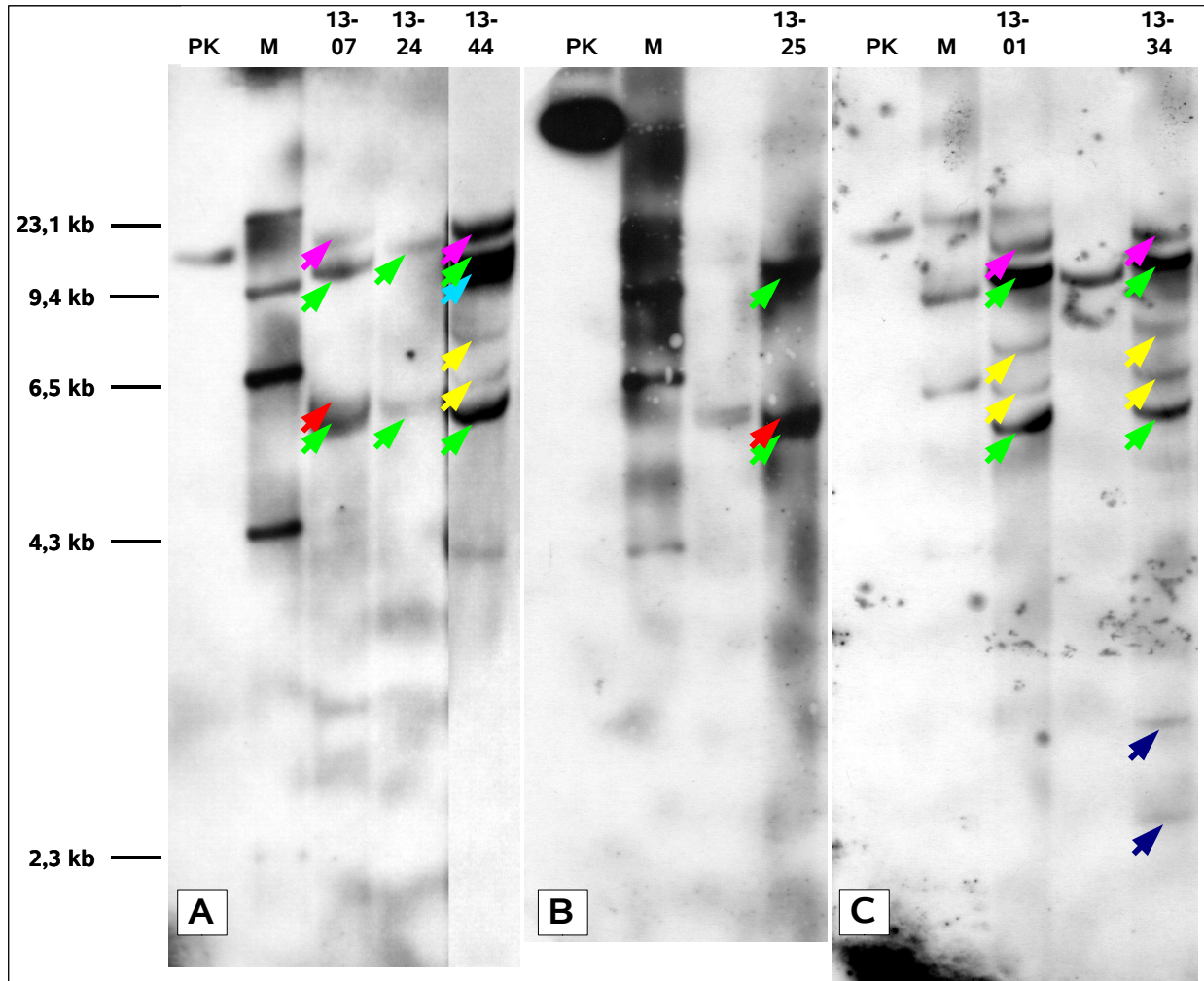


Abbildung 68: Southern Blot von Pflanzen desselben Explantats mit gleichen und verschiedenen Banden bei Hybridisierung mit *vst*-Sonde
 gleiche Banden (→) in allen sechs Pflanzen, in 13-24 nur diese beiden
 zusätzliche Bande (→) in 13-07 und 13-25,
 weitere Bande (→) in 13-07, -44, -01 und -34,
 weitere Banden (→) in 13-44, -01 und -34,
 eine Bande nur bei 13-44 (→) und zwei Banden exklusiv bei 13-34 (→)
 PK = Positivkontrolle mit PCR-Produkt, M = DIG-Marker

Darüber hinaus waren auch zwischen solchen Pflanzen Unterschiede im Bandenmuster festzustellen, die auf denselben vom Kallus abgetrennten Spross zurückgingen, also zu einer Sprosslinie gehörten, und nach einiger Zeit der Mikropropagation bewurzelt und ins Gewächshaus überführt worden waren, wie beispielsweise die Pflanzen 19-09 a und b (siehe Abbildung unten).

Auch der Vergleich von DNA-Proben der selben Pflanze, die zu verschiedenen Zeiten genommen worden waren, resultierte in einigen Fällen in einem verschiedenen Bandenmuster, wie an der unterschiedlichen Lage der Bande von zwei unabhängigen Proben von Pflanze 19-09 b zu sehen ist (siehe Abbildung unten).

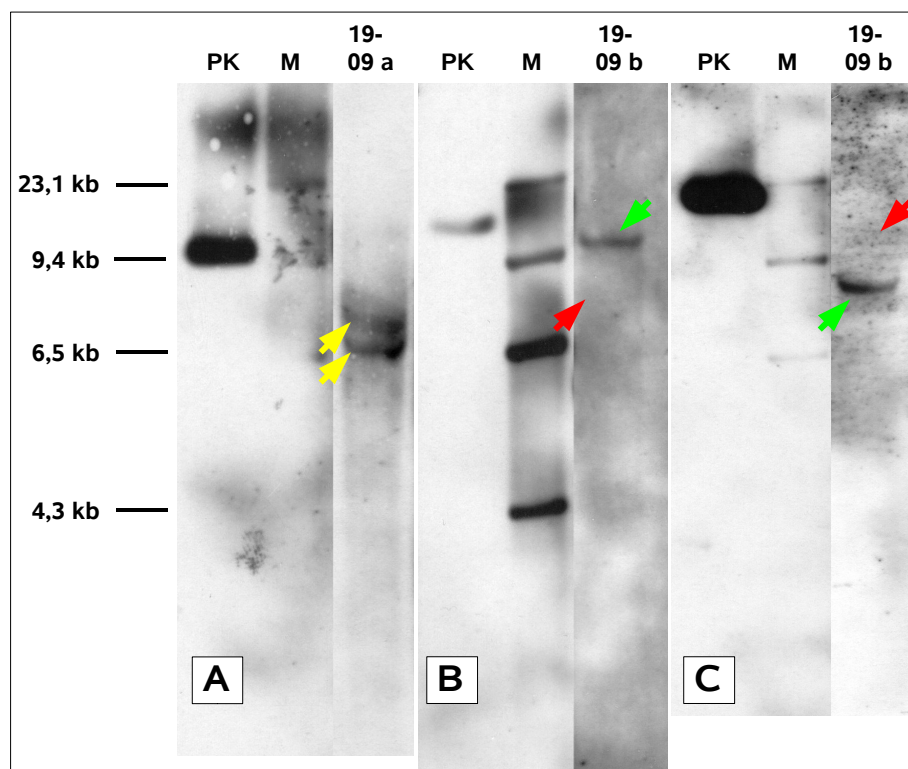


Abbildung 69: Southern Blot von Pflanzen derselben Sprosslinie und Proben derselben Pflanze bei Hybridisierung mit *vst*-Sonde

Zwei Banden bei Pflanze "a" (->) in Blot A und ein abweichendes Bandenmuster mit je eine Bande verschiedener Größe bei zwei Proben von Pflanze "b" (->, ->) in Blot B und C.

PK = Positivkontrolle mit PCR-Produkt, M = DIG-Marker

Bei den meisten Pflanzen der T_1 zeigte sich entweder das gleiche Bandenmuster wie bei ihrem Elter, oder eine oder mehrere Banden fehlten wie im folgenden Beispiel von Elternpflanze 16-21 und Nachkomme 16-10 (05) I.

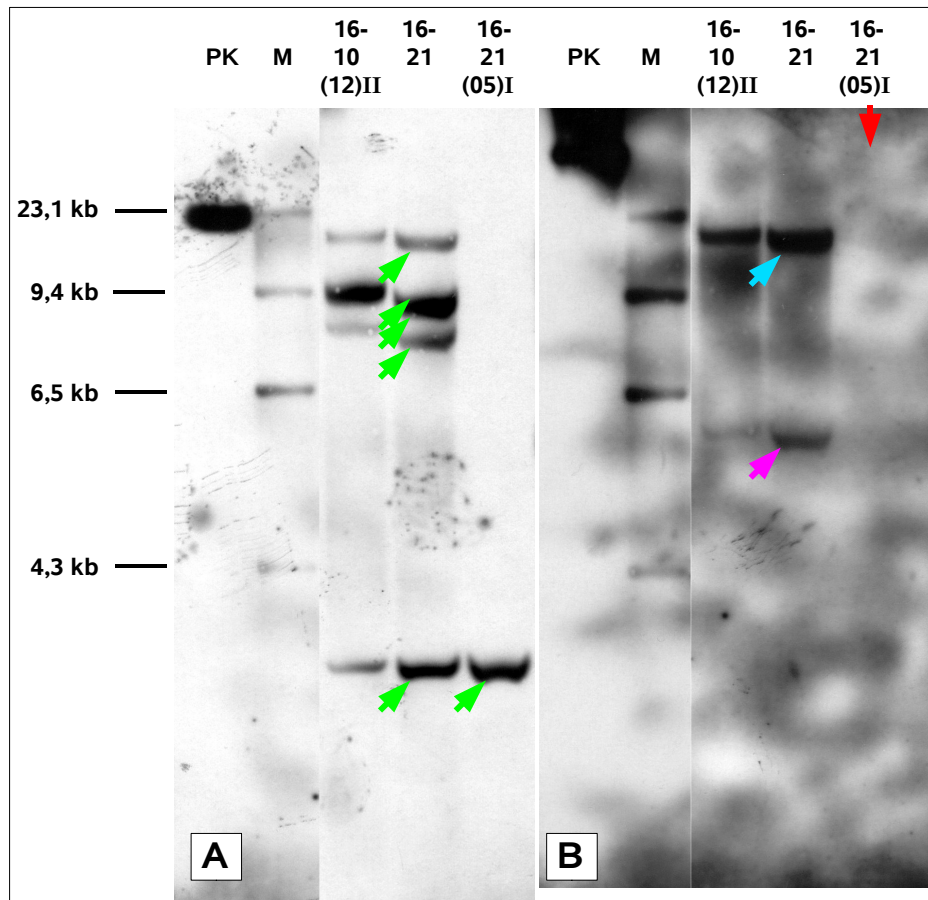


Abbildung 70: Vergleich von T_0 und T_1 im Southern Blot
 Bei Hybridisierung mit *vst*-Sonden (A) zeigen Elter 16-21 und Nachkomme 16-21(05)I unterschiedlich viele Banden (->).
 Mit *nptIII*-Sonde (B) sind nur beim Elter zwei Banden erkennbar (->, ->).
 PK = Positivkontrolle mit PCR-Produkt; M = DIG-Marker

Mit *vst*-Sonden in Blot A zeigen Elter 16-21 und Nachkomme 16-21(05)I die unterste Bande in gleicher Weise. Die vier weiteren Banden des Elter hingegen fehlen der T_1 -Pflanze.

Mit *nptIII*-Sonde in Blot B sind beim Elter zwei Banden zu erkennen. Die obere (->) liegt auf gleicher Höhe wie die oberste Bande bei der *vst*-Detektion in A und stellt somit dasselbe DNA-Fragment dar. Die untere Bande (->) hat bei Hybridisierung mit *vst*-Sonden keine Entsprechung.

Die Probe des Nachkommen hat mit der *nptIII*-Sonde nicht hybridisiert.

Drei der Nachkommen zeigten jedoch auch Banden, die bei ihrem jeweiligen Elter nicht vorhanden waren (18-04(07)II, 18-04(11)II, 18-14(14)IV).

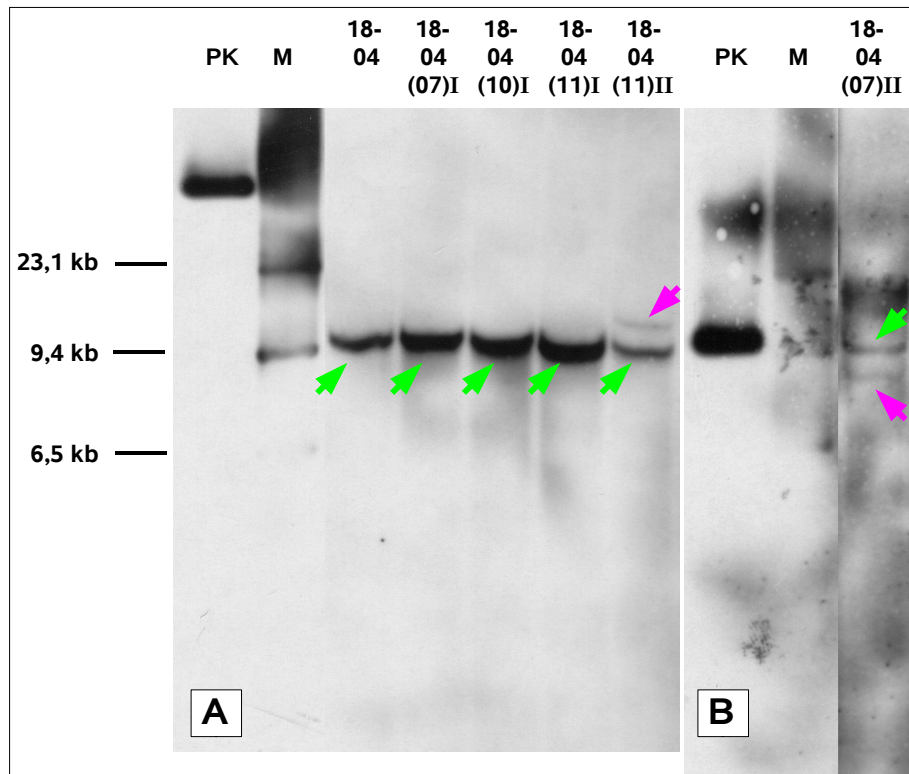


Abbildung 71: Vergleich von T₀ und T₁ im Southern Blot
Zwei von fünf Nachkommen zeigen bei Hybridisierung mit *vst*-Sonde nicht nur die gleiche Bande wie die Elternpflanze 18-04 (->), sondern auch jeweils eine weitere Bande (->), die in der T₀ nicht vorhanden ist.

Die Elternpflanze 18-04 zeigt bei Hybridisierung mit den *vst*-Sonden eine Bande (->) entsprechend mindestens eines transgenen Locus. Bei allen fünf Nachkommen wird das gleiche Fragment detektiert (->). Die Nachkommen 18-04 (11) II und 18-04 (07) II zeigen bei Hybridisierung mit *vst*-Sonden unabhängig von einander jeweils eine weitere Bande (->), die in der Probe der T₀ nicht detektiert worden ist.

Die beiden transgenen Nachkommen von Pflanze 18-19 weisen ein von ihrem Elter unterschiedliches Bandenmuster auf.

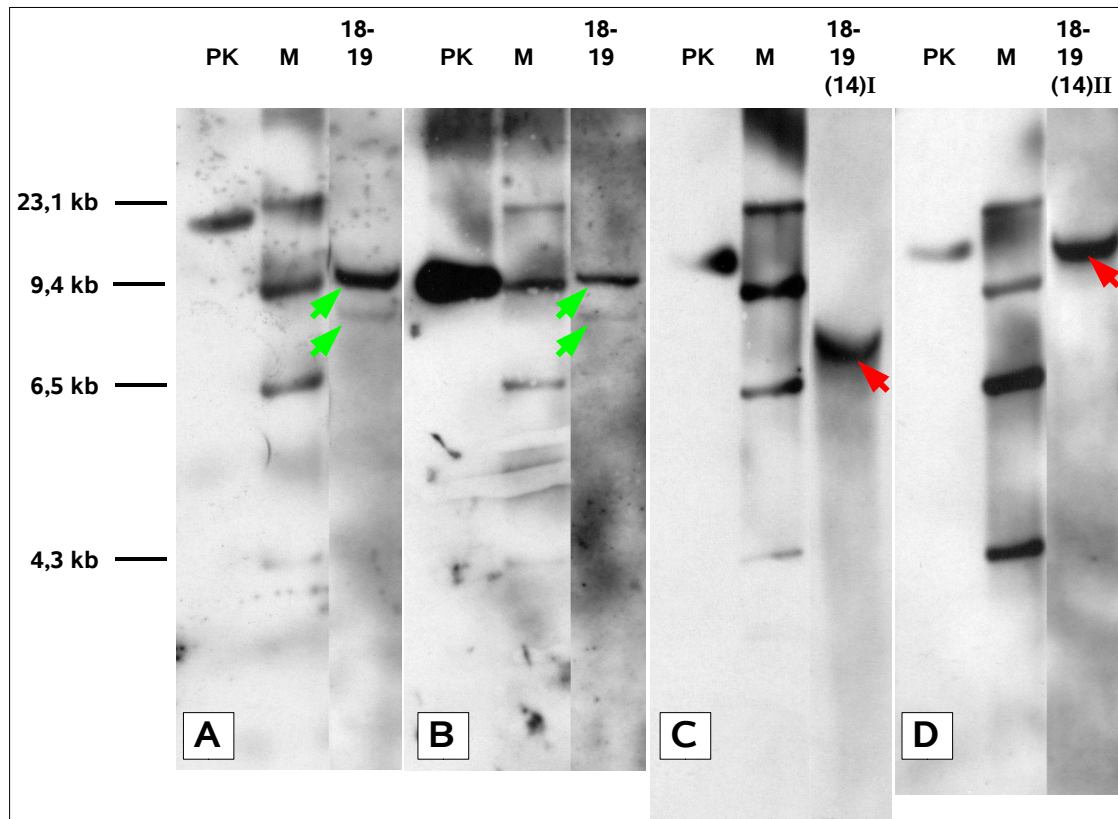


Abbildung 72: Vergleich von T_0 und T_1 im Southern Blot

Zwei Nachkommen zeigen bei Hybridisierung mit *vst*-Sonde statt des Bandenmusters der Elternpflanze 18-19 (\rightarrow) jeweils eine Bande (\rightarrow), die in der T_0 nicht vorhanden ist.

Bei Elternpflanze 18-19 werden mit den *vst*-Sonden in zwei unabhängigen Proben zwei Banden (\rightarrow) entsprechend mindestens zwei transgenen Insertionen detektiert (Blot A und B). Die beiden Nachkommen 18-19 (14) I und 18-19 (14) II zeigen diese Banden nicht. Stattdessen hybridisieren die Sonden mit jeweils einem anderen Fragment, das in einem Fall kleiner (Blot C) und im anderen Fall größer (Blot D) als diejenigen sind, die in den Proben der T_0 detektiert worden sind.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Southern Blot-Analysen zusammengefasst.

Pflanze	Anzahl Banden mit		Pflanze	Anzahl Banden mit	
	vst-Sonden	npt III-Sonde		vst-Sonden	npt III-Sonde
KH 02 *	0	0	18 – 01	2	1
KH 02 (04) I	0	0	18 – 01 (10) I	2	1
KH 02 (06) I	0	0	18 – 01 (10) II	2	1
09 – 02	1 / 3	1	18 – 02	1	0
09 – 19	8	2	18 – 04	1	1
09 – 37	1	0	18 – 04 (07) I	1	1
13 – 01	5	1	18 – 04 (07) II	2	2
13 – 07	4	0	18 – 04 (10) I	1	1
13 – 09	2	0	18 – 04 (11) I	1	1
13 – 24	2	0	18 – 04 (11) II	2	1
13 – 25	3	0	18 – 04 (15) II	1	1
13 – 34	8	3	18 – 14	2	1
13 – 44	7	2	18 – 14 (14) I	2	1
13 – 47	3	0	18 – 14 (14) IV	4	1
16 – 10	6 / 8	2 / 6	18 – 14 (14) VI	2	1
16 – 10 (07) II	5	2	18 – 15	1	0
16 – 10 (07) IV	8	5	18 – 15 (09) I	1	0
16 – 10 (12) I	4	1	18 – 19	2	1
16 – 10 (12) II	5	2	18 – 19 (14) I	1	1
16 – 12	10	2	18 – 19 (14) II	1	1
16 – 21 a	5	2	18 – 35	1	0
16 – 21 (05) I	1	0	18 – 38	1	0
16 – 21 b	2	0	18 – 40	3	0
16 – 38	7	0	19 – 05 a	1	0
16 – 81	7	0	19 – 05 b	1	0
16 – 87	6	0	19 – 06	1	0
16 – 88	5	0	19 – 09 a	2	0
17 – 04	0	0	19 – 09 b	1	0
17 – 23	12	3	19 – 42	1	0
17 – 38	8	3			

Tabelle 19: Southern Blot - Ergebnisse der Regenerate (T_0) und der Nachkommen (T_1)

* untransformierte Kontrollpflanze

Die Ergebnisse der Detektionen mit der *bar*-Sonde sind nicht aufgeführt. Soweit durchgeführt und erkennbar, entsprach das Bandenmuster bei der *bar*-Detektion dem der *vst*-Hybridisierung. Wenn die Signale in der *vst*-Detektion nur schwach zu sehen waren, konnten die entsprechenden Fragmente mit der *bar*-Sonde nicht mehr sichtbar gemacht werden, da diese deutlich kleiner als die *vst*-Sonden ist und daher eine geringere Leuchtkraft aufweist.

4.7.3 Transkriptionsnachweis mit RT-PCR

Von allen eingesetzten Proben konnte ausreichend RNA für die c-DNA-Synthese isoliert werden. Die Ausbeute betrug 23 bis 252 µg und im Durchschnitt 122 µg RNA.

Von den bisher mit der RT-PCR untersuchten Proben transgener Pflanzen zeigten sechs ein positives Ergebnis in Form einer Bande der erwarteten Größe von 255 bp. Die Proben von vier Pflanzen sowie der untransformierten Kontrolle führten zu keiner Bande in der RT-PCR.

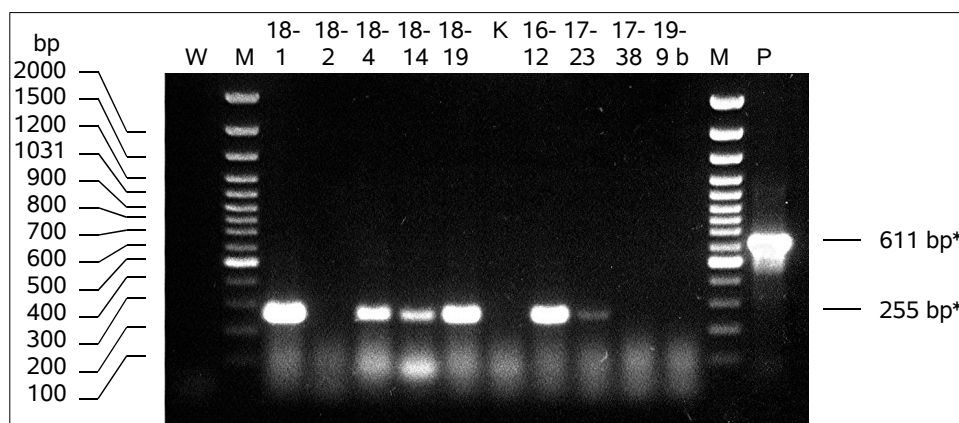


Abbildung 73: RT-PCR einiger T0 Pflanzen

* Der Größenunterschied kommt durch ein Intron zustande.

Unter den Pflanzen mit Expression des *vst*-Gens befinden sich sowohl solche mit wenigen als auch mit zahlreichen Banden im Southern Blot sowie Pflanzen mit und ohne detektierten "backbone"-Sequenzen.

Probe	RT-PCR		Kopienzahl	"backbone" - Sequenzen
	positiv	negativ		
H ₂ O-Kontr.		X	--	
16 – 12	X		10	+
17 – 23	X		12	+
17 – 38		X	8	-
18 – 01	X		2	+
18 – 02		X	1	-
18 – 04	X		1	+
18 – 14	X		2	+
18 – 15		X	1	-
18 – 19	X		2	-
19 – 09 b		X	1	-
Plasmid	X		--	

Tabelle 20: RT-PCR mit *vst*-Primern

5 Diskussion

5.1 *in-vitro* Sprosskulturen

in-vitro-Sprosskulturen sind aus Blattachselknospen von Gewächshauspflanzen von den sechs durch Rosenzüchter zur Verfügung gestellten Genotypen etabliert worden.

Die Bedingungen der Oberflächensterilisation lagen mit der Verwendung von 1,2% freiem Chlorit (NaOCl) und einer Einwirkzeit von 30 Minuten in etwa in dem Bereich, den auch andere Autoren gewählt haben, wie beispielsweise Matthews *et al.* ('94). Diese Bedingungen müssen jedoch immer an die aktuellen Bedingungen angepasst werden. Die getesteten Variationen bei der Oberflächensterilisation und die Veränderungen der Kulturbedingungen hatte keine entscheidende Steigerung der Effizienz zur Folge.

Ein Zusammenhang zwischen dem Erfolg bei der Induktion von Sprosswachstum aus Blattachselknospen und Eigenschaften der Explantate wie Alter, Position an der Pflanze, Durchmesser des Zweiges oder der Grad seiner Verholzung war nicht festzustellen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Marcelis van Acker ('94).

Das Auswachsen der Achselknospen zu Sprossen erfolgte gleichermaßen mit und ohne Licht. Die im Dunkeln gewachsenen Sprosse wurden bevorzugt, da sie durch deutlich schnelles Streckungswachstum eher eine Länge erreicht hatten, bei der sie abgetrennt, als separater Spross weiter kultiviert und propagiert werden konnten. So wurde zusätzlich die Gefahr verringert, dass Mikroorganismen, die entweder von der der Oberflächensterilisation nicht erfasst worden waren oder die sich im Inneren des Gewebes befunden hatten (Cassells '91), dieses besiedeln und sich darin ausbreiten konnten. Spätere Probleme in den Sprosskulturen durch Überführung dieser Mikroorganismen in die Mikropropagation können auf diese Weise verhindert werden. Die Vermeidung möglicher Kontaminationen sind auch der Grund dafür, dass nur die Spitzen der Sprosse für die weitere Kultur verwendet werden sollten, und nicht der ausgewachsene Spross in ganzer Länge, wie in der vorliegenden Arbeit. Damit Sprosslinien im Falle einer systemischen oder endogenen (Cassells '91) Kontamination immer bis zum Ausgangsexplantat zurückverfolgt werden können, sollten sie getrennt nach Herkunft kultiviert werden, was sich im Verlauf dieser Arbeit als sinnvoll herausgestellt hat.

Die beobachteten Zusammenhänge zwischen dem Verzweigungsgrad der *in-vitro*-Sprosse und den eingesetzten Phytohormonen geht mit dem Verständnis über deren Wirkung und der gängigen Lehrmeinung konform: Gibberelline bewirken ein Streckungswachstum und Cytokinine als Auxin-Antagonisten unter anderem das Brechen der Apikaldominanz und dadurch zunehmende Verzweigung.

5.2 Spross-Organogenese an Blättern

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass bei allen sechs untersuchten Genotypen Adventivsprosse an Blättern von Gewächshauspflanzen induziert werden konnten. Auch Dubois *et al.* ('95) und Dubois und de Vries ('96) berichten von Spross-Organogenese an allen fünf von ihnen untersuchten Genotypen. Dieses Ergebnis wurde von Dubois und Koot ('97) und Dubois *et al.* (2000) mit 24 Genotypen bestätigt.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Blattteile zeigte sich eine Genotyp-Spezifität in der Form, dass der Anteil reagierender Explantate bei verschiedenen Teilen eines Blattes unterschiedlich hoch war. In dieser Arbeit erwies sich die Basis der Fiederblättchen mit Ausnahme von Genotyp A als Explantat mit der niedrigsten Effizienz, wohingegen bei Dubois *et al.* ('95 und '96) dieses Explantat bei allen fünf Genotypen die höchste Effizienz aufwies. Die Spitzen der Fiederblättchen brachten analog zu unserer Beobachtung auch bei Dubois *et al.* ('95 und '96) in keinem Fall Sprosse hervor. Das in der Regel effizienteste Explantat war in dieser Arbeit der Blattgrund, der bei Dubois das im Mittel zweitbeste Ergebnis der sechs verschiedenen Explantate erzielte. Allerdings war bei diesem Explantat nicht sicher zu entscheiden, ob der Spross aus undifferenziertem Gewebe *de-novo* entstanden war oder aus Resten des Meristems der Blattachselknospe, da der Spross genau an dieser Ansatzstelle gebildet wurde.

Der größte Unterschied zu den hier erzielten Ergebnissen bestand bei Dubois in einer insgesamt höheren Effizienz, sowohl im Bezug auf den Anteil organogener Kalli, als auch auf die Anzahl regenerierter Sprosse pro Kallus. Der Zusatz von Casein-Hydrolysat im Medium bei Dubois kann als ausschlaggebender Grund dafür ausgeschlossen werden, da Ibrahim *et al.* ('98) ebenfalls wie in dieser Arbeit kein Casein-Hydrolysat verwendeten, als sie die Spross-Organogenese an Blättern von *in-vivo*- auf *in-vitro*-Explantate übertrugen. Ishioka und Tanimoto ('90) beobachteten sogar nur dann Spross-Organogenese, wenn sie ein stickstoffreduziertes MS-Medium benutzten. Viel eher kommt – neben den unterschiedlichen Ansprüchen verschiedener Genotypen - der schwer definierbare physiologische Zustand des Ausgangsmaterials als Ursache für Effizienzunterschiede in Betracht, der von zahlreichen Faktoren bei der Anzucht im Gewächshaus bestimmt wird, wie z.B. Wetter, Jahreszeiten, Nährstoffversorgung, Pflanzenschutzmaßnahmen und Gewächshaustyp.

Die Verwendung von *in-vitro*-Explantaten wie bei Ibrahim *et al.* ('98) sowie Ibrahim und Debergh (2000 und '01) hätte einerseits das gewünschte Ausgangsmaterial unter definierten Bedingungen der *in-vitro*-Sprosskultur geliefert. Andererseits wäre dies aber mit einem sehr viel Mehr an Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden gewesen, da sowohl der Anteil an organogenem Kallus als auch die durchschnittliche Anzahl gebildeter Sprosse an den Blättchen mit fortschreitendem Alter der Sprosskulturen abnahm, so dass diese immer wieder neu etabliert werden mussten, wie Ibrahim und Debergh ('01) nicht nur von ihren eigenen Versuchen, sondern auch von denen anderer Autoren berichteten.

Auch wenn Dubois und Koot ('97) bei allen 24 untersuchten Genotypen mit der Induktion von Adventivsprossen bei einem großen Teil der Blattsegmente erfolgreich waren, so lag deren durchschnittliche Anzahl pro Explantat bei den meisten Genotypen bei zwei oder noch

niedriger. Selbst vier Sprosse pro Explantat, wie im effizientesten Fall, wären nicht ausreichend für die Anwendung des Protokoll für Transformationen, zumal es sich laut Dubois *et al.* ('02) um eine direkte Organogenese handelt, bei der transgenes Gewebe nicht in einer Kallusphase propagiert und angereichert werden könnte. Neben der Sprossbildung haben Dubois *et al.* zwar kompakten Kallus an den Schnittkanten der Explantate beschrieben, was sich mit unseren Beobachtungen deckt und auch von Ibrahim und Debergh (2000 und '01) an deren *in-vitro*-Explantaten bestätigt wurde. Allerdings beobachteten letztere die Entstehung der Adventivknospen nicht an oder auf, sondern im Kallus. Dubois *et al.* ('95) beschrieben sogar die Möglichkeit, dass die Sprossknospen von Kallusgewebe überwachsen würden, was bedeutet, dass sie direkt aus Zellen des Blattes parallel zum Kallus entstanden sind. Selbst wenn diese Einschätzung täuschte und die Regeneration auf indirektem Wege erfolgt wäre, ist die Kallusphase mit sieben bis zehn Tagen zu kurz und der Kallus zu klein, um auf diese Weise potentiell transgenes Gewebe anreichern zu können.

Auch andere Autoren erzielten mit der Spross-Organogenese nur vergleichbar geringe Regenerationsraten pro Explantat. Hsia und Korban ('96) erhielten im Durchschnitt ein bis zwei Sprosse pro Explantat, Lloyd *et al.* ('88) 1,2 bis drei Sprosse, Leffering und Kok ('90) drei bis fünf und Ishioka und Tanimoto ('90) konnten mit durchschnittlich 5,8 Sprossen pro Kallus noch die größte Anzahl induzieren. Letzteres war durch die Verwendung von Gelrite statt Agar als Geliermittel und die Reduktion von Stickstoff im Medium überhaupt erst möglich. Die beschriebene Effizienz wurde nur durch eine erhöhte Calciumkonzentration im Medium erreicht. Rout *et al.* ('92) arbeiteten mit den gleichen Explantaten wie Ishioka und Tanimoto ('90), erreichten aber Sprossbildung im Gegenteil durch Zugabe von Stickstoff in Form von Aminosäuren und ohne die anderen Modifikationen.

Die übrigen Autoren, die von *de-novo*-Regeneration von Sprossen bei *Rosa* berichteten, arbeiteten mit Blättern, Internodien und Wurzelsegmenten ausschließlich von *in-vitro* Ausgangsmaterial. Sie erhielten jeweils sehr unterschiedliche Ergebnisse, mit manchen Genotypen gar keine Regeneration (Lloyd *et al.* '88) oder zum Teil neben Adventivsprossen auch somatische Embryonen (Arene *et al.* '93, Hsia und Korban '96), je nachdem, mit welchen Genotypen und Explantaten sie arbeiteten.

Insgesamt lässt sich anhand dieser Zusammenfassung der Literatur und der dazu passenden eigenen Ergebnisse folgern, dass dieses System für die Transformation entweder insgesamt zu ineffizient ist oder es keine ausreichende Schnittmenge zwischen regenerierbarem und transformierbarem Gewebe gibt.

Indirekt wird diese Beurteilung auch dadurch bestätigt, dass bisher kein System zur Transformation von Rosen veröffentlicht wurde, das auf Regeneration durch Spross-Organogenese basiert.

5.3 Transformation von Meristemen

5.3.1 Transformationsbedingungen

Für die Transformation von bereits angelegten Meristemen werden in der Regel zygote Embryonen oder Keimlinge gewählt. Diese sind bei Pflanzen, die über Samen vermehrt werden, leicht in großer Zahl zu erhalten. Bei vegetativ vermehrten Pflanzen wie der Rose stehen diese Gewebe nicht zur Verfügung, da ihre Beschaffung eine generative Vermehrung voraussetzt. Daraus hervorgehende Pflanzen würden aufgrund von Rekombinationsvorgängen bei Keimzellenbildung und Befruchtung alle eine untereinander verschiedene, zufällige Kombination von Merkmalen aufweisen. Sie wären mit sehr großer Wahrscheinlichkeit, abgesehen vom exprimierten Transgen, für den Züchter ohne Wert, da auch nach Züchtungskreuzungen nur sehr wenige einzelne Pflanzen von mehreren 1.000 Sämlingen als Genotyp oder Zuchtlinie geeignet sind. Solche Größenordnungen sind in einem Transformationsansatz nicht praktikabel. Für die Transformation von Rosen müssen daher die Apikal- und Lateralmeristeme von *in-vitro*-Sprossen oder von Pflanzen *in-vivo* verwendet werden. Bis 1996 gab es mit diesen Geweben überhaupt noch keine erfolgreiche Transformation (Zimmerman und Scorza '96). Strefelder berichtete 1993 über Arbeiten mit Blattachselknospen an Rosen *in-situ*. Im Gegensatz dazu fiel die Entscheidung in dieser Arbeit zugunsten von *in-vitro* Blattachselknospen, da bei diesen die Strukturen feiner sind und die Überführung des Materials in *in-vitro*-Bedingungen entfällt.

Um zu ermöglichen, dass meristematische Zellen während der Co-Kultur von Agrobakterien erreicht und transformiert werden können, ist es hilfreich, das Gewebe zu verletzen. Andere Autoren verwendeten überwiegend eine Partikelkanone und beschossen die Meristeme mit Mikroprojektilen. Entweder waren diese mit DNA beladen und wurden direkt zur Transformation eingesetzt oder sie dienten nur zur Verletzung des Gewebes und es wurde anschließend mit Agrobakterien transformiert. Alibert *et al.* ('99) konnten eine höhere Transformationsrate erreichen, indem sie die Explantate mit pectolytischen Enzymen behandelten und Zimmerman und Scorza ('96) erhielten eine größere Anzahl transgener Tabaksprosse, wenn sie mit vitrifiziertem Pflanzenmaterial arbeiteten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sprossachsen mit Ultraschall behandelt. Dabei werden Mikroverletzungen im Gewebe erzeugt, wodurch Agrobakterien leichter Zugang zum Zielgewebe haben und in größerer Zahl auch in tiefer liegende Zellschichten vordringen können (Santarem *et al.* '98, Finer und Finer 2000). Diese Mikroverletzungen führen zu einer vorübergehenden Abnahme von Vitalität und Wachstum in pflanzlichen Geweben (Frizzell '88). Dies zeigte sich im vorliegenden Fall an einer geringeren Anzahl von Sprossen bei wachsenden Blattachselknospen.

Die Ultraschallintensität ergibt sich aus zwei Parametern: der Einwirkzeit und der Leistung, mit der die Schallwellen abgestrahlt werden. Die Zeit hat einen linearen Effekt: Je länger der Ultraschall einwirkt, desto größer sind die im Gewebe verursachten Schäden (Trick und Finer '97). Bei der Leistung, mit der die Schallwellen abgestrahlt werden, gibt es einen

Schwellenwert. Dieser muss überschritten werden, damit die Bildung von Gasbläschen (Kavitation), auf der die Wirkung des Ultraschalls beruht, überhaupt auftritt. Oberhalb dieses Schwellenwertes hat die eingestrahlte Energie sowohl einen Einfluss auf die Häufigkeit der Bläschenbildung als auch auf deren Verhalten (siehe Einleitung). Bei den verschiedenen Möglichkeiten, die zu einer mechanischen Schädigung der Umgebung führen können, bedeutet daher doppelt so viel Energie nicht gleichzeitig auch einen doppelt so großen Effekt. Die beiden Parameter der Ultraschallintensität, Einwirkzeit und Leistung, haben demnach unterschiedliche Auswirkungen auf das Gewebe.

5.3.2 Transformationsversuche mit Lateralmeristemen

Wurden co-kultivierte Sprosse auf Selektions-Medium gesetzt, verlangsamte sich ihr Wachstum gegenüber nicht-transformierten auf Sprosskultur-Medium und sie bildeten kleinere Blätter, was durch die Wirkung von PPT hervorgerufen wird. Effekte durch die Ultraschall-Behandlung oder die Co-Kultur konnten mit den entsprechenden Kontrollen ausgeschlossen werden. Durch die Hemmung der Glutaminsynthetase durch PPT wird die Neusynthese von Aminosäuren eingeschränkt. Damit verlangsamt sich auch die Proteinbiosynthese, was zu einem reduzierten Wachstum führt. In absterbenden Explantaten war die Aminosäuresynthese zu schwach, um den Stoffwechsel aufrechtzuerhalten, und/oder die Anreicherung von Ammonium, die zweite Komponente der PPT-Wirkung, war zu stark.

Neben Explantaten, die sich entsprechend der nicht transformierten Kontrollen verhielten und auf Selektionsmedium abstarben, gab es auch Explantate, die länger als die Negativkontrollen überlebten. In diesen Explantaten waren genügend transgene Zellen vorhanden, die einen Teil des PPT detoxifizieren und so nicht-transgene Gewebe-Anteile vor der Wirkung schützen konnten. Diese transgenen Anteile in den Sprossachsen sind in GUS-Tests gezeigt worden. Allerdings reichte ihr Anteil und protektiver Effekt nicht aus, um die Sprosse 3 mg/L Glufosinat überleben zu lassen. Die letzten dieser Sprosse starben ab, nachdem die Selektion ausgesetzt worden war, was darauf schließen ließ, dass das PPT von den Pflanzen aufgenommen worden und noch in toxischer Konzentration im Gewebe vorhanden war.

Bleibt transgenes chimäres Gewebe längere Zeit unter Selektionsdruck, erfolgt eine Entmischung des Gewebes. Sofern es sich bei den transformierten Bereichen um meristematische und damit undifferenzierte und teilungsaktive Zellen handelt, ist eine Anreicherung zu erwarten, da das Wachstum von diesem Gewebe ausgeht und die transgenen Zellen des Meristems einen klaren Selektionsvorteil besitzen und die nicht transgenen nach und nach verdrängen. Das Absterben der Sprosse nach längerer Zeit unter höherem Selektionsdruck und das Ausbleiben von Blaufärbung im Gus-Test nach mehreren Subkulturen zeigten, dass dieser gewünschte Effekt nicht eintrat. Der Anteil transformierter Zellen ist trotz Selektionsvorteil zurückgegangen. Es handelte sich bei ihnen daher nicht um meristematisches Gewebe des Sprossscheitels, sondern um ausdifferenzierte Zellen der Hüllblättchen und der Sprossachse, die an der Bildung neuer Sprosse keinen Anteil haben.

5.4 Somatische Embryogenese

5.4.1 Induktion von embryogenem Kallus

Nach den ersten beiden Publikationen zur somatischen Embryogenese bei Rosen im Jahr 1990 von de Wit *et al.* und Roberts *et al.* gibt es inzwischen eine ganze Reihe von veröffentlichten Protokollen zur Induktion von embryogenem Kallus und somatischen Embryonen in der Gattung *Rosa*. Dabei wurden sehr viele verschiedene Gewebe als Ausgangsmaterial genutzt. Fünf Arbeitsgruppen verwendeten ausschließlich Gewebe von Gewächshauspflanzen: Rout *et al.* ('91) und Kintzios *et al.* ('99) arbeiteten mit Blättern und Internodiensegmenten, Noriega & Söndahl ('91) erprobten zusätzlich die Verwendung von Wurzeln und Meristemen sowie verschiedener Gewebe aus Blütenknospen, erhielten aber nur mit den Filamenten embryogenen Kallus. Ebenfalls mit Blütenknospen arbeiteten Murali *et al.* ('96) und induzierten embryogenen Kallus an Blütenblättern. An noch unreifen Samen von *R. rugosa* erhielten Kunitake *et al.* ('93) somatische Embryonen. Arene *et al.* ('93) untersuchten die größte Bandbreite an Material. Mit ihrem Protokoll induzierten sie an zygotischen Embryonen Embryogenese, an verschiedenen Geweben von Blütenknospen Sprossorganogenese und an Blättern, Internodien und Wurzeln von *in-vitro*-Sprossen beide Wege der Regeneration.

Auch wenn Kintzios *et al.* 1999 die Handhabung von Gewebe aus dem Gewächshaus als einfacher beurteilten, verwendeten doch alle anderen Autoren ausschließlich Gewebe von *in-vitro*-Kulturen. Van der Salm *et al.* ('96) induzierten embryogenen Kallus an Sprossscheiben, Roberts *et al.* ('90), Yokoya *et al.* ('96) und Sarasan *et al.* ('01) an Adventivwurzeln. Auch Matthews *et al.* ('91) benutzten *in-vitro*-Wurzeln als Ausgangsmaterial für Kallus, isolierten aber daraus zunächst Protoplasten und induzierten erst an den aus diesen generierten Micro-Kalli somatische Embryogenese. Eine weitere Gruppe von Autoren verwendete *in-vitro*-Blattgewebe: de Wit *et al.* ('90), Moyne *et al.* ('93), Singlacher *et al.* ('95), Hsia und Korban ('96) und Visessuwan *et al.* ('97) verwendeten die Blattspreite der Fiederblättchen, Li *et al.* (2002) ganze Blätter und Marchant *et al.* ('96) ausschließlich den Blattstiel.

Dabei wird immer wieder deutlich, dass die Induzierbarkeit von embryogenem Kallus stark Genotypen-abhängig ist, wie auch Castellón und Kamo ('02) in der Literatur beobachtet haben: Viele Autoren entwickelten ihr Protokoll nur für einen einzigen Genotyp (Roberts *et al.* '90, Matthews *et al.* '91, Rout *et al.* '91, Noriega & Söndahl '91, Arene *et al.* '93, Moyne *et al.* '93, Singlacher *et al.* '95 und Sarasan *et al.* '01). Andere, die ihre Versuche mit mehreren Genotypen begonnen hatten, waren entweder nur mit einem oder zweien davon erfolgreich (de Wit *et al.* '90, Kunitake *et al.* '93, Derks *et al.* '95, Murali *et al.* '96) oder entwickelten für verschiedenen Genotypen auch verschiedene Vorgehensweisen (Hsia und Korban '96, Visessuwan *et al.* '97, Li *et al.* '02). Auch Kintzios *et al.* ('99) konnten nur an einem von vier Genotypen somatische Embryogenese erreichen und beschränkten sich in ihren weiteren Untersuchungen auf diesen (Kintzios *et al.* 2000). Yokoya *et al.* ('96) konnten

mit ihrem Protokoll an 17 von 24 untersuchten Genotypen embryogenen Kallus induzieren, aber nur von einem daraus Pflanzen regenerieren.

Nur das Protokoll von Dohm *et al.* ('01) erwies sich als eher Genotypen-neutral und ist von ihrer Arbeitsgruppe auf 50 Genotypen angewendet worden, die zu verschiedenen Wildarten und unterschiedlichen gartenbaulichen Gruppen von *Rosa hybrida* gehörten (Teehybriden, Floribunda, Miniaturrosen, Strauchrosen, Kletterrosen und Wurzelunterlagen). Bei 69% von diesen war die Vorgehensweise mit leichten Variationen in der Konzentration der Phytohormone erfolgreich anwendbar und führte zur Regeneration von Pflanzen, die ins Gewächshaus überführt und zur Blüte gebracht wurden. Daher bildete dieses Protokoll die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Dass diese Art der Induktion von somatischer Embryogenese auf ein breites Sortenspektrum anwendbar ist, bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit, indem an fünf von sechs weiteren Genotypen somatische Embryonen induziert werden konnte. Dabei hatte die Art und Weise der Präparation der Blätter einen entscheidenden Einfluss. Dohm *et al.* hatten die Fiederblättchen im Ganzen eingesetzt, wobei sie die Mittelrippe der Blättchen mehrmals durchtrennten, die Blattspreite jedoch weitgehend intakt ließen. Diese Art von Explantat führt im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu keiner Regeneration. Es kam nur dann zur Bildung organisierter Strukturen, wenn die Blättchen in Segmente zerteilt worden waren, wie bei Visessuwan *et al.* ('97) beschrieben. In kleineren Explantaten werden die regenerationskompetenten Zellen stärker aus der organisierten Gewebsstruktur herausgelöst. Die von außen zugeführten Phytohormone können so besser in gewünschter Weise wirksam werden, da der Einfluss endogener Faktoren minimiert wird.

Im Zuge der Regeneration wurde sowohl somatische Embryogenese als auch Spross-Organogenese beobachtet. Zum Teil zeigten sich beide Strukturen am selben Explantat. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beschreibung von Dohm *et al.* ('01) und auch zahlreiche andere Autoren (Arene *et al.* '96, Singlacher *et al.* '95, Yokoya *et al.* '96, van der Salm *et al.* '96, Hsia und Korban '96, Visessuwan *et al.* '97) berichten vom gleichzeitigen Auftreten beider Regenerationswege.

Unabhängig von der Art der Explantate wurde von fast allen Autoren ausschließlich die indirekte Form der somatischen Embryogenese beschrieben, die auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Nur Yokoya *et al.* ('96) attestierten bei drei Genotypen die Bildung der SE direkt an den Wurzelsegment-Explantaten.

Die Frequenz, mit der somatische Embryogenese induziert wurde, lag bei sechs von acht untersuchten Genotypen zwischen 4 und 16 %, maximal bei 35 % (Sorte A). Ähnliche Werte sind auch von anderen Autoren berichtet worden: Bei de Wit *et al.* ('90) Kunitake *et al.* ('93), Derks *et al.* ('95), Murali *et al.* ('96) und Visessuwan *et al.* ('97) lag die Effizienz der somatischen Embryogenese unterhalb von 15 %. Von einer Frequenz von bis zu einem Drittel berichteten Noriega und Söndahl ('91), Singlacher ('95), van der Salm *et al.* ('96), Marchant *et al.* ('96), Hsia und Korban ('96) und Li *et al.* (2002).

Dohm *et al.* ('01) erreichten mit ihrem besten Genotyp eine Effizienz von 95 %. Im Gegensatz zu den meisten anderen Autoren, bei denen zumindest ein Teil der Induktion im

Dunkeln durchgeführt wurde, erwähnten sie die Bedeutung einer relativ hohen Lichtintensität für die Induktion der somatischen Embryogenese von 2.000 Lux. Die Lichteinstrahlung variierte in unserer Klimakammer je nach Standort im Regal zwischen 2.500 und 8.000 Lux und war demnach voll ausreichend.

Entscheidend für die Induktion somatischer Embryogenese ist die Zugabe von Auxinen. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit das synthetische 2,4-D in Konzentrationen zwischen 5 μM und 50 μM für vier Wochen eingesetzt. Dies deckt sich mit den Angaben der meisten Autoren, die ebenfalls mit 2,4-D von 4,5 μM bis 100 μM für zwei bis acht Wochen induzierten. Die einzige Ausnahme dabei machten Kunitake *et al.* ('93), die nur mit hormonfreiem Medium arbeiteten. Drei weitere Autoren fügten zusätzlich zum Auxin auch Cytokinine in Form von Kinetin (de Wit *et al.* '90, Singlacher *et al.* '95, Kintzios *et al.* '99), BAP (Arene *et al.* '93, Rout *et al.* '91) oder Zeatin (Noriega & Söndahl '91) hinzu. Alle anderen waren reine Auxin-Medien.

Für die zweite Phase der Induktion von embryogenem Kallus wurde hier wie auch bei Dohm *et al.* ('01) zu einem reinen Cytokinin-Medium mit TDZ oder Zeatin gewechselt. Drei weitere Arbeitsgruppen beschrieben einen Wechsel des Hormon-Regimes in vergleichbarer Weise: Visessuwan *et al.* ('97) gaben 100 mL/L Kokosnuss-Wasser oder geringe Mengen TDZ (0,45 μM) ins Medium. Die beiden anderen benutzten ebenfalls TDZ (Hsia und Korban '96) oder alternativ auch BAP (Li *et al.* '02), gaben aber zusätzlich GA_3 mit ins Medium dazu. Dabei zeigten Li *et al.* , dass die Induktion von EC mit und ohne GA_3 gleich gut war und bestätigten damit den Befund von Dohm *et al.* Im Gegensatz dazu blieben die Hormonkonzentrationen bei sechs Protokollen konstant (de Wit *et al.* '90, Roberts *et al.* '90, Matthews *et al.* '91, Yokoya *et al.* '96 Kintzios *et al.* '99, Sarasan *et al.* '01). In den anderen wurde die Auxinkonzentration reduziert (Murali *et al.* '96, Marchant *et al.* '96) oder mit einem hormonfreien Medium auf null gebracht (Singlacher *et al.* '95, van der Salm *et al.* '96).

Die Ergebnisse der Variation von Auxin- und Cytokinin-Konzentration in der vorliegenden Arbeit ließen keine Relation zwischen Hormonkonzentrationen und Induktionseffizienz erkennen. Dies liegt zum einen an der großen Bandbreite, mit der SEG induziert werden konnte (v. a. Genotypen A, C und PC). Zum anderen war die Anzahl an Explantaten vor dem Hintergrund der relativ niedrigen Induktionseffizienz zu klein, um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können. Dennoch zeigte sich anhand der Unterschiede zwischen den Sorten, dass für jeden Genotyp eine optimale Kombination gefunden werden muss, um eine möglichst effiziente Induktion von SEG zu erreichen. Dies bestätigt die Aussage von Dohm *et al.* ('01).

5.4.2 Proliferation von embryogenem Kallus und Produktion somatischer Embryonen

Die Effizienz, mit der embryogener Kallus induziert werden kann, hat für ein Regenerationssystem nur eine untergeordnete Bedeutung, wenn der Kallus sich über eine längere Zeit kultivieren und vermehren lässt. Dies wurde von mehreren Autoren für

Zeiträume von sechs bis 36 Monaten berichtet (Noriega und Söndahl '91; Rout *et al.* '91; Dohm *et al.* '01; Yokoya *et al.* '96; Marchant *et al.* '96; Hsia und Korban '96 und Li *et al.* '02). Bei wiederholter Subkultur der embryogenen Kulturen auf Proliferationsmedium in dieser Arbeit differenzierten sich drei verschiedene Strukturen: Kluster somatischer Embryonen, fester grüner Kallus und eine weiche, strukturlose Zellmasse. Diese wurden auch von Dohm *et al.* ('01) beschrieben. Allerdings fassten sie die "bröckeligen" Bereiche aus Klustern von Embryonen verschiedener Entwicklungsstufen und die strukturlose weiche Zellmasse unter der Bezeichnung "smooth embryogenic callus" zusammen (Dohm *et al.* '01). Wenn sie den Kallus im Zuge der Subkulturen auf dieses Gewebe selektierten, konnten sie reine embryogene Kalluslinien etablieren, die ihren embryogenen Charakter über einen Zeitraum von drei Jahren aufrechterhalten haben.

Das war in unserem Labor in dieser Form nicht möglich, weder mit hier induziertem embryogenen Kallus noch mit etablierten Kulturen, die von der Arbeitsgruppe von Dohm übernommen worden waren. Ein Handhabungsfehler bei der Auswahl embryogener Gewebeanteile während des Umsetzens kann ausgeschlossen werden, da diese sowohl von ihrer Struktur als auch der Farbe eindeutig zu identifizieren waren. Eine Abnahme der embryogenen Kapazität ihrer Kalluskulturen mit der Zeit beschrieben ebenfalls Kunitake *et al.* ('93), ohne dabei auf mögliche Ursachen einzugehen.

Im vorliegenden Fall besteht eine Möglichkeit darin, dass das Medium durch einen zu hohen Cytokinin- und/oder einen zu niedrigen Auxingehalt die Entwicklung der somatischen Embryonen auf Kosten ihrer Proliferation förderte (Krikorian '95). Das hier und von Dohm *et al.* ('01) verwendete Proliferations-Medium für embryogenen Kallus enthielt die gleiche Hormonzusammensetzung, die Noriega & Söndahl ('91) für vier Wochen in ihrem "embryogenic tissue medium" benutzten. Für die Dauerkultur ihres Kallus änderten sie dann aber die Zusammensetzung der Salze, reduzierten Zeatin um ein Drittel und ersetzten 0,25 µM NAA durch 22,6 µM 2,4-D, was die vorangehende These unterstützt.

Die Entwicklung der Embryonen bis zum ausgereiften Embryo vollzog sich bei uns auf demselben Medium wie ihre Proliferation. Die reifen Embryonen legten auf diesem Medium weder eine Ruhephase ein noch keimten sie direkt aus. Das führte in einigen Fällen innerhalb von vier Wochen zwischen zwei Subkulturen zu sekundärer Embryogenese, meistens jedoch zur Bildung von grünem kompakten Kallus, der die Kultur nach und nach dominierte. Bei den anderen Autoren, die keine speziellen Medien für die Differenzierung und Reifung der SE verwendeten (de Wit *et al.* '90, Arene *et al.* '93, Singlacher *et al.* '95, van der Salm *et al.* '96, Hsia und Korban '96, Visessuwan *et al.* '97), geschah dies auf Medium mit derselben Hormonzusammensetzung wie die Induktion der SE. Alle anderen Autoren wechselten ein- oder zweimal das Medium und änderten zumindest die Phytohormone, in manchen Fällen aber auch zusätzlich andere Faktoren wie Zusammensetzung der Salze (Noriega & Söndahl '91), Kohlenstoffquelle (Kunitake *et al.* '93), Temperatur (Yokoya *et al.* '96) oder Lichtintensität (Kintzios *et al.* '99). Dies zeigt einerseits die Schlichtheit des in dieser Arbeit verwendeten Protokolls, andererseits aber auch die unbedingte Notwendigkeit einer genauen Selektion des geeigneten Gewebes bei der Subkultur des embryogenen Kallus.

Bei einem Teil der somatischen Embryonen kam es während dieser Arbeit im Zuge ihrer Entwicklung zu Fehlbildungen. Es wurden Embryonen mit nur einem oder mehr als zwei Kotyledonen beobachtet und auch solche, bei denen sie becherartig verwachsen waren. Diese Beobachtung war auch bei anderen Autoren verbreitet (Roberts *et al.* '90; Rout *et al.* '91; Kunitake *et al.* '93; Marchant *et al.* '96; Murali *et al.* '96 und Visessuwan *et al.* '97). Der Anteil an fehlerhaft entwickelten Embryonen konnte von Roberts *et al.* ('90) durch die Zugabe von 1 μM GA₃ (und ABA) während der Differenzierung verringert werden, das im hier verwendeten Proliferationsmedium standardmäßig (3 μM) enthalten war. Marchant *et al.* ('96) beobachteten einen günstigen Effekt durch die Vermeidung von Prolin im Medium während der Embryo-Reifung, welches im hier verwendeten Protokoll nicht zum Einsatz kam. Visessuwan *et al.* ('97), erhielten mit ihrem Protokoll bei *Rosa canina* sogar zunächst ausschließlich missgebildete Embryonen. Eine relativ niedrige Keimungsrate von neun bis 17 % (Marchant *et al.* '96), 12 % (Rout *et al.* '91) und z. T. nur 2 bis 3 % (Kunitake *et al.* '93; Kintzios *et al.* '99) ging mit der Beobachtung von missgebildeten Embryonen einher, da diese zum Auskeimen nicht in der Lage waren. Neben Missbildungen der Kotyledonen wurden in dieser Arbeit auch Embryonen ohne Wurzelpol beobachtet, wenn sie dort mit Kallusgewebe verwachsen waren, wo sich dieser eigentlich hätte befinden sollen. Anhand der beige-weißen Färbung und der meist zwei Kotyledonen waren diese Strukturen eindeutig von Sprossprimordien zu unterscheiden. Auch diesen Befund teilen andere Autoren (Rout *et al.* '91; Matthews *et al.* '94). Li *et al.* ('02) beobachteten ebenfalls in Abhängigkeit von verschiedenen Phytohormonen nur unipolares Sprosswachstum.

Im Rahmen dieser Arbeit keimten die somatischen Embryonen nur in Ausnahmefällen aus. Stattdessen wurden an den somatischen Embryonen über eine Kallusphase Adventivsprosse induziert, wie auch Dohm *et al.* ('01) beschrieben hatten. Diese Art der Regeneration wurde auch von Visessuwan *et al.* ('97) für fehlerhaft entwickelte Embryonen angewendet, wie sie bei SEG häufig zu beobachten sind. Yokoya *et al.* ('96) beobachteten *de-novo*-Sprossbildung neben keimenden Embryonen auf demselben Medium.

5.5 Produktion transgener Pflanzen

5.5.1 Konstrukt

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid *pHKvst* basiert auf dem Vektor *pGPTV* und beinhaltet auf der T-DNA als “gene of interest“ das *vstI*-Gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.). Es codiert für das Enzym Stilbensynthase (STS), das aus den Substraten p-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA das Produkt Resveratrol synthetisiert (Hain *et al.* '93). Stilbene werden auch in anderen Pflanzen wie Erdnuss (*Arachis hypogea*) und Kiefer (*Pinus sylvestris*) gebildet (Hain *et al.* '93). Das *vstI*-Gen im verwendeten Konstrukt steht unter der Kontrolle des eigenen UV- und Elicitor-induzierbaren Promotors, um Einflüsse der Genexpression auf die Pflanzen, wie veränderte Blütenfarbe oder männliche Sterilität weitmöglichst auszuschließen (Teuschel '98). Das *vstI*-Gen ist schon in mehrere andere Pflanzen transformiert worden (Hain *et al.* '90; Stark-Lorenzen *et al.* '97; Kobayashy *et al.* 2000). Dort hat seine heterologe Expression zu einer gesteigerten Resistenz gegen phytopathogene Pilze geführt (Hain *et al.* '93; Leckband und Lörz '98; Hipskind und Paiva 2000; Liang *et al.* 2000; Coutos-Thévenot *et al.* '01). Da im Genpool der Kulturrosen bisher keine natürlichen Resistenzen bekannt sind und Kreuzungen mit Wildarten aufwändig und aufgrund von Unterschieden im Ploidiegrad schwierig sind, sollte dieser Effekt bei erfolgreicher Transformation auch in der Gattung *Rosa* untersucht werden. Daher wurde im vorliegenden Ansatz statt eines Reportergens von Anfang an ein funktionales Gen eingesetzt. Drei Autoren, die Rosen transformiert haben, verwendeten ebenfalls Gene mit antifungal wirksamen Produkten: Marchant *et al.* ('98, Chitinase), Dohm *et al.* ('01, RiP, Chitinase und Glucanase) und Li *et al.* ('03, *Ace-AMPI*). Andere übertrugen *rol*-Gene von *Agrobacterium rhizogenes* zur Veränderung der Pflanzenarchitektur (Souq *et al.* '95, van der Salm *et al.* '97), das antibakterielle Cecropin B (Derks *et al.* '95) und das Gen für Chalconsynthase in Antisense-Orientierung zur Veränderung der Blütenfarbe (Souq *et al.* '95).

Allen Transformationsvektoren für den Gentransfer in Rosen war gemeinsam, dass sie das ursprünglich bakterielle *nptII*-Gen (*aph3'*) unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promotors in der T-DNA beinhalteten, das eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Es kodiert für eine O-Phosphotransferase, die das Kanamycin-Molekül an einer freien 3'-OH-Gruppe phosphoryliert, so dass es nicht mehr an Ribosomen binden kann und damit seine Wirkung ausschaltet. Die eingesetzten Konzentrationen des Aminoglykosid-Antibiotikums lagen bei 250 bis 300 mg/L (Marchant *et al.* '98, Derks *et al.* '95, Firoozabady *et al.* '94) oder bei 60 mg/L (Dohm *et al.* '01 b). Van der Salm *et al.* ('97) setzten nur 5 mg/L ein.

Einen sicheren Schutz vor der Entstehung von genetischen Chimären bietet die Selektion mit Antibiotika wie Kanamycin jedoch nicht. Chen *et al.* ('01) beschrieben sogar im Gegenteil die Rate an “escapes“ bei Kanamycin-Selektion als hoch, wenn die optimale Konzentration für das angewendete Protokoll nicht explizit ermittelt worden ist. Jordan und McHughen ('88) sowie McHughen und Jordan ('89) beispielsweise erhielten bei Kanamycin-Selektion auf transgene Sprosse nach Transformation von Flax (*Linum usitatissimum*) “escapes“ und

chimäre Regenerate. Domínguez *et al.* (‘04) berichteten bei Citrus sogar von 60 bis 90 % “escapes“ in vorangegangenen Publikationen und haben selbst Regenerate von Explantaten ohne Transformationsereignisse erhalten. Auch bei Rosen gibt es ähnliche Ergebnisse. Li *et al.* beispielsweise beobachteten 2002 nur in zehn von 120 Regeneraten GUS-Aktivität und wiesen ein Jahr später (Li *et al.* ‘03) in nur 62 % der Regenerate transgene Sequenzen mittels PCR nach, was auf Chimären schließen lässt.

Die Übertragung von bakteriellen Resistenzen gegen Antibiotika in Pflanzen wird von Kritikern häufig als Argument gegen die grüne Gentechnik eingesetzt und ist dazu geeignet Ängste bei den Verbrauchern zu schüren.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher statt der Kanamycin-Resistenz *nptII* das *bar*-Gen (Bialaphos-Resistenz) verwendet, das aus *Streptomyces hygroscopicus* stammt und eine signifikante Sequenzhomologie zum *pat*-Gen aus *S. viridochromogenes* aufweist (Dröge *et al.* ‘92, Devine *et al.* ‘93). Beide Gene codieren für eine Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (PAT), die die Wirkung von Phosphinothricin auf die Pflanze inhibiert, indem es den Wirkstoff acetyliert. Die Selektion der transformierten Gewebe erfolgt mit Glufosinat. Dabei handelt es sich, da es technisch hergestellt wird, um das Racemat des natürlicherweise nur in der L-Form vorkommenden Phosphinothricins. Dieses ist der wirksame Bestandteil von Totalherbiziden, die unter den Namen Ignite[®], Radicale[®], Finale[®] (Hoechst) und Basta[®] oder Liberty[®] (Bayer) vermarktet werden (Miki und McHugh ‘04). Das auf dieser Substanz basierende Selektionsprinzip ist schon von vielen Autoren bei über 50 Pflanzenarten aus mehr als 20 Familien eingesetzt worden, wie die Literaturrecherche ergeben hat, aber noch nicht in der Familie der *Rosaceae* mit Ausnahme von Apfel (*Malus*) in unserem Labor (Szankowski *et al.* ‘03). Unter dem Aspekt der öffentlichen Akzeptanz bietet dieses System deutliche Vorteile gegenüber Antibiotika-Resistenzen.

5.5.2 Transformationsmethode

Von den zahlreichen Protokollen zur Regeneration von Rosen über SEG sind fünf auch für die Transformation genutzt worden. Da sie auf der Gewebekultur aufbauten, waren sie in gleicher Weise wie ihre Grundlage in vielen Punkten verschieden und in der Anwendung und Anwendbarkeit auf einen oder wenige Genotypen beschränkt. Auch die Parameter der Transformation unterschieden sich von Fall zu Fall: Fünf der Autoren verwendeten den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer und benutzten unterschiedliche Stämme sowohl von *A. tumefaciens* als auch von *A. rhizogenes*. Marchant *et al.* (‘98) dagegen transformierten mittels Partikel Bombardement.

5.5.2.1 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation

Der wesentliche Unterschied zwischen der vorliegenden Arbeit und der von Dohm *et al.* (‘91) einerseits und den anderen Transformationsberichten andererseits war die Art des Gewebes, das co-kultiviert wurde. Van der Salm *et al.* (‘97) transformierten Sprosssegmente und regenerierten daran transgene Adventivwurzeln, an denen dann erst SE induziert und Pflanzen

regeneriert wurden. Das Vorgehen der anderen Autoren (Derks *et al.* '95, Firoozabady *et al.* '94, Marchant *et al.* '98) war mit dem hier angewendeten Verfahren besser vergleichbar, bei dem SE das Zielgewebe der DNA-Übertragung waren. Sie hatten allerdings einen früheren Schritt im Ablauf der Regeneration gewählt und embryogenen Kallus transformiert. Souq *et al.* ('95) probierte beide Gewebe aus, berichteten aber von den SE ausgehend im Gegensatz zu Dohm und den Ergebnissen dieser Arbeit nicht von transgenen Pflanzen. Die Verwendung reifer SE als Zielgewebe bietet zwei entscheidende Vorteile:

Es verringert zum einen den Arbeitsaufwand an Gewebekultur für die Bereitstellung von Material für die Transformation. Der EC mit noch jüngeren Stadien der SEG kann weiter propagiert werden und erneut reife SE hervorbringen, statt in der Co-Kultur verwendet zu werden, so dass immer wieder neu SEG induziert werden muss.

Der zweite Grund ist besonders für die vorliegende Arbeit von Bedeutung. Anders als eine Kallusmasse stellt jeder Embryo ein klar definiertes und räumlich abgegrenztes Explantat dar, das separat von den anderen kultiviert werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, alle regenerierten Pflanzen bis zu ihrem Ursprung zurück zu verfolgen.

Die Co-Kultur dauerte drei Tage, wie auch bei Derks *et al.* ('95) und Firoozabady *et al.* ('94) und erfolgte wie bei ihnen und Dohm *et al.* ('01 b) auch auf dem für die aktuelle Phase der Regeneration entsprechenden Medium, in unserem Fall also auf dem für Sprossinduktion.

5.5.2.2 Unterdrückung des Bakterienwachstums

Nach Beendigung der Co-Kultur wurden die Explantate zur mechanischen Entfernung der Agrobakterien mehrfach gewaschen. Damit die am und im Pflanzengewebe verbliebenen Mikroorganismen sich dort nicht weiter vermehren konnten, wurden verschiedene Antibiotika eingesetzt. Diese dürfen die pflanzlichen Zellen nicht beeinträchtigen. Es handelt sich um Substanzen, die spezifisch die Synthese der bakteriellen Zellwand verhindern. Diese Wirkungsweise bedingt es jedoch, dass sie nicht bakterizid wirken, sondern nur eine bakteriostatische Wirkung haben. In der vorliegenden Arbeit wurden während der ersten drei Wochen 400 mg/L des Cephalosporins Cefotaxim und 100 mg/L des Penicillins Ticarcillin eingesetzt. Beide Substanzen gehören zur Gruppe der β -Laktam-Antibiotika, deren Struktur, wie die des Penicillin-Moleküls, auf dem β -Laktam-Ring aufbaut. Diese Ringstruktur kann vom Enzym β -Laktamase gespalten werden, das viele Bakterien exprimieren und so das Antibiotikum unwirksam machen. Um dies zu vermeiden, wurde dem Medium auch 100 mg/L Combaktam, ein β -Laktamase-Inhibitor, zugesetzt.

Um einen (negativen) Einfluss auf die Explantate durch Antibiotika-Zusätze im Medium nach Möglichkeit auszuschließen, sollte die Konzentration so gering wie möglich gehalten werden. Mit der zweiten Subkultur wurde die Antibiotika-Konzentration auf 250 mg/L Cefotaxim, 50 mg/L Ticarcillin und 50 mg/L Combaktam gesenkt. Auch Dohm *et al.* ('01 b) veränderten drei Wochen nach Co-Kultur die Gabe von Antibiotikum. Dort wurde von einer Kombination aus 500 mg/L Cefotaxim und 50 mg/L Carbenicillin zu Timentin (150 mg/L) gewechselt. In den anderen Transformations-Protokollen blieben die Antibiotika-Zusätze konstant. Firoozabady *et al.* ('94) verwendeten für acht Wochen 500 mg/L Carbenicillin, das zwar die

gleiche Wirkung wie Cefotaxim entfaltet, aber viel sensitiver gegen β -Laktamase ist. Derks *et al.* ('95) und van der Salm *et al.* ('97) arbeiteten mit 200 mg/L Cefotaxim und 400 mg/L Vancomycin, zwei Substanzen mit unterschiedlichem Wirkmechanismus. Cefotaxim verhindert die Vernetzung der Peptidoglykan-Bausteine in der Zellwand, indem es an die Transpeptidase bindet und sie so blockiert. Vankomycin gehört zu den Glykopeptid-Antibiotika und verhindert den Transport und die Verknüpfung von Muramyl-Pentapeptiden und damit die Synthese der Peptidoglykan-Zellwandbausteine.

Die jeweils verwendeten Antibiotika sind in den angegebenen Konzentrationen geeignet, die mikrobielle Zellteilung so weit zu unterdrücken, dass die regenerierenden Pflanzen keinen Schaden nehmen und das Wachstum der Agrobakterien nicht makroskopisch sichtbar wird. Sie sind jedoch nicht ausreichend, um die Bakterien aus dem Pflanzengewebe zu eliminieren. Barrett *et al.* ('96) haben in Transformationsversuchen mit pflanzlichem Gewebe von *Brassica*, *Solanum* und *Rubus* Agrobakterien sowohl in den Explantaten als auch in den daraus regenerierten Sprossen nachgewiesen. Die Sprosse waren nach Co-Kultur auf Antibiotika-haltigem Medium regeneriert und alle zehn Tage subkultiviert worden. Sie konnten zeigen, dass die in den von ihnen gewählten Protokollen verwendeten Konzentrationen an Antibiotika (beispielsweise 500 mg/L Cefotaxim) nicht ausreichten, um die Bakterien aus dem Gewebe zu entfernen. Die von ihnen ebenfalls ermittelte minimale bakterizide Konzentration für Cefotaxim lag bei 150 mg/L. In dem Zusammenhang verwiesen sie darauf, dass im Gewebekultur-Medium die vierfache Menge dieser Konzentration eingesetzt werden sollte, um ein Eliminieren der Bakterien zu ermöglichen. Allerdings merkten sie auch an, dass dabei solche Konzentrationen erreicht würden, die phytotoxische Effekte zur Folge hätten. Da dem Medium in der vorliegenden Arbeit weniger als 600 mg/L Cefotaxim zugesetzt worden war, musste damit gerechnet werden, dass in einigen Pflanzen persistierende Agrobakterien nachgewiesen werden würden.

5.5.2.3 Persistierende Agrobakterien

Trotz der durchgängigen Kultur der Regenerate auf Medium mit Antibiotika für mehrere Monate, wurde in einigen Proben von T₀-Pflanzen in der PCR ein Fragment des *picA*-Gens aus dem Agrobakterien-Genom nachgewiesen. Das bedeutet, dass in den Pflanzen immer noch Agrobakterien existierten. Nach Ricci *et al.* (96) können Wildtyp-Stämme von Agrobakterien über Jahre hinweg in Pflanzen persistieren, auch ohne dass dies durch Symptome erkennbar wäre. Das bestätigten auch Martí *et al.* ('99), die pathogene Agrobakterien aus Rosen sowohl mit Krankheitssymptomen als auch ohne isolierten. Darüber hinaus konnten sie nach künstlicher Infektion die Ausbreitung in den Pflanzen sowohl aufwärts als auch abwärts der Stelle nachweisen, an der die Inokulation durchgeführt worden war. Ähnliche Befunde sind auch aus anderen Pflanzen bekannt. Peñalver *et al.* ('94) beispielsweise haben neben anderen Mikroorganismen auch Agrobakterien aus Artischocke (*Cynara scolymus* L.) isoliert und Lehoczy ('71) aus verschiedenen Geweben der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.). El Khalifa *et al.* ('73) wiesen verschiedene Agrobakterien-Stämme indirekt durch sekundäre Tumoren an Blattstielen, Hypokotyl und dem ersten Paar Laubblätter von

“castor“-Bohnen (*Ricinus communis*) nach, wenn sie die Blattspreite der Kotyledonen inokuliert hatten. Mogilner *et al.* ('93) isolierten Agrobakterien aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), *Gynura aurantiaca*, Avocado (*Persea americana*) und Grapefruit (*Citrus paradisi*) nach bis zu 90 Tagen nach Inokulation und konnten die Identität der Bakterien über die T-DNA mittels PCR nachweisen. Matzk *et al.* ('96) gingen noch weiter: Sie untersuchten transformierte und regenerierte Tabakspresse (*Nicotiana tabacum*) *in-vitro* und daraus gewachsene Pflanzen *in vivo*. In allen vegetativen Geweben konnten sie Agrobakterien durch Anreicherungskultur, Immunoblot und im Elektronenmikroskop in einem Zeitraum von 18 Monaten nach Co-Kultur nachweisen.

Der Nachweis persistierender Agrobakterien mittels PCR ist durch ein Fragment des Plasmids möglich, wie Sawada *et al.* ('95) es gezeigt haben. Eine andere Möglichkeit besteht im Nachweis eines Fragments aus dem Genom der Bakterien wie beispielsweise des Pflanzen-induzierbaren Locus *picA* (Rong *et al.* '90, '91), wie auch von Yusibov *et al.* ('94), Kononov *et al.* ('97) und De Buck (2000) durchgeführt, oder des ebenfalls chromosomalen *miaA* (Grayburn und Vick '95). Andere Autoren detektierten Agrobakterien mit der Amplifikation von Fragmenten der Virulenzgene (Haas *et al.* '95; Sawada *et al.* '95). Da Bakterien ihre Plasmide bei hohen Temperaturen, wie sie in den Sommermonaten im Gewächshaus auftreten, verlieren können, ist eine Amplifikation eines Genomfragments verlässlicher. Eine Kontamination mit Wildtyp-Bakterien durch Veredelung, die zu einem irreführenden *picA*-Amplifikat geführt hätte, war ausgeschlossen, da die Pflanzen wurzelecht kultiviert wurden.

In Proben mit *picA*-positivem PCR-Ergebnis gab es keine Möglichkeit zu unterscheiden, ob die Amplifikate der PCRs mit anderen der verwendeten Primerpaare von einem transgenen Locus aus der Pflanze stammten oder vom Plasmid des Bakterienstammes, mit dem die Transformation durchgeführt worden war. Gut zu sehen ist das am Beispiel der Pflanze 18-15. Dort waren nicht nur die PCRs für *vstI* und *bar*, sondern auch für die “border“-Sequenzen und für *nptIII* auf dem “backbone“ positiv, wenn auch die *picA*-PCR positiv war. Bei negativer *picA*-PCR hingegen zeigte sich nur bei den Sequenzen der T-DNA ein Amplifikat und auch im Southern Blot wurden keine “backbone“-Sequenzen detektiert.

Auf die Möglichkeit von falsch-positiven PCR-Ergebnissen haben schon Barrett *et al.* ('96) hingewiesen. Sie konnten mittels PCR von T-DNA-Fragmenten aus isolierten Agrobakterien zeigen, dass in den Pflanzen persistierende Bakterien auch noch mehrere Monate nach der Co-Kultur den für die Transformation eingesetzten Vektor in sich trugen. Die Ergebnisse von Proben mit positiver *picA*-PCR wurden demzufolge in dieser Arbeit von der Auswertung der PCR-Ergebnisse ausgeschlossen.

Dagegen waren alle Proben von Pflanzen der T₁-Generation negativ für *picA*. Über die Samen werden demnach keine Bakterien an die nächste Generation weitergegeben. Dies beobachteten auch Matzk *et al.* ('96), die nur in den vegetativen Teilen transgener Tabakpflanzen persistierende Agrobakterien detektiert haben.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen wie auch die Nachweise der anderen Autoren, dass es nicht möglich ist, persistierende Agrobakterien in T₀-Pflanzen auszuschließen. Soll eine ungewollte Freisetzung gentechnisch veränderter Agrobakterien mit der Freisetzung

transgener Pflanzen sicher vermieden werden, kommt die T₀ dafür nicht in Frage. Es sei denn, es können entsprechend zuverlässige phytosanitäre Maßnahmen etabliert werden oder die verwendeten Vektoren sind mit einem sicher wirksamen Suizid-Mechanismus ausgestattet, der zum Absterben der Bakterien führt, wie modellhaft von Bej *et al.* ('88) beschrieben. Für vegetativ vermehrte Pflanzen wie die Rose bedeutet dies, dass direkt nach Transformation regenerierte Pflanzen aus Gründen der biologischen Sicherheit nicht das Endprodukt darstellen, sondern nur als Prototyp in der konventionellen Züchtung eingesetzt werden können, wo sie das Transgen, nicht jedoch die Agrobakterien an ihre Nachkommen weitergeben.

5.5.3 Ultraschall-Behandlung

In der Regel werden dem mit Agrobakterien zu transformierenden Gewebe gezielt Verletzungen zugefügt, um das Gewebe für die Bakterien gut zugänglich zu machen und durch das Freiwerden von Wundsubstanzen die Gene der *vir*-Region zu induzieren. Dies erfolgte bei van der Salm *et al.* ('97) durch die Präparation der Sprossscheiben. Dohm *et al.* ('01 b) verletzen die Oberfläche der SE auf zwei verschiedene Weisen (pers. Mitteilung): Sie schüttelten die SE entweder zusammen mit Seesand in einem Erlenmeyerkolben für fünf Minuten, ähnlich wie Grayburn und Vick ('95) und Alibert *et al.* ('99) mit Glasperlen bei Sonnenblumen-Explantaten, oder behandelten sie in 2-mL-Reaktionsgefäßen in der Bakteriensuspension für zwei Sekunden mit Ultraschall. Dabei waren Leistung und Frequenz des schon älteren Gerätes nicht mehr zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls mit Ultraschall gearbeitet. Basierend auf den Erfahrungen mit anderen Pflanzen und dieser Methode in unserem Labor, hatten wir deutlich längere Zeiten von zwei und vier Minuten gewählt. Eine solche Anwendung von Ultraschall im Zusammenhang mit *Agrobacterium*-vermittelter Transformation wurde zum ersten Mal von Trick und Finer ('97) beschrieben und als "sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation" (SAAT) bezeichnet. Sie transformierten unterschiedliche Gewebe so verschiedener Pflanzen wie Sojabohne (*Glycine max*), *Vigna unguiculata*, Mais (*Zea mays*), Weizen (*Triticum aestivum*), Rosskastanie (*Aesculus glabra*) und Fichte (*Picea glauca*) und stellten eine erhebliche Steigerung der Transformationseffizienz fest, sowohl auf transienter als auch auf der Ebene stabiler Transformation. Teilweise wurde die Selektion transgenen Gewebes durch die ultra-Beschallung überhaupt erst möglich. Diese Beobachtungen bestätigten sie nochmals mit Suspensionskulturen von Soja (*Glycine max*) (Trick und Finer '98). Die durch die Schallwirkung entstandenen Mikro-Wunden werden mit zunehmender Dauer der Einwirkung größer, wie Trick und Finer ('97) durch Elektronenmikroskopie festgestellt haben. Durch diese Löcher in der Oberfläche der Explantate haben die Agrobakterien leichteren Zugang zum Zielgewebe und können in größerer Zahl auch in tiefer liegende Zellschichten vordringen. Diese Beobachtung belegten Finer und Finer (2000) mit GFP-exprimierenden Agrobakterien sowie Santarém *et al.* ('98) bei der Untersuchung von Faktoren, die einen Einfluss auf die SAAT haben könnten. Weitere Autoren haben die Beobachtung einer gesteigerten Transformationseffizienz in anderen Systemen bestätigt. Tang

(01) hat SAAT auf zygotische Embryonen von *Pinus taeda* angewendet und die Ultraschallbehandlung im Vergleich mit anderen Verletzungsmethoden als die am besten geeignete bewertet. González *et al.* (02) stellten eine deutlich gesteigerte Transformationsrate bei Keimlingen von *Eucalyptus*-Hybriden fest. Nach Amoah *et al.* (01) ist die Ultraschall-Behandlung im Gegensatz zu einigen anderen Faktoren eine notwendige Bedingung für die optimale Transformation von Weizen-Infloreszenzen.

Weber *et al.* (03) beschrieben eine gesteigerte Expression von Reportergenen nach Sonifizierung von Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.). Szankowski *et al.* (03) beobachteten durch Ultraschall eine erhöhte Expressionsrate des Transgens in Blattexplantaten von Apfel (*Malus*).

Auch bei der Transformation von SE von *Rosa hybrida* zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein positiver Effekt. Bereits 15 Wochen nach der Co-Kultur war erkennbar, dass der Anteil überlebender Explantate auf Selektionsmedium bei den mit Ultraschall behandelten deutlich höher als ohne Behandlung war.

Die Beschallung hatte zu einer gesteigerten Transformationsrate und somit zu mehr transgenen Bereichen pro Explantat geführt. Dieser höhere Anteil an transgenem Gewebe konnte das Phosphinothricin effektiver detoxifizieren und es starb weniger Gewebe ab, weshalb mehr Explantate überlebt haben. Dies bestätigte sich anhand der regenerierten transgenen Sprosse, die alle auf Explantate aus Ultraschallbehandlung zurückgingen. Ob möglicherweise längere oder kürzere Ultraschallzeiten zu noch bessere Ergebnisse führen, wäre sicher weitere Untersuchungen wert, da Trick und Finer (97) klar herausgestellt haben, dass jedes Gewebe unterschiedlich auf die Behandlung reagiert und die am besten geeignete daher jedes mal empirisch ermittelt werden müsse. Dass sich die beiden verschiedenen langen Beschallungszeiten am Ende nicht in einer verschieden großen Anzahl regenerierender Explantate widerspiegeln, liegt in der absolut gesehen niedrige Zahl regenerierender Kalluslinien begründet.

5.5.4 “backbone“-Sequenzen

5.5.4.1 ... in der T₀

In den Proben von etwa 40 % der untersuchten Pflanzen wurden Plasmidsequenzen außerhalb der eigentlichen T-DNA mittels PCR und/oder Southern Blot nachgewiesen. Die Primerpaare für die linke und rechte “border“ sind so konstruiert, dass jeweils ein Primer innerhalb und der andere außerhalb der T-DNA bindet. Das entstehende Fragment überspannt dann einen größeren Bereich als nur die jeweilige imperfekte Sequenzwiederholung von 25 bp, die die T-DNA flankiert. Ein Amplifikat mit den Primern für die linke “border“ ist also der Beweis dafür, dass der am Ti-Plasmid gebildete Einzelstrang (T-strand), der bei der Transformation ins Pflanzengenom übertragen wurde, länger als die T-DNA des Plasmids gewesen ist. In einem solchen Fall waren die Pflanzen immer auch für ein Fragment des Kanamycin-Resistenzgenes (*nptIII*) auf dem “backbone“ des Plasmids positiv. Daher muss bei allen

Transformationsereignissen, bei denen die linke "border" nicht erkannt wurde, der Abbruch der Einzelstrangbildung hinter dem *nptIII*-Gen erfolgt sein.

Das Phänomen der Übertragung von Sequenzen außerhalb der eigentlichen T-DNA ist von etlichen Autoren beschrieben worden und tritt mit einer Häufigkeit von 20 % (De Buck *et al.* 2000) bis zu 75 % (Kononov *et al.* '97) auf. Veluthambi *et al.* ('88) haben gezeigt, dass an einem Plasmid (Ti A6) mit vier "border"-Sequenzen alle sechs theoretisch denkbaren verschiedenen langen T-DNAs gebildet werden. Daraus folgt, dass der Übertragung von "backbone"-Sequenzen zwei Mechanismen zugrunde liegen: In einem Fall erfolgt die Initiation der T-Strang-Bildung nicht nur an der rechten, sondern auch an den anderen, bei nur zwei flankierenden Sequenzen also an der linken "border", so dass der T-Strang vom Plasmid-Rückgrat gebildet wird. Dadurch entsteht eine "backbone"-Sequenz, die entweder autonom übertragen wird oder über die rechte "border" mit der T-DNA verbunden ist, wenn diese nicht als Endpunkt der T-Strangbildung erkannt wurde. Der zweite Mechanismus, der zur Übertragung von "backbone"-Sequenzen führt, ist eine T-Strangbildung von der rechten "border" ausgehend über die linke hinaus.

Beides ist in der vorliegenden Arbeit beobachtet worden. Southern-Banden, die nur bei Detektion mit der *nptIII*-Sonde auftreten, nicht jedoch mit den anderen Sonden, bezeichnen Fragmente, in denen ausschließlich "backbone"-Sequenzen integriert sind. Dieser transgene Locus ist nach dem ersten Mechanismus (siehe oben) entstanden.

Solche Fragmente, die sowohl mit der *nptIII*- als auch mit den *vst*-Sonden hybridisiert haben und ein Signal an derselben Stelle lieferten, beinhalteten sowohl die T-DNA als auch "backbone"-Sequenzen. Diese können nur über die linke "border" verbunden sein, da in keiner PCR das Fragment amplifiziert worden, das die rechte "border" überspannt. Demnach liegt diesen Signalen ein Insert zugrunde, das nach dem zweiten Mechanismus entstanden ist, und die Einzelstrang-Übertragung ist entweder vor oder erst direkt an der rechten "border" abgebrochen. Ob dabei die Bildung des T-Stranges zwischen dem *nptIII*-Gen und der rechten "border" abgebrochen ist oder die transgene Insertionen aus der gesamten Plasmidsequenz bestanden, kann nicht in allen Fällen entschieden werden, da die entsprechenden Fragmente in der Southern Blot-Analyse oft größer als das Plasmid (rund 15 kb) sind. Dass die Einzelstrangbildung am Ti-Plasmid nicht nur über die linke "border" hinausgeht, sondern über den gesamten "backbone" fortgesetzt wird, auch an der rechten "border" nicht endet und danach an der T-DNA ein zweites Mal stattfindet, wie von Wenck *et al.* ('97) beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da alle PCRs für die rechte "border" negativ waren. Alle aufgeführten Mechanismen sind von mehreren Autoren in unterschiedlicher Häufigkeit und Zusammensetzung beschrieben worden (De Bond *et al.* 2000; Kononov *et al.* '97; Kuraya *et al.* '04; Shou *et al.* '04). Auch mit dem neuen Vektorsystem pGreen/pSoup hat sich daran nichts grundlegendes geändert, wie sich bei Vain *et al.* ('03) gezeigt hat, bei denen 45% der transgenen Reislinien "backbone"-Sequenzen enthielten.

Eine Ursache für das gelegentliche Ignorieren der linken "border" sehen Wenck *et al.* ('97) in einer suboptimalen Expression und daher einer zu geringen Aktivität der Virulenzfaktoren,

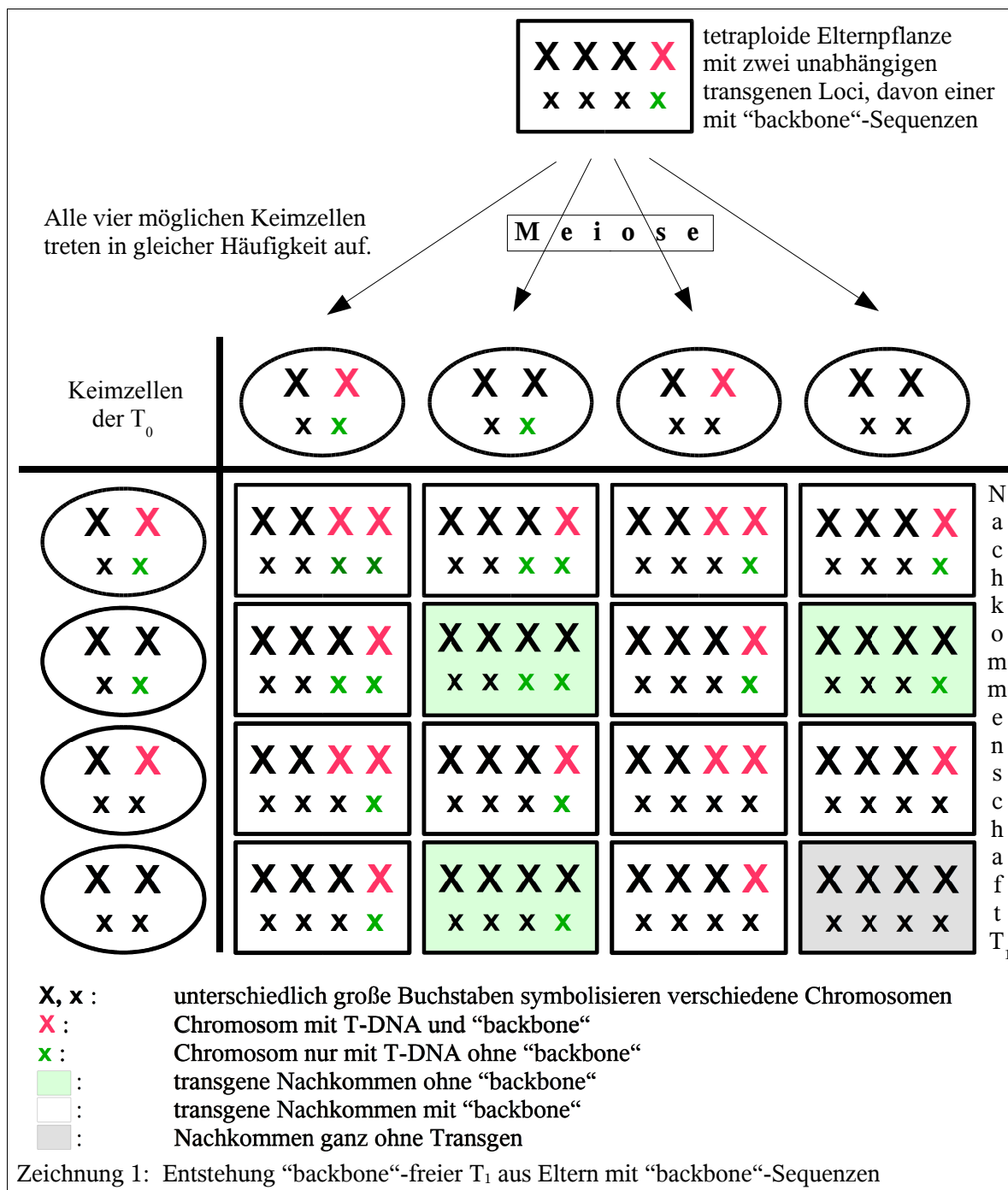
besonders des *VirD2*. In Wildtyp-Plasmiden ist dessen Verhältnis zur Anzahl der “border“-Sequenzen 1:1 oder 1:2, da sie sich auf demselben Vector befinden, während es in binären Vektorsystemen aufgrund unterschiedlich vieler Kopien der beiden Plasmide ungünstiger ausfällt. Auch der Sequenz-Kontext, in dem die “border“-Sequenzen stehen, hat einen Einfluss auf die Frequenz der “backbone“-Übertragung, wie DeBond *et al.* (2000) gezeigt haben.

“Backbone“-Sequenzen können einen negativen Einfluss auf die Expressionsstabilität eines transgenen Locus haben. Dafür werden im wesentlichen repetitive Bereiche wie der Replikationsursprung sowie der vergleichsweise hohe GC-Gehalt der ursprünglich bakteriellen Plasmidsequenz verantwortlich gemacht, der die Pflanzenzelle zur Stilllegung (silencing) des DNA-Abschnitts durch Methylierung einschließlich der benachbarten Transgene veranlasst. Aber nicht alle Linien, die Vektoranteile enthalten, sind bezüglich der Merkmalsausprägung des Transgens instabil (Pickardt und De Kathen '02).

Der Nachweis, dass “backbone“-Sequenzen außerhalb der eigentlichen T-DNA in Pflanzen übertragen werden können, zeigt die Notwendigkeit auf, sie vor einer Freisetzung auf diese Sequenzen hin zu untersuchen (Ramanathan und Veluthambi '95). Und nicht zuletzt wird von den für die Genehmigung zuständigen Behörden verlangt, dass Pflanzen frei von Vektor-“backbone“-Sequenzen sein sollen, wenn sie auf den Markt gebracht werden (De Buck *et al.* 2000). Erst kürzlich haben Kuraya *et al.* ('04) eine deutliche Reduzierung des Anteils Transformanten mit “backbone“-Sequenzen erreicht, indem sie mehrere Sequenzwiederholungen der linken “border“ hintereinander kloniert haben.

5.5.4.2 ... in der T₁

Die transgene Nachkommenschaft der T₀-Pflanzen hatte bis auf vier Ausnahmen die “backbone“-Sequenzen von ihrem jeweiligen Elter geerbt. Die Nachkommen, die im Gegensatz zu ihrem Elter nur für T-DNA-Sequenz transgen waren, ermöglichen verschiedene Erklärungsansätze: Die zufällige Trennung eines überlangen transgenen Locus der Mutterpflanze zwischen *bar*-Gen und linker “border“ durch ein Crossover-Ereignis in der Meiose ist eine Möglichkeit. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Ereignisses ist jedoch äußerst gering. Die zweite Möglichkeit ist, dass die T₀-Pflanze aus zwei genetisch unterschiedlichen Anteilen bestand, von denen nur einer “backbone“-Sequenzen enthielt, wie auch von Kononov *et al.* ('97) beschrieben. Tochterpflanzen ohne diese Sequenzen sind dann aus Keimzellen des einen Teiles entstanden, Tochterpflanzen mit “backbone“-Sequenzen aus dem anderen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die T₀-Pflanzen mehrere ungekoppelte transgene Loci mit und ohne “backbone“-Sequenzen besaßen. Diese wurden in der Meiose voneinander getrennt und die Tochterpflanzen sind zufällig aus Keimzellen entstanden, die nur die T-DNA beinhalten, so wie das im Folgenden schematisch dargestellt ist:



5.5.5 Regeneration und Selektion transgener Pflanzen

5.5.5.1 Kallus – Regeneration

Im Zuge der Regeneration wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass sich aus den SE zunächst kallöse Strukturen bildeten. Diese wurden auch von Dohm *et al.* ('01 b) beschrieben, jedoch von keinem der anderen Autoren, die ebenfalls einen Teil der Sprosse statt durch Keimung der SE über Adventivprossbildung regeneriert haben (Yokoya *et al.* '96; Visessuwan *et al.* '97). Die Kallusphase sollte dazu genutzt werden, unter zunehmendem Selektionsdruck transgenes Gewebe anzureichern. Nicht transformierte Zellen sollten am Wachstum gehindert

und zum Absterben gebracht werden, so dass eine Entmischung des nach der Co-Kultur heterogenen Gewebes aus transgenen und nicht-transgenen Zellen erzielt werden konnte. Dieses Ziel wurde nicht erreicht, wie im Abschnitt "Entstehung von Chimären" näher erläutert wird.

Wir haben im Zuge dieser Arbeit die sofortige Selektion transformierter SE nach der Co-Kultur mit der Selektion beginnend nach drei Wochen verglichen, wie sie bei Dohm *et al.* ('01b) mit Kanamycin durchgeführt wurde. Schon nach 18 Tagen war ein Vorteil der später einsetzenden Selektion zu erkennen. Die Anzahl der überlebenden Explantate war höher als in der von Anfang an selektierten Gruppe. Die Anzahl der sofort selektierten Explantate war nach drei Wochen auf 2 mg/L Glufosinat schon auf etwa 1/5 der eingesetzten Anzahl reduziert. Die Kalli der später selektierten Gruppe waren erst nach 15 Wochen in gleichem Maße abgestorben, nachdem eine Glufosinat-Konzentration von 10 mg/L im Medium erreicht war. Bei der sofortigen Selektion werden mit dem absterbenden, nicht transgenen Gewebe auch zahlreiche transgene Zellen vernichtet, die durch sie umgebende tote Zellmasse von Licht und Nährstoffversorgung abgeschnitten waren und möglicherweise durch die Freisetzung von Polyphenolen zum Absterben gebracht wurden. Das selektive Agens hat in dieser frühen Zeit auch bei einer niedrigen Dosis von 2 mg/L einen relativ großen Effekt, da die transgenen und damit resistenten Bereiche noch sehr klein und im Verhältnis von einer großen Masse sensitiven Gewebes umgeben sind.

Mit sofortigem Selektionsdruck nach Co-Kultur zeigten sich nach den ersten drei Wochen keine Unterschiede zwischen ultra-beschallten und nicht beschallten Explantaten. Ohne Selektion in den ersten drei Wochen konnte eine höhere Transformationseffizienz bei den sonifizierten beobachtet werden. Die Verletzungen durch die Ultraschallbehandlung und die damit einhergehende stärkere Besiedelung durch die Agrobakterien können zu einer reduzierten Vitalität führen. In unserem Fall hat diese geringere Vitalität aber nur anfänglich zu weniger überlebenden Explantaten geführt. Dies wird allerdings nur bei den später selektierten Kalli deutlich. Bei sofortiger Selektion war das Gewebe allein durch deren Wirkung so stark angegriffen, dass ein Einfluss durch Ultraschallbehandlung auf die Vitalität dahinter nicht zu erkennen war.

5.5.5.2 Spross – Regeneration

Die Dosis des selektiven Agens wurde in den Versuchen für diese Arbeit im Verlauf von 15 Wochen in mehreren Schritten bis auf eine Konzentration von 10 mg/L gesteigert und auf diesem Niveau beibehalten. Marchant *et al.* ('98) selektierten den EC, bis die SE daran ausgereift und zum Keimen bereit waren und Dohm *et al.* ('01 b) beendeten die Selektion, wenn die regenerierten Adventivsprosse von den SE als Sprosskulturen etabliert waren. Firoozabady *et al.* ('94) setzten das Kanamycin sogar nur für vier Wochen während der Regeneration ein.

Die Differenzierung von Sprossen an Kalli ohne Transformation erfolgte innerhalb weniger Wochen, so dass die ersten Sprosse nach acht bis zehn Wochen vom Ausgangsexplantat getrennt werden konnten. Nach einer Transformation einschließlich Selektion dauerte die

Regeneration erheblich länger. Der erste potentiell transgene Spross wurde neun Monate nach der Co-Kultur vom Kallus getrennt. Die Phase der weiteren Sprossdifferenzierung dauerte noch einmal etwa neun Monate. Dies ist die doppelte Zeitspanne, die Dohm *et al.* ('01 b) bei Selektion mit Kanamycin benötigten.

Durch Kanamycin wird die Proteinbiosynthese gestoppt, wodurch der Stoffwechsel zum Erliegen kommt und die Zellen sich nicht mehr teilen können. Bei diesem Prozess bleiben die sensitiven Zellen relativ lange vital und behindern das transgene Gewebe nicht. Eine Substitution sensitiver Zellen durch transformiertes Gewebe ist nicht zu erwarten, da durch die Bindung von Kanamycin an Ribosomen diese Struktur der Proteinsynthese blockiert wird und es für Zellen bei Mangelzuständen keinen Mechanismus gibt, die benötigten Proteine aus anderen Zellen zu beziehen.

Die Wirkung von Phosphinothricin beruht auf anderen Mechanismen. Es unterbindet die Proteinsynthese, indem es die Bereitstellung von Stickstoff durch Transaminierung für die Produktion von Aminosäuren verhindert. Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg der Konzentration von Ammonium, wodurch die Zellen vergiftet werden und absterben. Für beide Wirkungen ist eine Substitution von sensitiven durch resistente Zellen vorstellbar. Die Proteinsynthese kann durch den Transport von Aminosäuren unterstützt werden, die Ammonium-Anreicherung sowie die damit verbundene pH-Wert-Verschiebung und Entladung von Membranen durch den Austausch von Ammonium- und anderen Ionen abgemildert werden. Ein weiterer Mechanismus des Schutzes von nicht transgenem Gewebe vor Selektion ist die räumliche Abschirmung gegen das Medium mit PPT. Dies kann entweder durch transgene Gewebeteile geschehen, in denen das PPT bereits acetyliert und damit unwirksam gemacht wird, oder durch nekrotisches Gewebe, durch das PPT darüber liegende Zellen nicht mehr erreicht. Durch diese Mechanismen wird es möglich, dass auch Teile von nicht transgenem Gewebe zunächst an der Bildung organisierter Strukturen beteiligt sind, da Sprossmeristeme bei der Organogenese aus mehreren bis vielen Zellen entstehen (McHughen und Jordan '89), die nicht clonalen Ursprungs sein müssen (Mathews *et al.* '95; Schmülling und Schell '93). Nach dem mechanischen Entfernen der nekrotischen Kallusteile bei der Subkultur kann das PPT zunächst wieder ungehindert wirken und die sensitiven Gewebeteile werden am Wachstum gehindert oder sterben ab. Sind sie an der Differenzierung des Gewebes beteiligt, werden die entstandenen Strukturen zerstört und eine Neu-Organisation ist notwendig. Wiederholt sich das mit der Regelmäßigkeit der Subkulturen, dauert es unter Umständen lange, bis transgene und nicht-transgene Bereiche der Kalli so weit getrennt sind, dass es zur ungehinderten Differenzierung von Sprossen kommt.

5.5.6 Nachkommenschaft der T₀

Die nach Transformation regenerierten Pflanzen wurden zur Produktion einer Folgegeneration verwendet, um durch den Vergleich von Eltern und Nachkommenschaft in PCR- und Southern Blot-Analysen Rückschlüsse auf die genetische Konstitution der T₀ und auf die Vorgänge während Transformation und Regeneration ziehen zu können. Dazu wurden die Pflanzen geselbstet.

Um einen höheren Befruchtungserfolg und damit später eine größere Nachkommenschaft für Analysen zur Verfügung zu haben, wäre es denkbar gewesen, anstatt der Selbstungen Kreuzungen mit anderen Genotypen durchzuführen, die bekanntermaßen ein guter Pollenspender oder Pollenakzeptor bei Befruchtung mit Genotyp Hz sind. Dadurch wäre aber auch die Wahrscheinlichkeit erheblich geringer gewesen, dass die Nachkommen transgen sind, da das Fremdgen nur von einem Elter hätte vererbt werden können. Nach Selbstung einer durchgehend transgenen Pflanze sind bei einem einzelnen transgenen Locus 75 % transgene Nachkommen zu erwarten, von denen ein Drittel bereits zwei von vier Chromosomen mit dem Transgen trägt. Nach Kreuzung solcher Pflanzen mit einem nicht transformierten Elternteil liegt der Anteil transgener Nachkommen dagegen lediglich bei 50 %, wobei alle nur ein Chromosom mit Transgen besitzen. Bei zwei unabhängigen Loci ist nach Selbstung mit 90 %, nach einer Kreuzung jedoch nur mit 75 % transgenen Nachkommen zu rechnen.

Da es sich bei den transgenen Elternpflanzen um genetische Chimären handelte, war nicht sicher, ob oder in welchem Maße die Keimzellen aus transgenem Gewebe hervorgehen würden (Dong und McHughen ('93). Es musste damit gerechnet werden, dass die Zahl transgener Nachkommen deutlich niedriger ausfiel, als statistisch bei genetisch einheitlichen Pflanzen zu erwarten gewesen wäre. Deshalb ist die Entscheidung zu Gunsten der Selbstung gefallen und eine möglicherweise reduzierte Fertilität wurde in Kauf genommen.

Die gesamte Nachkommenschaft wird unabhängig von ihrer genetischen Konstitution als T_1 bezeichnet. Ob die Pflanzen transgene Sequenzen geerbt haben oder nicht, hat sich erst in den entsprechenden Analysen herausgestellt.

5.5.6.1 Selbstung der transgenen Pflanzen

Ein eher geringer Ertrag von 16 Hagebutten nach der Selbstbestäubung von 125 Blüten bei durchschnittlich 10,9 Früchten pro Blüte ist in der Rosenzüchtung sowohl bei Selbstungen als auch bei Kreuzungen eine immer wieder beschriebene Tatsache (De Vries und Dubois '83, Gudin '94). De Vries und Dubois ('83) erhielten in einer von ihnen selbst durchgeführten Kreuzung im Durchschnitt nur 8,6 Früchte pro Hagebutte und Gudin ('94) berichtete von zwei Kreuzungen, bei denen er nur bei einer von beiden von 2 % der bestäubten Blüten Hagebutten ernten konnte. Mit dafür verantwortlich ist ein Inkompatibilitätssystem in der Gattung *Rosa*, das zu Problemen bei der sexuellen Kompatibilität und der Fertilität in der T_1 führt (Matthews et al '94). Dieses greift nicht immer hundertprozentig, führt aber oft zu einem stark reduzierten Fruchtansatz (Cole und Melton '86). Außerdem ist der Befruchtungserfolg von zahlreichen Faktoren wie beispielsweise dem pH-Wert des Narben-Exudates (Gudin und Arene '91) und der jahreszeitlich schwankenden Pollenqualität (Gudin et al. '91) abhängig. Letzteres dürfte entsprechend der dort gezeigten Ergebnisse keinen negativen Einfluss auf die Selbstungen gehabt haben. Dabei bleibt der Einfluss besonders hoher Temperaturen unberücksichtigt. Die Maximaltemperaturen im Gewächshaus für die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen liegen in den Sommermonaten deutlich höher, als die von Gudin beschriebenen.

Burger *et al.* ('90) beschrieben, dass die Samenbildung bei Rosen durch das Absterben der sich entwickelnden Embryonen verhindert werden kann, so dass wenig oder gar keine keimfähigen Samen entstehen.

Eine weit

ere mögliche Ursache für den relativ geringen Samenertrag ist die Expression des *vst*-Gens in der Blüte. Es steht im verwendeten Konstrukt unter der Kontrolle seines eigenen Promotors, der unter anderem wundinduzierbar ist. Durch den Befall mit Thripsen konnte er als Folge von Fraßschäden angeschaltet werden. Eine Expression der Stilbensynthese in den Organen der Blüte, konstitutiv oder induziert, führte bei Teuschel ('98) in den Modellpflanzen Petunie (*Petunia hybrida*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) zu stark eingeschränkter männlicher und weiblicher Fertilität und zu einer stark verminderten Keimrate der dennoch entstandenen Samen.

5.5.6.2 Keimung des Saatgutes aus Selbstung

Die Keimung wird bei Rosen von mehreren Faktoren eingeschränkt. Es bedarf einer Vernalisation von mehreren Wochen (Tilber, '83), die jedoch nicht alleine ausschlaggebend für die Keimung ist (Jackson und Blundell '63). Dies bestätigen sowohl die relativ niedrige Keimrate des im Kühlschrank gelagerten (Stratifikation) Saatgutes in dieser Arbeit, als auch die Dauer, bis es zur Keimung kam.

Die von Burger *et al.* ('90) als allgemein niedrig beschriebene Keimraten bei Rosen bestätigten sie mit eigenem Saatgut aus drei Kreuzungen sowie einer Selbstung (2,8 % bis 22,5 %). Gudin *et al.* ('90) stellten in zwei Kreuzungen von *R. hybrida* (Keimrate 5,8 und 16,9 %) einen Zusammenhang zwischen der Keimfähigkeit der Achänen und sowohl der Dicke der innersten Schicht des Perikarp (Endokarp) als auch dem Zeitpunkt der Bestäubung und dadurch der Temperatur während der Samenentwicklung fest. Auch Marchant *et al.* ('94) beschrieben eine niedrige Keimrate von oft weniger als 20% oder sogar den Ausfall ganzer Nachkommenschaften als ein Hauptproblem in der Rosenzüchtung. Sie konnten zeigen, dass das Vorhandensein von Perikarp und Testa ein wesentlicher Grund dafür war und ihr Entfernen den Keimungserfolg erheblich steigerte. Daraus schlossen sie, ähnlich wie Jackson und Blundell ('63), auf Substanzen mit keimhemmenden Eigenschaften in Kombination mit einem physikalischen Effekt des Perikarp. Tillber ('83) zeigte, dass die Reduktion der sameninternen ABA-Konzentration eine, aber nicht die alleinige Voraussetzung für die Keimung von Rosensamen war. Unabhängig davon bedurfte es auch einer Kältebehandlung.

5.5.6.3 Wachstum der T₁-Pflanzen

Die Verluste einiger Nachkommen aus den Selbstungen sind im Wesentlichen auf Inzuchteffekte zurückzuführen. Die meisten Zuchtsorten der Rose sind tetraploid und in hohem Maße heterozygot (Kaufmann *et al.* '03). Daher greifen bei Kreuzungen mit diesem Material die Mendelschen Regeln nicht, die homozygote Eltern voraussetzen. Weitgehende Heterozygotie in polyploiden Eltern führt in Kreuzungen dazu, dass durch die Kombinationsmöglichkeiten homologer Chromosomen und die Rekombination durch

Crossover-Ereignisse in der Meiose bereits in der ersten Folgegeneration Variation entsteht. Aus diesem Grund werden neue Genotypen und Zuchtlinien in der Rosenzüchtung schon aus der T_1 selektiert. Deren Selbstung zur Produktion der F_2 ist nicht notwendig und wird nicht durchgeführt. Das bedeutet, dass die Kreuzungseltern bei der Züchtung in der Regel die in hohem Maße heterozygoten Nachkommen aus vorangegangenen Kreuzungen sind, wodurch der hohe Grad an Heterozygotie aufrechterhalten bleibt. Werden heterozygote Pflanzen geselbstet, wie hier geschehen, nimmt der Anteil homozygoter Genorte zu. Betrachtet man dominant-rezessive Erbgänge und nimmt im heterozygoten Elter die gleiche Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen von einem, zwei und drei rezessiven Allelen an, so entsteht bei freier Kombinierbarkeit aller homologer Chromosomen und der gleichen Befruchtungswahrscheinlichkeit für alle Keimzellen, in 17 % der Fälle homozygote Rezessivität für einen Genort. Dies kann zu Inzuchteffekten wie geringer Vitalität und erhöhter Anfälligkeit der Pflanzen führen und in extremen Fällen zum Absterben.

Trotz höherer Homozygotie zeigte sich in der Selbstungsgeneration eine große Variationsbreite. Arene *et al.* ('93) erhielten durch Regeneration aus zygotischen Embryonen nach Selbstung 70% Variationen von der Elternpflanze. Dies betraf Anzahl, Form und Farbe der Blütenblätter sowie den Habitus der Pflanzen und schloss auch Zwergwüchsigkeit ein. Die Tatsache, dass die Mehrheit der Nachkommen der T_0 mit rosafarbenen, gefüllten Blüten ebenfalls diese Phänotypen zeigten, bestätigte die Beobachtung von Debener ('99) bezüglich Färbung und Füllung der Blüten. Er hatte nach Kreuzungsexperimenten mit diploiden Rosen für beide Merkmale eine monogenische Vererbung postuliert, bei denen die Allele für gefüllte und rosa gefärbte Blüten jeweils dominant sind.

5.5.6.4 PCR der T_1

In der T_1 Generation erwiesen sich von 42 Pflanzen 24 positiv in den PCRs für *vst* und *bar*. Das entspricht einem Aufspaltungsverhältnis von transgenen zu nicht transgenen Pflanzen von 4 : 3 bzw. 1,3 : 1 oder einem Anteil an Transgenen von 57%. Diese Werte liegen deutlich unter denen, die von einheitlich transformierten Pflanzen zu erwarten gewesen wären. Bei einem transgenen Locus müsste die Aufspaltung 3 : 1 ausfallen, was einem Anteil von 75 % Transgenen entsprechen würde.

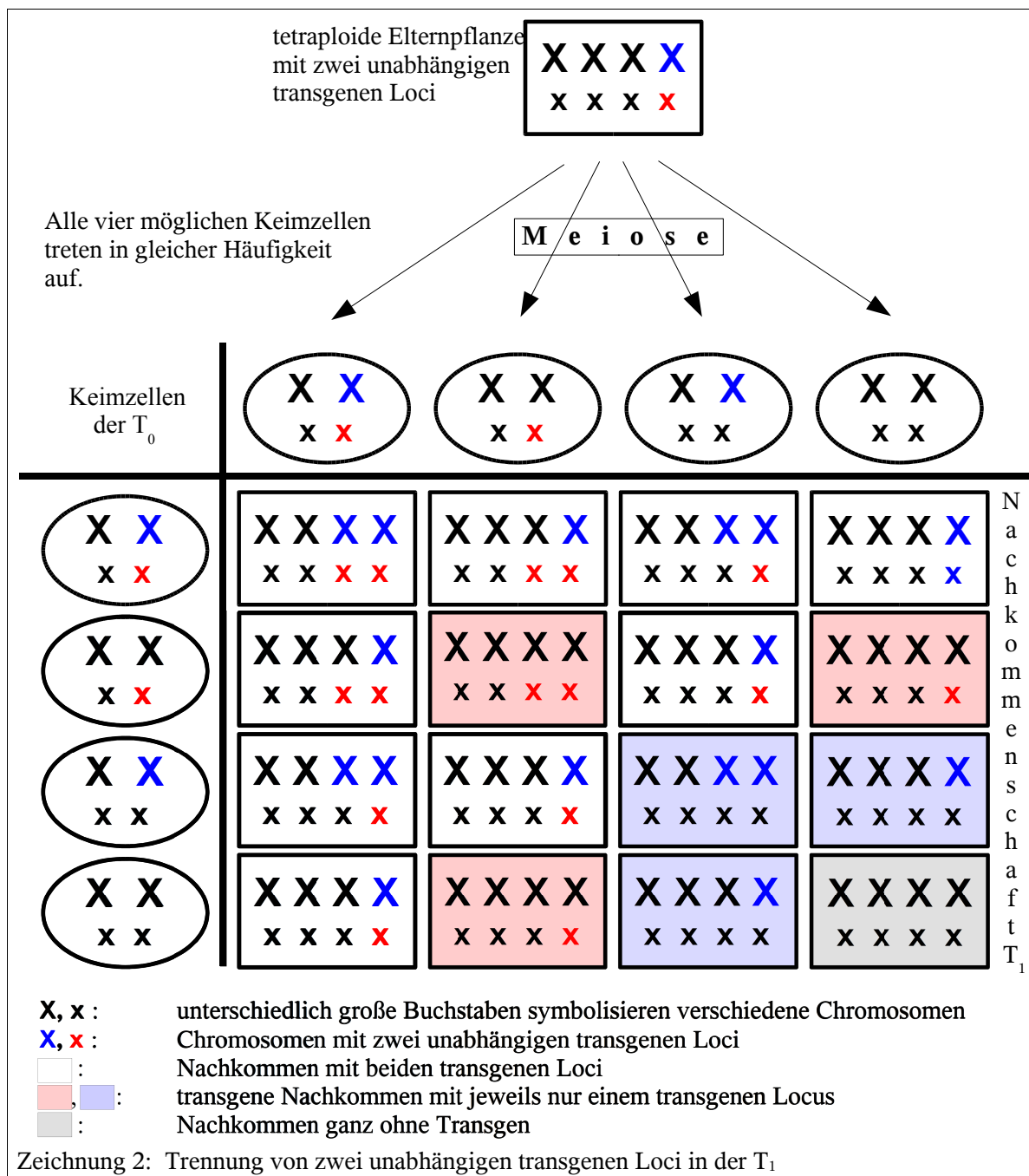
Bei zwei transgenen Insertionen auf unterschiedlichen Chromosomen ist ein Verhältnis von 15 : 1 zu erwarten, so dass 93,75 % der Nachkommen transgen sind.

Selbst wenn in den T_0 -Pflanzen mit mehrfachen Insertionen alle gekoppelt auf demselben Chromosom lokalisiert wären, waren die transgenen Nachkommen in der T_1 erheblich unterrepräsentiert. Dies zeigt wiederum, dass nicht alle Vorläuferzellen der Keimzellen ein Transgen trugen (McHughen und Jordan '89). Bei der Betrachtung einzelner Eltern und ihrer T_1 wurde das besonders deutlich: Von Pflanze 18-02 war keiner der Nachkommen transgen und bei 18-15 nur einer von sechs. Es gibt einige Berichte über Nachkommen transformierter Pflanzen, bei denen die Transgenen deutlich unterrepräsentiert sind. McSheffrey *et al.* ('92) wie auch Dong und McHughen ('93) haben beobachtet, dass unter den Selbstungsnachkommen einiger transformierter Flachs-Linien zu wenige oder gar keine Transgenen

auftraten, und das auf chimäre Eltern zurückgeführt. Parrott *et al.* ('89) erhielten von drei transformierten Soyapflanzen überhaupt keine transgenen Nachkommen, obwohl Transgene in der T₀ im Southern Blot nachgewiesen wurden. Auch Stoger *et al.* ('98) beobachteten eine stark reduzierte Anzahl transgener Nachkommen einiger Weizen-Transformanten und in einer Linie sogar gar keine transgenen Nachkommen trotz der sieben *bar*-Kopien, die beim Elter nachgewiesen worden sind.

5.5.6.5 Southern Blot-Analyse der T₁

Bei den meisten Pflanzen der T₁ zeigte sich das gleiche Bandenmuster wie bei ihrem Elter, sie hatten also alle transgenen Loci geerbt. Andere Tochterpflanzen zeigten eine oder mehrere



Banden weniger als ihr Elter. Sie sind aus Keimzellen hervorgegangen, die nur einen Teil der Transgene beinhalten. Dies kann durch Rekombination in der Meiose zustande gekommen sein. Allerdings nur, wenn die transgenen Insertionen nicht gekoppelt waren. Die Wahrscheinlichkeit für die Trennung zweier unabhängiger transgener Orte während der Reifeteilung beträgt 50 % für alle Keimzellen, da die Transgene in der T_0 jeweils nur auf einem der vier homologen Chromosomen vorliegen. Die Wahrscheinlichkeit, nur einen der beiden transgenen Loci zu erben, liegt dann für alle Nachkommen bei 6/16 oder 37,5 % und innerhalb der transgenen bei 6/15 oder 40 %, vorausgesetzt alle Keimzellen haben die gleichen Chancen auf Befruchtung.

Die zweite Möglichkeit bestand darin, dass die genetischen Unterschiede der Keimzellen die genetisch chimären Charakter innerhalb der Elternpflanze widerspiegeln.

In den drei Fällen (18-04(07)II, 18-04(11)II, 18-14(14)IV), in denen in der T_1 mehr Southern-Banden vorhanden waren als beim jeweiligen Elter, haben die geselbsteten Pflanzen mit Sicherheit chimären Charakter. Die genetische Konstitution des Elter-Gewebes, aus dem sich die Keimzellen entwickelt hatten, war eine andere als die der Elter-Blätter, aus denen DNA für die Southern Blot-Analyse isoliert worden war. So hatten die Blätter von Elter und Nachkommen unterschiedliche genetische Konstitution.

Es wäre auch denkbar, dass ein Nachkomme aus zwei Keimzellen jeweils mit Transgen entstanden war, wobei in einer der beiden durch Mutation oder Rekombination in direkter Nachbarschaft zum Integrationsort eine Restriktionsschnittstelle zusätzlich entstanden (kleineres Fragment) oder weggefallen war (größeres Fragment). Mutationen sind jedoch zu seltenen Ereignissen und statistisch zu unwahrscheinlich für das Vorkommen in gleich drei von 24 transgenen Nachkommen, können jedoch im Einzelfall nicht vollständig ausgeschlossen werden.

5.6 Entstehung von genetischen Chimären

5.6.1 Regeneration

Im Zuge der Regeneration in dieser Arbeit bildeten sich zunächst Kallusstrukturen. An diesen haben sich sowohl genetisch voneinander verschiedene, als auch chimäre Sprosse differenziert. Das bedeutet, dass an einem Explantat mehrere Transformationsereignisse stattgefunden haben müssen. Aus diesen entwickelten sich entsprechend genetisch unterschiedliche transgene Bereiche. Lagen diese nahe genug beieinander, sind sie miteinander verwachsen und haben gemeinsam einen chimären Kallus gebildet (Berthomieu *et al.* '94; Domínguez *et al.* '04). Auch die Einbeziehung von nicht transgenen Zellen darin ist möglich (Jordan und McHugh '88; Mathews *et al.* '98). Wenn diese durch transgene Bereiche räumlich von der zur Selektion eingesetzten Substanz abgeschirmt waren oder dessen Wirkung durch Stofftransport zwischen den Zellen abgeschwächt wurde, konnten auch nicht transgene Zellen im Kallus wachsen und an der Differenzierung von Sprossen beteiligt sein. Zu erkennen war dies bei einigen Sprossen, an denen Blätter in bestimmten Bereichen

abstarben, nachdem sie an der Basis abgeschnitten und auf neues Selektions-Medium umgesetzt worden waren. Noch deutlicher können sensitive Gewebeteile in den Sprossen dadurch erkannt werden, dass nur ein gutes Drittel von ihnen auf Selektions-Medium weiter wuchs, nachdem sie vom Kallus getrennt worden waren. In beiden Fällen ist nicht transgenes Gewebe während des Wachstums durch resistente Teile vor der Wirkung der Selektion geschützt gewesen und hat dann bei direkter Exposition zum Absterben geführt. Werden Sprosse *via* Organogenese aus solchem chimären Gewebe Pflanzen regeneriert, können chimäre Regenerate entstehen (DeKathen und Jacobsen '90). Dies ist als unerwünschter Effekt bei Regeneration nach Transformation beschrieben, wenn die regenerierten Pflanzen auf mehrere Zellen zurückgingen (Geier und Sangwan '96). Da Spross-Meristeme normalerweise einen vielzelligen Ursprung haben, ist das Auftreten von Chimären in Transformationsexperimenten wohl eher die Regel als die Ausnahme (Mathews *et al.* '95) und ein wichtiger Aspekt bei der Transformation von Pflanzen (Zhan *et al.* '97).

Lagen die unterschiedlichen transgenen Bereiche eines Kallus weit genug von einander entfernt, starb das nicht transformierte Gewebe dazwischen durch die Selektion ab und der Kallus zerfiel in mehrere Strukturen, wie dies häufig in dieser Arbeit beobachtet worden ist.

5.6.2 Bewurzelung

Jeder an einem Kallus differenzierte und separat weiter kultivierte Spross wurde als Ursprung einer Sprosslinie angesehen. Zu dieser Linie gehörten alle, aus diesem ersten Spross durch Mikropropagation entstandenen Sprosse. Unter der Voraussetzung genetisch einheitlichen Gewebes hätten sie einen Klon gebildet. Wie bei der Etablierung der Linien zeigten die Sprosse auch bei der Bewurzelung uneinheitliche Reaktionen. Innerhalb einiger Linien gab es keine Unterschiede und nahezu alle Sprosse bewurzelten wie auch die der Positivkontrolle. Andere Linien, von denen nur ein Teil der Sprosse bewurzelungsfähig war, bestanden aus genetisch chimärem Gewebe, das zum Teil nicht transgen war oder in bestimmten Bereichen eine zu geringe Expressionsstärke der Transgene aufwies. Die Fähigkeit, Adventivwurzeln zu bilden, hängt von dem Gewebetyp ab, der sich an der Stelle befindet, an der der Spross abgeschnitten und die Bewurzelung induziert wurde. Auch Dong und McHughen ('93) berichteten von chimären Regeneraten nach Transformation von Flachs (*Linum usitatissimum*), die nur eingeschränkt bewurzelungsfähig waren. Ebenso beobachteten Mathews *et al.* ('98) nur teilweise Bewurzelung oder das Ausbleiben von Wurzelbildung in Gegenwart von Selektionsdruck bei chimären Erdbeerpflanzen. Von den *Brassica*-Regeneraten von Mukhopadhyay *et al.* ('92) erwiesen sich nur sehr wenige als bewurzelungsfähig. Diese waren dann zwar in der PCR positiv, im Southern Blot jedoch negativ.

Durch die Insertion heterologer DNA können Gene ausgeschaltet oder in ihrer Expression beeinflusst werden. Sind davon Gene betroffen, die für die Wurzelbildung von Bedeutung sind, kann die Bewurzelung ausbleiben. Diese Ereignisse sind auf bestimmte Insertionsorte und bestimmte Transformationsereignisse beschränkt. Die Wahrscheinlichkeit, dass solche Ereignisse unabhängig voneinander in solcher Häufigkeit aufgetreten sind, ist äußerst gering.

Adventivwurzeln entstehen am Querschnitt eines Sprosses nur aus ganz bestimmten dedifferenzierten Zellen (Soh *et al.* '99). Dort, wo innerhalb einer Sprosslinie gar keine Wurzelbildung zu beobachten war, bestanden die Initialzellen der adventiven Wurzelbildung aus nicht resistentem Gewebe. Das heißt, dass es sich in diesen Fällen um gewebsspezifische oder Periklinalchimären handelte. Dabei blieben die nicht bewurzelten Sprosse aus Transformation auf Selektions-Medium meistens grün, während die der Negativkontrolle abstarben. Der Anteil an Gewebe mit Resistenz gegenüber dem selektierenden Agens war also groß genug, um den Spross vital zu erhalten. Die Initialzellen der Adventivwurzeln an der Sprossbasis waren jedoch so stark beeinträchtigt, dass ein Wurzelwachstum unterbunden wurde.

5.6.3 PPT-Resistenz-Tests

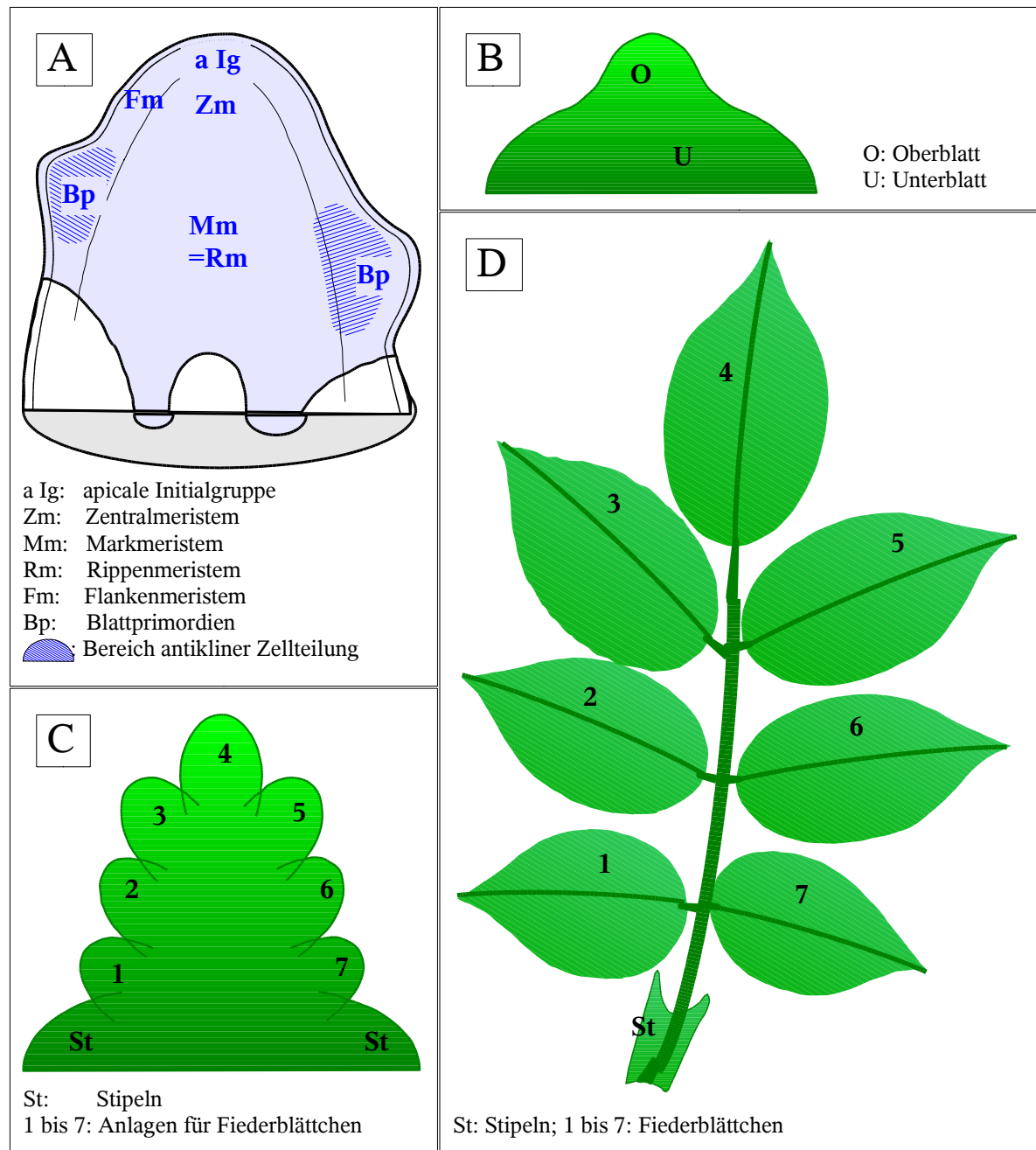
5.6.3.1 “leaf paint“

Der Test mit dem “leaf paint“-Verfahren wird verwendet, um Pflanzen im Gewächshaus auf ihren transgenen Charakter hin zu überprüfen, wenn sie nun nicht mehr unter Selektionsbedingungen kultiviert werden. Dabei ist eine klar unterscheidbare ja-oder-nein-Antwort zu erwarten, wie sie von Donn und Eckes ('92) an 11 Kulturarten gezeigt wurde. Sie wendeten den “leaf paint“-Test an Pflanzen an, die erfolgreich mit dem *pat*-Gen transformiert worden waren. Ihre Untersuchungen ergaben, dass die PAT-Aktivität in allen Pflanzen hinreichend stark war, um das zwei- bis dreifache der praxisüblichen Basta®-Aufwandmenge symptomfrei zu tolerieren, auch wenn die Expressionsstärke zwischen den Pflanzen beträchtlich variierte.

Der Test wurde an Rosen angewendet, die nach erfolgreicher Selektion über mehrere Wochen in Gewebekultur im Gewächshaus akklimatisiert waren. Nach der erfolgreichen Regeneration und Bewurzelung unter selektiven Bedingungen wäre zu erwarten, dass diese Pflanzen nach Behandlung mit praxisüblicher (600 mg/L) Konzentration von Basta® symptomfrei bleiben. Neben Basta®-resistenten sind auch abgestorbene Blättchen an Pflanzen festgestellt worden, die unter selektiven Bedingungen regeneriert und bewurzelt worden waren. Außerdem wurden Pflanzen mit mittelschweren Symptomen beobachtet, die nicht als resistent, aber auch nicht im gleichen Maße sensitiv wie die abgestorbenen bezeichnet werden konnten. Beides wäre mit “silencing“ des transgenen Bereiches und damit auch des *bar*-Gens erklärbar. Das ist aber dadurch auszuschließen, dass an einigen Pflanzen, wie beispielsweise 17-23, verschiedene Befunde gleichzeitig beobachtet wurden. Das Phänomen des “silencing“ tritt aber nicht lokal sondern gleichmäßig verteilt und schließlich in der ganzen Pflanze auf, wie Fladung ('96) gezeigt hat. Ein weiteres Ausschlusskriterium ist der positive RT-PCR-Befund. Daher handelte es sich bei diesen Pflanzen um genetische Chimären. Auch Mathews *et al.* ('98) beobachteten im GUS-Test nur teilweise blau gefärbte Blätter bei Gewächshauspflanzen transformierter Erdbeeren.

5.6.3.2 Spritzung mit Herbizid

Die Spritzung mit einer 0,1 %igen Basta[®]-Lösung bestätigte die Ergebnisse aus dem “leaf paint“-Assay. Drei Pflanzen ließen keine Resistenz erkennen und starben ab. Die übrigen 45 zeigten Unterschiede im Bezug auf Schwere und Ausmaß der Symptome sowohl untereinander als auch innerhalb verschiedener Bereiche derselben Pflanze. Der Befund reichte vom Verlust ganzer Zweige in Abstufungen bis hin zum Absterben einzelner Blättchen einiger weniger Fiederblätter. Es war kein Einflussfaktor zu identifizieren, der ein so unterschiedliches Muster erklären würde, weder auf der Seite der Wirksamkeit (z.B. Belichtung, PPT-Konzentration, Alter oder Position der Blätter) noch auf der Seite der Genexpression genetisch einheitlicher Pflanzen. Das bedeutet, dass die Ausprägung der PPT-Resistenz von der genetischen Konstitution des untersuchten Gewebes abhing und diese unterschiedlich war. Zu vergleichbaren Ergebnissen sind Berthomieu *et al.* ('94) gekommen, die nach GUS-Test chimäre Blätter beschrieben, die auf der einen Seite der Mittelrippe blau gefärbt und damit transgen waren und auf der anderen nicht. Auch Mathews *et al.* ('98) beobachteten im GUS-Test nur teilweise blau gefärbten Blätter an transformierten Erdbeerpflanzen im Gewächshaus. Dies ist möglich, wenn genetische Unterschiede zwischen Sektoren einer Pflanze auftreten (Sektoralchimären) oder auch zwischen Zelllinien, die sich von einem chimären Meristem ausgehend entlang der Sprossachse erstrecken, wie bei D'Amato ('77) für Mutationen beschrieben. Die Entstehung aller Blätter außer der Kotyledonen hängt von der Aktivität des Apikalmeristems ab (Tsukaya 2000) und die Lateralmeristeme entstehen aus einer Gruppe von Zellen der Sprossspitze (D'Amato '97), so dass die Blattanlage mit der dazugehörigen Achselknospe ebenfalls chimär sein kann. Die Teile eines zusammengesetzten Blattes entwickeln sich als freie, lappenartige Auswüchse am Rand des Blattprimordiums in einem Prozess, der als “blade branching“ bezeichnet werden kann (Kaplan '01). Der Vorgang ist der selbe wie bei der Verzweigung von Sprossen mit dem einzigen Unterschied, dass die Verzweigung des Sprosses an der Spitze, dem Apikalmeristem, erfolgt, während die Segmente eines gefiederten Blattes an der Flanke des dorsiventralen Primordiums, des Randmeristems, entstehen (Kaplan '01). Die Entstehung der Fiederblättchen ist das Ergebnis von gesteigertem und unterdrücktem Wachstum (=Zellteilung) an entsprechenden Stellen der Blattanlage, die von Dengler und Tsukaya ('01) als “marginal blastzone“ bezeichnet werden. Genetische Unterschiede innerhalb eines Blattes sind dadurch möglich.



Zeichnung 3: Entwicklung eines gefiederten Blattes

A: Strukturschema des Sprossvegetationspunktes bei Samenpflanzen; B und C: Entwicklung des Blattprimordiums; D: fertig ausgebildetes Blatt

Zeichnungen verändert nach

Strasburger: Lehrbuch der Botanik; Nultsch: Allgemeine Botanik; Kaplan *et al.* 2001

Dabei kann es einerseits sein, dass das Gewebe nur teilweise transformiert und in den suszeptiblen Bereichen kein Resistenzgen vorhanden ist. Andererseits kann das Gewebe auch aus Anteilen bestehen, die auf unabhängige Transformationsereignisse zurückgehen. In Abhängigkeit von Integrationsort (Positionseffekt) sowie Länge und Anzahl der Insertionen (silencing) kann in einem Teil der Zellen die Expression stark herabgesetzt oder unterbunden sein, was ebenfalls zu den beobachteten Effekten führen kann.

Tumoren, die von Wildtyp-Stämmen von *A. tumefaciens* hervorgerufen werden, bestehen aus chimärem Gewebe, da die Synthese der Phytohormone durch Insertion der T-DNA transgene wie nicht transgene Zellen zum Wachstum anregt. In ähnlicher Weise kann auch Gewebe, das mit Agrobakterien transformiert wurde, sowohl transgene als auch nicht transgene Zellen enthalten, so dass regenerierte Pflanzen im Bezug auf die Transgene chimär sind (Mathews *et al.* '98).

Die Einbeziehung von nicht transgenem Gewebe bei der Differenzierung von Regeneraten haben auch andere Autoren berichtet. Ko *et al.* ('98) beobachteten Apfel-Sprosse mit chimärer Expression im GUS-Test, haben aber "silencing" aufgrund von Methylierung ausgeschlossen und beurteilen die Regenerate als genetische Chimären. Zuker *et al.* ('99) regenerierten fast ausschließlich GUS-chimäre Adventivsprosse von transformierten Nelken. In Citrus haben Peña *et al.* ('95) uneinheitlich gefärbte Sprosse im GUS-Test beobachtet, obwohl sie das Transgen in der PCR und die Expression im Northern-Blot nachgewiesen hatten, und dies mit dem chimären Charakter des Gewebes erklärt und Gutiérrez-E. *et al.* ('97) haben GUS-positive Sektoren in Querschnitten von Sprossen detektiert, die sich entweder zu komplett transgenen, überhaupt nicht färbbaren und chimären Pflanzen entwickelt haben. Domínguez *et al.* ('04) konnten in Citrus in zahlreichen Fällen an prominenten Transformationsereignissen beobachten, dass sich differenzierende Strukturen aus GUS- oder GFP-positiven und -negativen Zellen zusammengesetzt waren. Solche Ereignisse sind aufgrund der Ergebnisse auch für das Regenerationsgeschehen nach Transformation in dieser Arbeit zu postulieren.

5.6.4 PCR

In der Analyse der T₀-Pflanzen mit *vst*- und *bar*-PCR wurde das Ergebnis der PPT-Resistenztests auf DNA-Ebene bestätigt. Es gab Pflanzen, von denen einzelne Proben in den PCRs negativ waren, während in anderen die Transgene nachgewiesen werden konnten. Dies betraf fast ausnahmslos Proben aus DNA-Isolationen im kleinen Maßstab, für die nur wenig Pflanzenmaterial benötigt worden war. So war es möglich, dass Blattmaterial aus dem Bereich einer genetisch chimären Pflanze verwendet worden war, der die Transgene nicht enthielt. In einem Fall (Pflanze 17-04) wurde ein negatives PCR-Ergebnis auch bei der Probe einer Maxi-Isolation beobachtet und dieser Befund später in Southern Blot-Analysen von zwei unabhängigen Proben bestätigt. Dabei ist durch Auswertung der dazugehörigen Gelfotos sichergestellt, dass der Verdau vollständig abgelaufen ist und das Gel mit einer ausreichenden Menge DNA beladen worden ist. Das bedeutet, dass die Pflanze aus transgenen und nicht transgenen Anteilen bestand. Bei den Probenahmen für DNA-Isolationen wurde zufällig nur Material aus untransformiertem Gewebe verwendet. In der Pflanze müssen aber auch transgene Anteile vorhanden gewesen sein, sonst wäre sie durch die Selektion mit 10 mg/L PPT während der Gewebekultur abgestorben. Nicht transformierte Sprosse sterben schon bei drei mg/L PPT im Medium ab, ein "escape" ist also ausgeschlossen. Ein "silencing" scheidet als Ursache ebenfalls aus, da bei diesem Phänomen eine Sequenz zwar durch Methylierung stillgelegt wird, aber weiterhin vorhanden und somit

mittels PCR detektierbar ist. Auch der Verlust transgener Sequenzen ist prinzipiell möglich. Im vorliegenden Fall kann dieses Ereignis jedoch erst nach Beendigung der Selektion im Gewächshaus eingetreten sein. Da es sich dabei um ein zelluläres Ereignis handelt, hätte es viele Male unabhängig voneinander eintreten müssen und das ist als zu unwahrscheinlich ebenfalls ausgeschlossen. Bei dieser in PCR und Southern negativen Pflanze gab es demnach nicht transgene Anteile im Gewebe, die nach dem Ende der Selektion einen überwiegenden Anteil am Wachstum im Gewächshaus hatten.

5.6.5 Southern Blot-Analyse

Wie zu erwarten, zeigten Pflanzen, die von verschiedenen Explantaten stammten, in der Southern Blot-Analyse unterschiedliche Bandenmuster aufgrund verschiedener Insertionsorte der transgenen Sequenzen in Folge von unabhängigen Transformationsereignissen.

Auch Pflanzen, die von derselben Kalluslinie und damit vom selben Explantat abstammten, wiesen Unterschiede in Anzahl und Lage der Southern-Banden auf. Dies zeigt, dass an einem somatischen Embryo mehrere Transformationsereignisse unabhängig von einander stattgefunden hatten. Jedes Ereignis führte unabhängig von den anderen zu Kallus und schließlich zur Regeneration von Sprossen. Anhand der Häufigkeit unterschiedlicher Bandenmuster kann man erkennen, dass regelmäßig mehrere bis viele Transformationsereignisse an einem Explantat stattgefunden haben. Diese konnten sich zu voneinander getrennten Kallusstrukturen entwickelt haben, wie im Abschnitt "Kallus - Regeneration" diskutiert, oder einen gemeinsamen genetisch chimären Kallus bilden.

Den Hinweis dafür, dass auch der zuletzt erwähnte Fall eingetreten ist, lieferten die Pflanzen von Kalluslinie 13. Sie stimmten in einem Teil ihres Bandenmusters überein. Zusätzlich zeigten alle Pflanzen bis auf eine (13-24) auch Banden, die einigen anderen fehlten. Das bedeutet, dass ein Teil des Kallus zur Organisation aller Sprosse beigetragen hat, dessen genetische Konstitution den gemeinsamen Southern-Banden entsprach. Zu jedem der Sprosse – bis auf 13-24 – musste mindestens jeweils ein weiterer genetisch verschiedener Teil des Kallus beigetragen haben, auf den die Banden zurückgingen, die nur in diesen Pflanzen zu sehen waren. Solche Ergebnisse in der Southern Blot-Analyse von Pflanzen mit teilweise gleichem und unterschiedlichen Bandenmuster haben auch Berthomieu *et al.* ('94) beschrieben.

Unterschiede in der genetischen Konstitution zeigten nicht nur Pflanzen, die auf denselben Kallus zurückgingen, sondern auch solche, die von einem gemeinsamen Spross abstammten. Diese Pflanzen gehören zu einer Sprosslinie. Sie besteht aus allen Sprossen, die durch Mikropropagation aus einem einzelnen Spross entstanden sind, der vom Kallus abgetrennt worden war. Die Ergebnisse zeigen, dass in manchen Fällen dieser regenerierte Spross zunächst genetisch chimär war. Im Verlauf der Mikropropagation wurde das heterogene Gewebe entmischt und es sind daraus Sprosse unterschiedlicher genetischer Konstitution hervorgegangen. Die Möglichkeit, dass die im Southern Blot verschiedenen Pflanzen einer Sprosslinie noch immer aus den verschiedenen genetischen Anteilen des „Anfangs-Sprosses“ bestehen und nur zufällig das Material für die DNA-Isolation aus jeweils einem Bereich

entnommen wurde, kann weitgehend ausgeschlossen werden. Für die Maxi-Isolation zum Zweck der Southern Blot-Analyse wurde junges Blattmaterial von jeweils allen verfügbaren Sprossspitzen einer Pflanze verwendet.

Einige Pflanzen wie beispielsweise Nummer 16-10 oder 19-09 b sind nicht entmischt worden, sondern haben ihren chimären Charakter bis ins Gewächshaus behalten. Mehrere Proben derselben Pflanze, die zu unterschiedlichen Zeiten genommen worden waren, führten in Southern Blot-Analysen zu verschiedenen Bandenmustern. Da immer junges Blattmaterial für eine DNA-Isolation abgenommen wurde, zeigen diese Ergebnisse, dass genetisch unterschiedliche Teile der Pflanze zu verschiedenen Zeiten im Wachstum begriffen waren.

Auch einige Pflanzen der T_1 lieferten zusätzliche Hinweise auf den chimären Charakter ihres jeweiligen Elters. Bei ihnen sind Banden im Southern Blot und dem entsprechend transgene Insertionen an Stellen im Genom festgestellt worden, an denen in den Proben der Eltern keine detektiert wurden. Diese traten entweder zusammen mit dem Bandenmuster des Elters auf oder auch unabhängig davon. Demnach haben die Elternpflanzen (T_0) einen Gewebeanteil mit einer genetischen Konstitution besessen, der zwar zur Blütenbildung und damit zur Nachkommenschaft beigetragen hat, jedoch nicht bei der Probenahme für die DNA-Isolation berücksichtigt wurde.

Andere, technisch bedingte Ursachen für die dargestellten Ergebnisse können weitgehend ausgeschlossen werden. Die Überprüfung des Restriktionsverdaus anhand der Qualität des Southern-Gels und ein Abgleich dessen mit der Detektion machten die Auswahl von zuverlässigen Ergebnissen für die Analyse möglich.

Bei den chimären Sprossen und Pflanzen muss es sich zunächst um meriklinale und später nach entsprechender Stabilisierung um sektorale Chimären gehandelt haben, da genetische Unterschiede zwischen den Gewebeschichten L1, L2, L3 (Periklinalchimären) in PCR und Southern Blot nicht detektierbar sind.

Der Begriff "chimär" wird in der Literatur gewöhnlich für Gewebe verwendet, das aus transgenen und nicht transgenen Anteilen besteht. Dieses kann theoretisch durch geeigneten Selektionsvorteil des transgenen Anteils entmischt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass chimäre Pflanzen auch aus verschiedenen Geweben bestehen können, die aus unabhängigen Transformationsereignissen hervorgegangen sind. Es gibt bisher, soweit bekannt, nur zwei Autoren, die von vergleichbaren Ergebnissen durch detaillierte Southern Blot-Analysen berichtet haben: Berthomieu *et al.* ('94) bei Kohl (*Brassica oleracea*) und Domínguez *et al.* ('04) bei Citrus. Solche Chimären aus unterschiedlichen transgenen Anteilen können nicht gezielt durch Applikation eines selektiven Agens entmischt werden, da alle transgenen Anteile den Selektionsvorteil des entsprechenden Markergens haben, eine hinreichende Expression vorausgesetzt.

5.6.6 RT-PCR für *vst1*

Bei den Ergebnissen der RT-PCR für das *vst1*-Gen zeigten sich die grundsätzlichen Schwierigkeiten einer funktionellen Analyse der Transgene von genetisch chimären Pflanzen. In einigen Proben wurde die Transkription des *vst*-Gens gezeigt und in anderen nicht.

Der Nachweis der Transkription durch die PCR oder ihr Ausbleiben konnte weder in Relation zur Kopienzahl der Pflanze (Li *et al.* '03) noch dem Vorkommen von "backbone"-Sequenzen gesetzt werden. Beides korreliert in vielen Fällen mit der Expressionsstärke von Transgenen. Fladung ('96) beispielsweise zeigten ein schrittweises "silencing" eines Transgens in Kartoffelpflanzen mit vier oder fünf Kopien, während solche mit einer oder zwei Kopien stabil geblieben sind. Hobbs *et al.* ('90) zeigten eine negative Assoziation zwischen der transgenen Kopienzahl und der Expression und detektierten bei geringer Expressionsstärke sowohl geringere RNA-Level als auch ein höheres Ausmaß an Methylierung als bei starker Expression. Linn *et al.* ('90) berichteten von einer offensichtlichen Korrelation zwischen zunehmender Methylierung und abnehmender Expression.

Der Vergleich der Daten aus RT-PCR mit denen aus PCR und Southern Blot ist nicht möglich, da die Analysen nicht mit Material derselben Isolierung durchgeführt werden können. Für PCR und Southern-Analyse wurde DNA aus großen Probenmengen (1-2 g Frischgewicht) isoliert, für die RT-PCR dagegen RNA aus kleineren Probenmengen (150 mg Frischgewicht). Sobald verschiedene Isolierungen verwendet werden, d.h. Blattmaterial von verschiedenen Teilen der Pflanzen und zu unterschiedlichen Zeiten in die Untersuchungen eingeht, ist nicht sicher, ob dieses genetisch identisch ist oder nicht. Alle gewonnenen Daten können nur für die aktuell eingesetzte Probe gelten, jedoch nicht auf die ganze Pflanze übertragen oder mit anderen Ergebnissen verglichen werden. Dies würde in gleicher Weise für alle weiteren Analysen wie Translationsnachweis im Western-Blot, Nachweis der Enzymtätigkeit über das Produkt Resveratrol oder Resistenz-Tests gelten.

Durch Selbstung oder Kreuzung können in der nächsten Generation genetisch einheitliche Pflanzen produziert werden, aber auch das führt nicht zu Ergebnissen bei der funktionellen Analyse des Transgens. Alle Nachkommen haben einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund und dadurch ein individuelles Resistenzniveau. Ein Vergleich untereinander ist daher nicht möglich. Auch der Einfluss des Transgens auf das Resistenzniveau kann nicht erkannt werden, da es keine Kontrollpflanzen gibt, die abgesehen vom Transgen sonst genetisch identisch sind.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit zeigt am Beispiel der Rose die Besonderheiten auf, die sich im Zusammenhang mit der Transformation von genetisch komplexen, vegetativ vermehrten Pflanzen ergeben, und diskutiert die damit verbundenen Schwierigkeiten.

Für die Regeneration und Transformation von Rosen sind in der vorliegenden Arbeit zunächst drei Systeme miteinander verglichen worden:

Die Organogenese an *in-vivo* gewachsenen Blättern setzt eine Kultur der Pflanzen unter definierten Bedingungen und eine sachkundige, intensive gärtnerische Pflege voraus, um möglichst einheitliches Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben. Darüber hinaus ist die Effizienz der Regeneration pro Explantat sowohl in dieser Arbeit als auch in der diskutierten Literatur, an *in-vivo* gewachsenen wie auch an *in-vitro*-Blättchen, so gering, dass die Spross-Organogenese bei Rosen für die Anwendung in Kombination mit Transformation nicht geeignet ist.

Bei der Transformation von Blattachselknospen hat sich in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine Verletzung des Gewebes mit Ultraschall alleine nicht effizient genug ist, um meristematische Zellen für die Transformation zugänglich zu machen. Andere oder weitere Methoden der Behandlung, wie etwa der Beschuss mit Partikeln, müssten für eine erfolgreiche Transformation der Meristeme getestet werden. Aber auch bei erfolgreicher Transformation wäre dieses System für eine vegetativ vermehrte Pflanze wie die Rose wenig geeignet, da zunächst chimäre transgene Meristeme entstehen. Ihre Entmischung würde eine generative Phase in Form von Selbstung oder Kreuzung voraussetzen. Beides führt zu unerwünschter Rekombination im heterozygoten und tetraploiden genetischen System der Rose. Die Wahrscheinlichkeit, dass dabei eine züchterisch interessante Merkmalskombination zusammen mit einem stabil exprimierten Transgen in derselben Nachkommenpflanze auftritt, ist verschwindend gering. Ein entsprechend notwendiger Arbeitsaufwand und Platzbedarf wäre nicht zu realisieren.

Das dritte Verfahren basiert auf der SEG. Bei der Induktion von EK hat sich der große Vorteil dieses Regenerationssystems, die weitgehende Neutralität gegenüber unterschiedlichen Genotypen, als zutreffend erwiesen. Es war auf fünf von sechs neue Sorten erfolgreich anwendbar. Um die Effizienz des Systems zu verbessern, erscheint es sinnvoll, weitere Faktoren auf ihren Einfluss auf die Induktion von SEG zu untersuchen, wie beispielsweise Lichtintensität und -qualität, Temperatur und das Alter der Sprosskulturen. Dabei würde eine Sortierung der Explantate nach Position am Blatt und Alter des Blattes sowie die Auswertung sowohl bezogen auf einzelne Explantate als auch auf ganze Blätter Aufschluss darüber geben, welche Rolle diese Faktoren und der physiologische Zustand der Explantate spielen. Durch die Auswahl der responsivsten Explantate könnte eine Steigerung der Effizienz erzielt werden.

Als limitierender Faktor des Protokolls hat sich die Proliferation und dauerhafte Kultur des embryogenen Kallus herausgestellt. Da diese Dauerkulturen jedoch die reifen somatischen Embryonen liefern, die das Zielgewebe der Transformation darstellen, muss die

Zuverlässigkeit dieser Kulturphase über eine Variation der Kulturbedingungen stabilisiert werden. Darüber hinaus könnte eine detaillierte Dokumentation der Entwicklung des EK Aufschluss über den Ursprung unerwünschter Strukturen geben, so dass diese bei der Subkultivierung des Kallus ausgeschlossen werden können.

Die vorhandenen SE sind mittels Agrobakterium transformiert und über eine Kallusphase zu Adventivsprossen regeneriert worden. Bei deren Analyse wurde die Tatsache genutzt, dass SE klar definierte, räumlich abgegrenzte Ziele des Gentransfers darstellen, die separat von einander kultiviert werden können. So war es möglich, aus ihnen hervorgegangene Regenerate bis zu ihrem Ursprung zurückzuverfolgen und retrospektiv auf Ereignisse während Transformation und Regeneration zu schließen. Eine konsequentere Anwendung der getrennten Verfolgung von regenerierendem Kallus auf die verschiedenen Teile einer Linie und der daraus differenzierten Sprosse, hätte einen präziseren Einblick in das Regenerationsgeschehen und eindeutiger Schlussfolgerungen auf die Transformationsereignisse zugelassen.

Wie die Ergebnisse der Analysen gezeigt haben, war der überwiegende Teil der produzierten transgenen Pflanzen genetisch chimär. Das Gewebe setzt sich einerseits aus transgenen und nicht transgenen Anteilen, andererseits aus Bereichen unterschiedlich transgener genetischer Konstitution zusammen. Dadurch wird eine molekulare Analyse erheblich erschwert, da kein Einzelergebnis auf die ganze Pflanze oder ihre Klone übertragbar ist und sowohl Wiederholungen der gleichen Analyse als auch verschiedene Untersuchungen nicht miteinander verglichen werden können. Eine verlässliche funktionelle Analyse der Transgene ist aus diesem Grunde unmöglich. Solche Pflanzen sind weder als neue Sorte noch als Zuchtlinie nutzbar.

Um das Regenerationsprotokoll mit dem Vorteil der weitgehenden Genotypen-Neutralität weiterhin zu nutzen, aber zu genetisch einheitlichen, durchtransformierten Pflanzen zu gelangen, gibt es zwei mögliche Strategien:

Die erste setzt bei der Kallusregeneration aus transformierten SE an. In dieser Phase könnte versucht werden, aus dem kallös wachsenden Gewebe Suspensionskulturen zu etablieren. Diese hätten gegenüber der Kultivierung auf agarbasiertem Festmedium den Vorteil, dass Zellen und Zellaggregate aus dem Gewebeverband herausgelöst werden. So könnte eine schnelle Trennung genetisch unterschiedlicher Bereiche erzielt werden. Außerdem würde so die Selektion direkt auf nicht transformierte Zellen wirken, so dass sie eliminiert werden können. Die transgenen Zellen würden ungehindert davon weiter mit Nährstoffen versorgt und freiwerdende Polyphenole können durch Austausch des Mediums entfernt werden. Wie die sich daran anschließende Differenzierung von Adventivsprossen wieder auf Festmedium von der Flüssigkulturphase beeinflusst wird und ob so tatsächlich genetisch homogene Pflanzen regeneriert werden können, muss sich in entsprechenden Versuchen erweisen.

Die zweite Strategie bezieht sich auf das Zielgewebe des Gentransfers. Statt der reifen SE sollte pflanzliches Gewebe bereits vor der Induktion der SEG in die Co-Kultur eingesetzt werden. Dafür kommen entweder die Blattexplantate selbst in Betracht oder die Kalli, die in der ersten Phase der SEG-Induktion an ihren Schnittkanten entstehen. Dadurch würde es

möglich, dass EK bzw. SE schon aus transgenem Gewebe hervorgehen. Diese Änderung erfordert zwar eine gesteigerte Effizienz bei der Induktion der Embryogenese, bringt aber andererseits den großen Vorteil mit sich, dass die Notwendigkeit einer langfristig schwierigen Dauerkultur von EK zwecks permanenter Produktion der SE überflüssig würde. Anders als bei Transformation von EK mit Proembryonen, wie in der Rosen-Literatur zur Vermeidung von genetischen Chimären beschrieben, bieten die hier vorgeschlagenen Zielgewebe, wie zuvor die SE auch, den Vorteil räumlich abgegrenzter, separat von einander kultivierbarer Explantate. So bleibt es möglich, aus ihnen hervorgehende Regenerate bis zu ihrem Ursprung zurückzuverfolgen und unabhängige Transformationsereignisse von vornherein zu unterscheiden. Für eine erfolgreiche Anwendung dieser Strategie müssten mit einem optischen Marker in entsprechenden transgenen Ansätzen drei Fragen geklärt werden: Wie die SEG durch die vorangegangene Transformation beeinflusst wird, welches Gewebe und welcher Zeitpunkt der Co-Kultur einen maximalen Anteil an transgenem Material für die SEG liefert und schließlich, ob der EK oder die SE aus einer einzelnen Zelle entstehen oder einen vielzelligen Ursprung haben. Werden diese Fragen positiv beschieden, wäre ein solches System geeignet, um markerfreie transgene Pflanzen ohne Selektion zu regenerieren.

Die Selektion transgener Pflanzen in dieser Arbeit mit PPT (Glufosinat) hat gezeigt, dass das Kanamycin im Protokoll ersetzbar und der Basta®-Wirkstoff auch in der Gattung *Rosa* anwendbar ist. Die im Zuge mit der PPT-Selektion beschriebene lange Dauer der Regeneration steht im Zusammenhang mit dem chimären Charakter des Gewebes. Könnte durch eine der oben beschriebenen Änderungen eine Vermeidung von Chimären realisiert werden, würde sich auch die Regenerationszeit verkürzen.

Neben dem Selektionsmarker *bar* enthielt das in dieser Arbeit für die Transformation verwendete Konstrukt das *vst1*-Gen als "gene of interest". Dieses sofort einzusetzen war angesichts der potenziell antifungalen Wirkung und des starken Bedarfes an Pilzresistenz im Genpool der Rose eine wohlbegründete Entscheidung. Die Abwesenheit eines optischen Markers hat jedoch die Analyse aller potenziell transgenen Gewebe deutlich kompliziert. Auf visuelle Daten bezüglich der Verteilung von Transformationsereignissen und transgenen Geweben musste ebenso verzichtet werden wie auf eine anschauliche Bestätigung der Ergebnisse. Bei der Etablierung eines Transformationssystems sollte das Konstrukt daher immer auch einen optischen Marker enthalten, wie etwa *gus* oder *gfp*.

Neben dem chimären Charakter der regenerierten transgenen Pflanzen machen auch die in ihnen persistierenden transgenen Agrobakterien eine direkte Nutzung der T₀-Pflanzen unmöglich und erschweren die Analyse. Um ihr Vorkommen zu minimieren, wäre neben Cefotaxim die Anwendung eines weiteren antibiotischen Wirkprinzips z. B. mit Vancomycin denkbar. Auch der Einsatz von Silbernitrat, welches eine antibakterielle Wirkung besitzt, könnte während einer Kulturphase nach der Co-Kultur versucht werden. Dadurch ist eventuell auch ein positiver Effekt auf die Vitalität und damit die Überlebensrate der Explantate nach Besiedlung durch Agrobakterien zu erreichen. Denkbar wäre auch eine zusätzliche Kulturphase von regenerierten Sprossen im Dunkeln, so dass ein schnelleres Längenwachstum erreicht werden kann, als sich die Bakterien im Spross aufwärts bewegen.

Nur die bakterienfreie Sprossspitze würde dann bei der anschließenden Subkultur weiter verwendet. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Nachweisgrenze für Agrobakterien im Pflanzengewebe, damit klar ist, welche Qualität ein Nachweis oder Ausschluss bei entsprechenden Untersuchungen hat. Mit absoluter Sicherheit lässt sich jedoch ihr Persistieren in der T_0 zurzeit nicht ausschließen, so dass diese zwar als Zuchtlinie, aber erst die T_1 als mögliche neue Sorte genutzt werden kann. Nur der Verzicht auf den Einsatz von Agrobakterien und die Wahl einer alternativen Transformationsmethode, wie beispielsweise Partikelbeschuss, würden das ändern, aber andere Nachteile mit sich bringen.

Bei der Produktion der T_1 hat sich in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Selbstung zu einem geringen Fruchtansatz führen kann. Da es daher erfolversprechender erscheint, Kreuzungen mit bekanntermaßen gut geeigneten untransformierten Pollenspendern und -empfängern durchzuführen, sollten die entsprechenden Genotypen für die Transformationen ausgewählt werden. Der dabei zu erwartende etwas niedrigere Anteil an transgenen Pflanzen innerhalb der Nachkommenschaft wird durch die absolut deutlich höhere Anzahl an Nachkommen mehr als ausgeglichen. Zudem erhöht sich so die Wahrscheinlichkeit, dass unabhängige transgene Loci durch Rekombination getrennt werden, so dass in der T_1 im Durchschnitt weniger Kopien pro Pflanze als im jeweiligen Elter und ein höherer Anteil Pflanzen mit nur einem Transgen zu erwarten sind.

Eine weitere interessante Nutzung der T_0 -Pflanzen wäre die Induktion von *in-situ*-Parthenogenese mit inaktiviertem Pollen, die bisher einzige erfolgreiche Methode der Haploidisierung bei Rosen (Crespel und Meynet '03). Die nach "embryo rescue" generierten Pflanzen wären diploid und, falls transgen, hemizygot. Sie können entweder für Kreuzungen zwischen Diploiden eingesetzt und/oder wieder zu Tetraploiden aufgedoppelt werden. Diese würden dann jeweils zwei transgene Allele tragen, so dass der Anteil an transgenen Nachkommen einer Kreuzung 75 % betrage gegenüber 50 % bei einer Pflanze mit einem transgenen Allel von vieren.

Die Besonderheiten bei der Transformation von genetisch komplexen, vegetativ vermehrten Pflanzen wie der Rose sind im Hinblick auf ein zuverlässig auswertbares und letztlich nutzbares Produkt dargestellt worden.

Für die genetische Transformation von Rosen steht ein System zur Verfügung, dessen Stärken und Schwächen in dieser Arbeit ausgelotet worden sind. Die vorgestellten Strategien bieten aussichtsreiche Möglichkeiten das Verfahren so weiter zu entwickeln, dass die aufgezeigten Probleme gelöst werden und daraus einsatzfähige transgene Rosen resultieren.

7 Literatur

(2002): International Statistics flowers and plants.

Alibert B., Lucas O., Le Gall V., Kallerhoff J. und Alibert G. (1999): "Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression" Physiologia Plantarum **106**: 232 - 237.

Amoah B. K., Wu H., Sparks C. und Jones H. D. (2001): "Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue" Journal of Experimental Botany **52** (358): 1135 - 1142.

Arene L., Pellegrino C. und Gudin S. (1993): "A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues" Euphytica **71** (1-2): 83 - 90.

Atchley A. A. und Crum L. A. (1988): "Acoustic cavitation and bubble dynamics" in: Suslick K. S. (Ed.): "Ultrasound: Its chemical, physical and biological effects" Seiten 1 - 64, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.

Barrett C., Cobb E., McNicol R. und Lyon G. (1996): "A risk assessment study of plant genetic transformation using *Agrobacterium* and implications for analysis of transgenic plants" Plant Cell Tissue and Organ Culture **47** (2): 135 - 144.

Bej A. K., Perlin M. H. und Atlas R. M. (1988): "Model suicide vector for containment of genetically engineered microorganisms" Applied and Environmental Microbiology **54** (10): 2472 - 2477.

Berthomieu P., Beclin C., Charlot F., Dore C. und Jouanin L. (1994): "Routine transformation of rapid cycling cabbage (*Brassica oleracea*) - molecular evidence for regeneration of chimeras" Plant Science **96** (1-2): 223 - 235.

Brandt P. (2004): "Transgene Pflanzen: Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien", 364 Seiten; Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin.

Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A. und Hooykaas P. J. J. (1995): "Trans-kingdom T-Dna transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*" The EMBO Journal **14** (13): 3206 - 3214.

Burger D. W., Liu L., Zary K. W. und Lee C. I. (1990): "Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L." Plant Cell Tissue and Organ Culture **21**: 147 - 152.

Byrne D. H., Black W. und Ma Y. (1996): "The use of amphidiploidy in the development of blackspot resistant rose germplasm" Acta Horticulturae **424**: 269 - 272.

Cassells A. C. (1991): "Problems in tissue culture: culture contamination" in: Debergh P. C. und Zimmerman R. H. (Eds.): "Micropropagation: Technology and Application" Seiten 484, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Castillón J. und Kamo K. (2002): "Maturation and conversion of somatic embryos of three genetically diverse rose cultivars" HortScience **37** (6): 973 - 977.

Chaanin A. (2003): "Breeding/Selection strategies for cut roses" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 33 - 41, Elsevier Academic Press.

- Chatani K., Toyoda H., Yoshida K. und Koreeda K. (1996): "Selection of powdery mildew-resistant regenerants obtained from leaf explant-derived calli of *Rosa hybrida*" Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **65** (2): 381 - 385.
- Chen L.-F. O., Hwang J.-Y., Charng Y. Y., Sun C. W. und Yang S.-F. (2001): "Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation" Molecular Breeding **7** (3): 243 - 257.
- Christou P. und Ford T. L. (1995): "Recovery of chimeric rice plants from dry seed using electric discharge particle acceleration" Annals of Botany **75**: 449 - 454.
- Cole P. und Melton B. (1986): "Self- and cross-compatibility relationships among genotypes and between ploidy of the rose" Journal of the American Society for Horticultural Science **111** (1): 122 - 125.
- Coutos-Thévenot P., Poinssot B., Bonomelli A., Yean H., Breda C., Buffard D., Esnault R., Hain R. und Boulay M. (2001): "In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promotor" Journal of Experimental Botany **52** (358): 901 - 910.
- Crespel I. und Meynet J. (2003): "Manipulation of Ploidy Level" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudín S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 5 - 11, Elsevier Academic Press.
- Crespel L. und Mouchotte J. (2003): "Methods of cross-breeding" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudín S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 30 - 33, Elsevier Academic Press.
- D'Amato F. (1977): "Nuclear cytology in relation to development", Seiten; Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- D'Amato F. (1997): "Role of somatic mutations in the evolution of higher plants" Caryologia **50** (1): 1 - 15.
- De Buck S., De Wilde C., Van Montagu M. und Depicker A. (2000): "T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation" Molecular Breeding **6** (5): 459 - 468.
- De Kathen A. und Jacobsen H.-J. (1990): "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pisum sativum* L. using binary and cointegrate vectors" Plant Cell Reports **9**: 276 - 279.
- De Riek J., Piqueras A. und Debergh P. C. (1996): "Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*" Plant Cell Tissue and Organ Culture **47** (3): 269 - 278.
- De Vries D. P. und Dubois L. A. M. (1983): "Pollen and Pollination Experiments 10. The Effect of Repeated Pollination on Fruit Set and Seed Set in Crosses between the Hybrid Tea Rose Cultivars Sonia and Ilona" Euphytica **32** (3): 685 - 690.
- De Vries D. P. und Dubois L. A. M. (1984): "Inheritance of the Recurrent Flowering and Moss Characters in F-1 and F-2 Hybrid Tea X *Rosa-Centifolia-Muscosa* Populations" Gartenbauwissenschaft **49** (3): 97 - 100.

- De Wit J. C., Esendam H. F., Honkanen J. J. und Tuominen U. (1990): "Somatic embryogenesis and regeneration of flowering plants in rose" Plant Cell Reports **9**: 456 - 458.
- Debener T. (1999): "Genetic analysis of horticulturally important morphological and physiological characters in diploid roses" Gartenbauwissenschaft **64** (1): 14 - 20.
- Debener T., Drewes A. R. und Rockstroh K. (1998): "Identification of five physiological races of blackspot, *Diplocarpon rosae*, Wolf on roses" Plant Breeding **117** (3): 267-270.
- Debener T. und Mattiesch L. (1996): "Genetic analysis of molecular markers in crosses between diploid roses" Acta Horticulturae **424**: 249 - 252.
- Dengler N. G. und Tsukaya H. (2001): "Leaf morphogenesis in dicotyledons: Current issues" International Journal of Plant Science **162** (3): 459 - 464.
- Derks F. H. M., Van Dijk A. J., Hänisch ten Cate C. H., Florack D. E. A., Dubois L. A. M. und De Vries D. P. (1995): "Prolongation in vase life of cut roses via introduction of genes coding for antibacterial activity. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation.". Sixth International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants, Oslo, Norway, June 1995.
- Devine M. D., Duke S. O. und Fedtke C. (1993): "Physiology of Herbicide Action", 441 Seiten; P T R Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Dietz A. (1993): "Risk assessment of genetically modified plants introduced into the environment" in: Wöhrmann K. und Tomiuk J. (Eds.): "Transgenic Organisms: Risk assessment of deliberate release" Seiten 209 - 228, Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin.
- Dohm A., Ludwig C., Nehring K. und Debener T. (2001): "Somatic embryogenesis in roses" Acta Horticulturae **547**: 341 - 347.
- Dohm A., Ludwig C., Schilling D. und Debener T. (2001): "Transformation of roses with genes for antifungal proteins" Acta Horticulturae **547**: 27 - 33.
- Domínguez A., Cervera M., Pérez R. M., Romero J., Fagoaga C., Cubero J., López M. M., Navarro L. und Peña L. (2004): "Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies" Molecular Breeding **14**: 171 - 183.
- Dong J.-Z. und McHughen A. (1993): "Transgenic flax plants from *Agrobacterium* mediated transformation: Incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants" Plant Science Limerick **91** (2): 139 - 148.
- Donn G. und Eckes P. (1992): "Basta-tolerant crops through transfer of a synthetic phosphinothricin-acetyltransferase gene" Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (Sonderheft XIII): 499 - 504.
- Doyle J. J. und Doyle J. L. (1990): "Isolation of plant DNA from fresh tissue" Focus **12** (1): 13 - 15.
- Drewes-Alvarez R. (2003): "Disease/Black Spot" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 148 - 153, Elsevier Academic Press.

- Drewes-Alvarez R. (2003): "Early embryo rescue" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 3 - 5, Elsevier Academic Press.
- Dubois L. A. M., De V. D. P. und Koot A. (2000): "Direct shoot regeneration in the rose: Genetic variation of cultivars" Gartenbauwissenschaft **65** (1): 45 - 49.
- Dubois L. A. M. und De Vries D. P. (1994): "Regeneratie rozen brengt biotechnologie binnen handbereik" Vakblad voor de Bloemisterij **28**: 29.
- Dubois L. A. M. und De Vries D. P. (1995): "Preliminary report on the direct regeneration of adventitious buds on leaf explants of in vivo grown glasshouse rose cultivars" Gartenbauwissenschaft **60** (6): 249 - 253.
- Dubois L. A. M. und De Vries D. P. (1996): "The direct regeneration of adventitious buds on leaf explants of glasshouse-grown cut rose cultivars". 2nd international Symposium on Roses, Antibes, France, July 1995, ISHS.
- Dubois L. A. M., De Vries D. P. und Koot A. (1997): "Genetic variation of rose cultivars for direct shoot organogenesis". Hort. Biotech. In Vitro Cult. and Breeding, ISHS.
- El Khalifa M. D., El Nur E. E. und Lippincott B. B. (1973): "Crown gall on castor bean leaves, II formation of secondary tumors" Journal Experimental Botany **24** (83): 1117 - 1129.
- Engelhard G., Pawlitzki K.-H. und Ruhland M. (2000): "Abbauverhalten von Phosphinothricin in sensitiven und transgenen Mais- und Rapszellen sowie in ganzen Pflanzen", Bayerische Landesanstalten für Ernährung (LfE) und für Bodenkunde und Pflanzenbau (LBP)
- Finer K. R. und Finer J. J. (2000): "Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons" Letters in Applied Microbiology **30** (5): 406 - 410.
- Firoozabady E., Moy Y., Courtney-Gutterson N. und Robinson K. (1994): "Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue" BIO/TECHNOLOGY **12**: 609 - 613.
- Fladung M. (1996): "Transgenic potato plants can be used to evaluate stability of foreign genes: Reversions and chimeras in multiple copies of *rolC* harboring clones" Agronomie **16** (2): 113 - 121.
- Fladung M. und Ahuja M. R. (1997): "Excision of the maize transposable element *Ac* in periclinal chimeric leaves of *35S-Ac-rolC* transgenic aspen-*Populus*" Plant Molecular Biology **33** (6): 1097-1103.
- Geier T. und Sangwan R. S. (1996): "Histology and chimeral segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria* internode explants" Plant Cell Reports **15** (6): 386 - 390.
- Gleason M. L. und Helland S. J. (2003): "Disease/Botrytis" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 154 - 158, Elsevier Academic Press.
- González E. R., de Andrade A., Bertolo A. L., Lacerda G. C., Carneiro R. T., Prado Defavári V. A., Veneziano Labate M. T. und Labate C. A. (2002): "Production

- of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system" Functional Plant Biology **29** (1): 97 - 102.
- Grayburn W. S. und Vick B. A. (1995): "Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads" Plant Cell Reports **14**: 285 - 289.
- Grossi C., Raymond O., Sanlaville-Boisson C. und Jay M. (1999): "Rosa taxonomy and hierarchy of markers defined by ACT STATIS" Zeitschrift für Naturforschung, Section C: Journal of Biosciences **54** (1-2): 25 - 34.
- Gudin S. (1994): "Embryo rescue in *Rosa hybrida* L" Euphytica **72** (3): 205 - 212.
- Gudin S. (2003): "Breeding/Overview" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 25 - 30, Elsevier Academic Press.
- Gudin S. (2003): "Seed propagation" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **2**: Seiten 620 - 623, Elsevier Academic Press.
- Gudin S. und Arene L. (1991): "Influence of the pH of the Stigmatic Exudate on Male Female Interaction in *Rosa hybrida* L" Sexual Plant Reproduction **4** (2): 110 - 112.
- Gudin S., Arene L. und Bulard C. (1991): "Influence of Season on Rose Pollen Quality" Sexual Plant Reproduction **4** (2): 113 - 117.
- Gudin S., Arene L., Chavagnat A. und Bulard C. (1990): "Influence of endocarp thickness on rose achene germination: genetic and environmental factors" HortScience **25** (7): 786 - 788.
- Gutiérrez-E M. A., Luth D. und Moore G. A. (1997): "Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus* Florida Agric Exp Stn J Ser No. R-05377" Plant Cell Reports **16** (11): 745 - 753.
- Haas J. H., Moore L. W., Ream W. und Manulis S. (1995): "Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains" Applied and Environmental Microbiology **61** (8): 2879 - 2884.
- Hain R., Bieseler B., Kindl H., Schröder G. und Stöcker R. H. (1990): "Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol" Plant Molecular Biology **15**: 325 - 335.
- Hain R., Reif H.-J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P. H., Stöcker R. H. und Stenzel K. (1993): "Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant" Nature **361**: 153 - 156.
- Hill G. P. (1967): "Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose" Nature **216**: 596 - 597.
- Hipskind J. D. und Paiva N. L. (2000): "Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*" Molecular Plant-Microbe Interactions **13** (5): 551 - 562.

- Höger-Orthner I. (1991): "Vom Zauber der alten Rosen", 111 Seiten; BLV Verlagsgesellschaft mbH, München.
- Horst R. K. (1995): "Compendium of rose disease", 50 Seiten; American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Hsia C. N. und Korban S. S. (1996): "Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*" Plant Cell Tissue and Organ Culture **44** (1): 1 - 6.
- Ibrahim R. und Debergh P. C. (2000): "Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.)". XXV International Horticultural Conference, ISHS.
- Ibrahim R. und Debergh P. C. (2001): "Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of rose (*Rosa hybrida* L.)" Scientia Horticulturae **88**: 41 - 57.
- Ibrahim R., Mondelaers W. und Debergh P. C. (1998): "Effects of X-irradiation on adventitious bud regeneration from in vitro leaf explants of *Rosa hybrida*" Plant Cell Tissue and Organ Culture **54** (1): 37 - 44.
- Ishioka N. und Tanimoto S. (1990): "Plant regeneration from Bulgarian rose callus" Plant Cell Tissue and Organ Culture **22**: 197 - 199.
- Iwata H., Kato T. und Ohno S. (2000): "Triparental origin of Damask roses" Gene **259** (1-2): 53 - 59.
- Jackson G. A. D. und Blundell J. B. (1963): "Germination in *Rosa*" Journal Horticultural Science **38**: 310 - 320.
- Jacobs G., Bornman C. H. und Allan P. (1968): "Tissue culture studies on rose. Use of pith explants" South African Journal of Agricultural Science **11**: 673 - 678.
- Jan C. H., Byrne D. H., Manhart J. und Wilson H. (1999): "Rose germplasm analysis with RAPD markers" HortScience **34** (2): 341 - 345.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A. und Bevan M. W. (1987): "GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants" The EMBO Journal **6** (13): 3901 - 3907.
- Joersbo M. und Brunstedt J. (1990): "Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication" Plant Cell Reports **9** (4): 207 - 210.
- Jordan M. C. und McHughen A. (1988): "Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots" Plant Cell Reports **7**: 285 - 287.
- Kaplan D. R. (2001): "Fundamental concepts of leaf morphology and morphogenesis: A contribution to the interpretation of molecular genetic mutants" International Journal of Plant Science **162** (3): 465 - 474.
- Katz L. S. und Marquis J. K. (1991): "The toxicology of genetically engineered microorganisms" in: Levin M. A. und Strauss H. S. (Eds.): "Risk assessment in genetic engineering" Seiten 51 - 63, McGraw-Hill, Inc.
- Kaufmann H., Mattiesch L., Loerz H. und Debener T. (2003): "Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thunb. and assembly of a contig spanning *Rdr1*, a gene that confers resistance to blackspot" Molecular Genetics and Genomics **268** (5): 666 - 674.

- Kim C. K., Chung J. D., Park S. H., Burrell A. M., Kamo K. K. und Byrne D. H. (2004): "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein (GFP) gene" Plant Cell Tissue and Organ Culture **78** (2): 107-111.
- Kintzios S., Manos C. und Makri O. (1999): "Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa sp.*)" Plant Cell Reports **18** (6): 467 - 472.
- Ko K., Brown S. K., Norelli J. L. und Aldwinckle H. S. (1998): "Alterations in *nptII* and *gus* expression following micropropagation of transgenic M7 apple rootstock lines" Journal of the American Society for Horticultural Science **123** (1): 11 - 18.
- Kobayashi (1998): Plant Tissue and Biotechnology **4** (2): 76 - 81.
- Kobayashi S., Ding C. K., Nakamura Y. und Nakajima I. (2000): "Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside)" Plant Cell Reports **19**: 904 - 910.
- Kononov M. E., Bassuner B. und Gelvin S. B. (1997): "Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: Evidence for multiple complex patterns of integration" Plant Journal **11** (5): 945 - 957.
- Krikorian A. D. (1995): "Hormones in tissue culture and micropropagation" in: Davies P. J. (Ed.): "Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology" Seiten 774 - 796, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kunitake H., Imamizo H. und Mii M. (1993): "Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.)" Plant Science Limerick **90** (2): 187 - 194.
- Kuraya Y., Ohta S., Fukuda M., Hiei Y., Murai N., Hamada K., Ueki J., Imaseki H. und Komari T. (2004): "Suppression of transfer of non-T-DNA `vector backbone` sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*" Molecular Breeding **14**: 309 - 320.
- Leckband G. und Lörz H. (1998): "Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance" Theoretical and Applied Genetics **96**: 1004 - 1012.
- Leffering L. und Kok E. (1990): "Regeneration of rose via leaf segments" Prophyta **8**: 245.
- Lehoczky J. (1971): "Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines" Vitis **10**: 215 - 221.
- Li X., Krasnyanski S. F. und Korban S. S. (2002): "Optimization of the *uidA* gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*" Plant Physiology and Biochemistry Paris **40** (5): 453 - 459.
- Li X., Krasnyanski S. F. und Korban S. S. (2002): "Somatic embryogenesis, second somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*" Journal Plant Physiology **159**: 313 - 319.
- Li X. Q., Gasic K., Cammue B., Broekaert W. und Korban S. S. (2003): "Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, *Ace-AMP1*, demonstrate

- enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*)” Planta **218** (2): 226 - 232.
- Liang H., Zheng J., Duan X., Sheng B., Jia S., Wang D., Ouyang J., Li J., Li L., Tian W., Hain R. und Jia X. (2000): “A transgenic wheat with a stilbene synthase gene resistant to powdery mildew obtained by biolistic method” Chinese Science Bulletin **45** (7): 634 - 638.
- Linde M. und Debener T. (2003): “Isolation and identification of eight races of powdery mildew of roses *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr.) de Bary and the genetic analysis of the resistance gene *Rpp1*” Theoretical and Applied Genetics **107** (1): 256 - 262.
- Linde M. und Shishkoff N. (2003): "Disease/Powdery Mildew" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudín S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 158 - 165, Elsevier Academic Press.
- Lloyd D., Roberts A. V. und Short K. C. (1988): “The induction in vitro of adventitious shoots in *Rosa*” Euphytica **37**: 31 - 36.
- López-Pila J. M. und Scheler C. (1993): "Gene transfer from bacteria and heterologous viruses into cells of higher organisms" in: Wöhrmann K. und Tomiuk J. (Eds.): "Transgenic Organisms: Risk assessment of deliberate release" Seiten 65 - 82, Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin.
- Lorenz M. G. und Wackernagel W. (1993): "Bacterial gene transfer in the environment" in: Wöhrmann K. und Tomiuk J. (Eds.): "Transgenic Organisms: Risk assessment of deliberate release" Seiten 43 - 64, Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin.
- Ma Y., Crane C. F. und Byrne D. H. (2000): “Meiotic behavior in a tetraploid rose and its hybrid progeny” HortScience **35** (6): 1127 - 1131.
- Ma Y., Islam-Faridi M. N., Crane C. F., Ji Y., Stelly D. M., Price H. J. und Byrne D. H. (1997): “In situ hybridization of ribosomal DNA to rose chromosomes” Journal of Heredity **88** (2): 158 - 161.
- Marcelis - Van Acker C. A. M. (1994): “Development and growth potential of axillary buds in roses as affected by bud age” Annals of Botany London **74** (5): 437 - 443.
- Marchant R., Davey M. R., Lucas J. A. und Power J. B. (1996): “Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (*Rosa hybrida* L.) cvs Trumpeter and Glad Tidings” Plant Science Shannon **120** (1): 95 - 105.
- Marchant R., Davey M. R., Lucas J. A. und Power J. B. (1998): “Biolistic transformation of rose (*Rosa hybrida* L.)” Annals of Botany London **81** (1): 109 - 114.
- Marchant R., Power J. B., Davey M. R. und Chartier-Hollis J. (1994): “Embryo rescue, for the production of F-1 hybrids, in English rose” Euphytica **74** (3): 187 - 193.
- Marti R., Cubero J., Daza A., Piquer J., Salcedo C. I., Morente C. und Lopez M. M. (1999): “Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants” European Journal of Plant Pathology **105** (1): 39 - 50.

- Martin M., Piola F., Chessel D., Jay M. und Heizmann P. (2001): "The domestication process of the Modern Rose: Genetic structure and allelic composition of the rose complex" Theoretical and Applied Genetics **102** (2-3): 398 - 404.
- Mathews H., Dewey V., Wagoner W. und Bestwick R. K. (1998): "Molecular and cellular evidence of chimaeric tissues in primary transgenics and elimination of chimaerism through improved selection protocols" Transgenic Research **7** (2): 123-129.
- Mathews H., Wagoner W., Cohen C. und Kellogg J. (1995): "Efficient genetic transformation of red raspberry, *Rubus idaeus* L." Plant Cell Reports **14** (8): 471 - 476.
- Matsumoto S., Kouchi M., Yabuki J., Kusunoki M., Ueda Y. und Fukui H. (1998): "Phylogenetic analyses of the genus *Rosa* using the *matK* sequence: Molecular evidence for the narrow genetic background of modern roses" Scientia Horticulturae Amsterdam **77** (1-2): 73 - 82.
- Matsumoto S., Wakita H. und Fukui H. (1997): "Molecular classification of wild roses using organelle DNA probes" Scientia Horticulturae **68**: 191 - 196.
- Matthews D., Mottley J., Horan I. und Roberts A. V. (1991): "A protoplast to plant system in roses" Plant Cell Tissue and Organ Culture **24**: 173 - 180.
- Matthews D., Mottley J., Yokoya K. und Roberts A. V. (1994): "Regeneration of plants from protoplasts of *Rosa* species (roses)" in: Bajaj Y. P. S. (Ed.): "Biotechnology in Agriculture and Forestry, PLant Protoplasts and Genetic Engineering V" **29**: Seiten 146 - 160, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Matzk A., Mantell S. und Schiemann J. (1996): "Localization of persisting agrobacteria in transgenic tobacco plants" Molecular Plant Microbe Interactions **9** (5): 373 - 381.
- McHughen A. und Jordan M. C. (1989): "Recovery of transgenic plants from "escape" shoots" Plant Cell Reports **7**: 611 - 614.
- McSheffrey S. A., McHughen A. und Devine M. D. (1992): "Characterization of transgenic sulfonylurea-resistant flax (*Linum usitatissimum*)" Theoretical and Applied Genetics **84** (3-4): 480 - 486.
- Metz P. L. J., Stiekema W. J. und Nap J.-P. (1998): "A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinithricin-tolerant plants" Molecular Breeding **4**: 335 - 341.
- Miki B. und McHugh S. (2004): "Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety" Journal of Biotechnology **107**: 193 - 232.
- Millan T., Osuna F., Cobos S., Torres A. M. und Cubero J. I. (1996): "Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*" Theoretical and Applied Genetics **92** (2): 273 - 277.
- Mogilner N., Zutra D., Gafny R. und Bar-Joseph M. (1993): "The persistence of engineered *Agrobacterium tumefaciens* in agroinfected plants" Molecular Plant-Microbe Interactions **6** (5): 673 - 675.
- Moyne A. L., Souq F., Yean L. H., Brown S. C., Boulay M. und Sangwan N. B. S. (1993): "Relationship between cell ploidy and regeneration capacity of long term *Rosa hybrida* cultures" Plant Science Limerick **93** (1-2): 159 - 168.

- Mukhopadhyay A., Arumugam N., Nandakumar P. B. A., Pradhan A. K., Gupta V. und Pental D. (1992): "Agrobacterium-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: Transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration" Plant Cell Reports **11** (10): 506 - 513.
- Murali S., Sreedhar D. und Lokeswari T. S. (1996): "Regeneration through somatic embryogenesis from petal-derived calli of *Rosa hybrida* L. cv arizona (hybrid tea)" Euphytica **91** (3): 271 - 275.
- Murashige T. und Skoog F. (1962): "A revised medium for rapid growth an bioassays with tobacco tissue cultures" Physiologiae Plantarum **15**: 473 - 497.
- Nickig M. und Rau H. (1996): "Romantische Rosen", 215 Seiten; Ellert und Richter Verlag, Hamburg.
- Noriega C. und Söndahl M. R. (1991): "Somatic embryogenesis in hybrid tea roses" BIO/TECHNOLOGY **9**: 991 - 993.
- Parrott W. A., Hoffman L. M., Hildebrand D. F., Williams E. G. und Collins G. B. (1989): "Recovery of primary transformants of soybean" Plant Cell Reports **7**: 615 - 617.
- Peña L., Cervera M., Juarez J., Ortega C., Pina J. A., Duranvila N. und Navarro L. (1995): "High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus" Plant Science **104** (2): 183 - 191.
- Peñalver R., Durán-Vila N. und López M. M. (1994): "Characterisation and pathogenicity of bacteria from shoot tips of the globe artichoke (*Cynara scolymus* L.)" Annual and Applied Biology **125**: 501 - 513.
- Peters S., Koschinsky S. und Tebbe C. C. (2000): "Untersuchung zum Gentransfer bei der Kompostierung gentechnisch veränderter herbizidresistenter Maispflanzen", Institut für Agrarökologie der Bundesanstalt für Landwirtschaft
- Phillips R. und Rix M. (1988): "Roses", 223 Seiten; Random House, New York.
- Pickardt T. und De Kathen A. (2002): "Stabilität transgen-vermittelter Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen mit dem Schwerpunkt transgene Gehölze und Sterilitätsgene", BioTechConsult
- Podwyszynska M. und Olszewski T. (1995): "Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by in vitro culture of rose, cordyline and homalomena" Scientia Horticulturae Amsterdam **64** (1-2): 77 - 84.
- Rajapakse S., Byrne D. H., Zhang L., Anderson N., Arumuganathan K. und Ballard R. E. (2001): "Two genetic linkage maps of tetraploid roses" Theoretical and Applied Genetics **103**: 575 - 583.
- Ramanathan V. und Veluthambi K. (1995): "Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T_L-DNA" Plant Molecular Biology **28**: 1149 - 1154.
- Rausch A. (2003): "Dumonts kleines Rosenlexikon", 285 Seiten; DuMont monte Verlag, Köln.
- Reddy S., Spencer J. A. und Newman S. E. (1992): "Leaflet surfaces of Blackspot-resistant and susceptible roses and their reactions to fungal invasion" Hortscience **27** (2): 133 - 135.

- Reynders-Aloisi S. und Bollereau P. (1996): "Characterisation of genetic diversity in genus *Rosa* by randomly amplified polymorphic DNA" Acta Horticulturae **424**: 253 - 259.
- Ricci P., Devergne J. C. und Poncet C. (1996): "Pathologists` Contribution to strategies for producing pathogen-free rose material" Acta Horticulturae **424**: 375 - 379.
- Roberts A. V., Horan I., Matthews D. und Mottley J. (1990): "Protoplast technology and somatic embryogenesis in *Rosa*"???: 110 - 115.
- Robinson K. E. P. und Firoozabady E. (1993): "Transformation of floriculture crops" Scientia Horticulturae **55**: 83 - 99.
- Roche (2000): "DIG application manual for filter hybridisation", 225 Seiten; Roche Diagnostics GmbH.
- Rong L., Karcher S. J. und Gelvin S. B. (1991): "Genetic and molecular analyses of *picA*, a pant-inducible locus on the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome" Journal of Bacteriology **173** (16): 5110 - 5120.
- Rong L., Karcher S. J., O`Neal K., Hawes M. C., Yerkes C. D., Jayaswal R. K., Hallberg C. A. und Gelvin S. B. (1990): "*picA*, a novel pant-inducible locus on the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome" Journal of Bacteriology **172** (10): 5828 - 5836.
- Rosu A., Skirvin R. M., Bein A., Norton M. A., Kushad M. und Gotterbacher A. G. (1995): "The development of putative adventitious shoots from a chimeral thornless rose (*Rosa multiflora* Thunb. ex J. Murr.) in vitro" Journal of Horticultural Science **70** (6): 901 - 907.
- Rout G. R., Debata B. K. und Das P. (1991): "Somatic emryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora" Plant Cell Tissue and Organ Culture **27**: 65 - 69.
- Rout G. R., Debata B. K. und Das P. (1992): "In vitro rgeneration of shoots from callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora" Indian Journal of Experimental Biology **30** (1): 15 - 18.
- Salehi H. und Khosh-Khui M. (1997): "Effects of explant length and diameter on in vitro shoot growth and proliferation rate of miniature roses" Journal of Horticultural Science **72** (5): 673 - 676.
- Santarem E. R., Trick H. N., Essig J. S. und Finer J. J. (1998): "Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: Optimization of transient expression" Plant Cell Reports **17** (10): 752 - 759.
- Sarasan V., Roberts A. V. und Rout G. R. (2001): "Methyl laurate and 6-benzyladenine promote the germination of somatic embryos of a hybrid rose" Plant PCell Reports **20**: 183 - 186.
- Sawada H., Ieki H. und Matsuda I. (1995): "PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains" Applied and Environmental Microbiology **61** (2): 828 - 831.
- Sawahel W. A. (1997): "Plant genetic transformation technology", 137 Seiten; Daya Publishing House, Delhi.
- Schmülling T. und Schell J. (1993): "Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras" Plant Molecular Biology **21** (4): 705 - 708.

- Schuerman P. L. und Dandekar A. M. (1993): "Transformation of temperate woody crops: Progress and potentials" Scientia Horticulturae **55**: 101 - 124.
- Sharples F., E. (1991): "Ecological aspects of hazard identification for environmental uses of genetically engineered organisms" in: Levin M. A. und Strauss H. S. (Eds.): "Risk assessment in genetic engineering" Seiten 18 - 31, McGraw-Hill, Inc.
- Shattock R. C. (2003): "Disease/Rust" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 165 - 169, Elsevier Academic Press.
- Shepherd R. E. (1954): "History of the Rose", 264 Seiten; The Macmillan Company, New York.
- Shou H. X., Frame B. R., Whitham S. A. und Wang K. (2004): "Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation" Molecular Breeding **13** (2): 201-208.
- Singlachar M., Tripepi R. R. und George M. W. (1995): "Improved plant regeneration from *Rosa x hybrida* L. leaf explants" HortScience **30** (4): 872.
- Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F. und Bresinsky A. (1991): "Lehrbuch der Botanik für Hochschulen", 1030 Seiten; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Soh W.-Y., Bhojwani S. S. und Lee S. (1999): "Developmental and structural aspects of root organogenesis" in: Soh W.-Y. und Bhojwani S. S. (Eds.): "Morphogenesis in Plant Tissue Culture" Seiten 133 - 170, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Souire D. und Newdick J. (1992): "Das Rosenbuch", 159 Seiten; Christian Verlag, München.
- Souq F., Coutos-Thevenot P., Yean H., Delbard G., Maziere Y., Barbe J. P. und Bouolay M. (1995): "Genetic transformation of roses, 2 examples: one on morphogenesis, the other on anthocyanin biosynthetic pathway". Second International Symposium on Roses, Antibes, France, Feb. 1995, ISHS.
- Spencer J. A. und Wood O. W. (1992): "Resistance of selected rose cultivars to variants of *Marssonina rosae* in Mississippi" Journal of Environmental Horticulture **10** (4): 235 - 238.
- Spencer J. A. und Wood O. W. (1992): "Response of selected old garden roses to seven isolates of *Marssonina rosae* in Mississippi" Journal of Environmental Horticulture **10** (4): 221 - 223.
- Stark-Lorenzen P., Nelke B., Hänßler G., Mühlbach H. P. und Thomzik J. E. (1997): "Transfer of grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.)" Plant Cell Reports **16**: 668 - 673.
- Stoger E., Williams S., Keen D. und Christou P. (1998): "Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression" Transgenic research **7**: 463 - 471.
- Strefeler M. S. (1993): "Genetic transformation of rose (*Rosa* spp) using the biolistic process" HortScience **28** (5): 582.
- Szankowski I., Briviba K., Fleschhut J., Schönherr J., Jacobsen H.-J. und Kiesecker H. (2003): "Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene

- synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*)” Plant Cell Reports **22** (2): 141 - 149.
- Szymkowiak E. J. und Sussex I. M. (1996): “What chimeras can tell us about plant development” Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **47**: 351 - 376.
- Tang W. (2001): “*Agrobacterium*-mediated transformation and assessment of factors influencing transgene expression in loblolly pine (*Pinus taeda* L.)” Cell Research **11** (3): 237 - 243.
- Teuschel U. (1998): "Modifikation des Sekundärstoffwechsels von Pflanzen durch Stilbensynthese im Hinblick auf eine mögliche Anwendung in der Pflanzenzüchtung", Dissertation, Universität Hamburg
- Thompson C. J., Movva N. R., Tizard R., Cramer R., Davies J. E., Lauwereys M. und Botterman J. (1987): “Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*” The EMBO Journal **6** (9): 2519 - 2523.
- Tillberg E. (1983): “Levels of endogenous abscisic acid in achenes of *Rosa rugosa* during dormancy release and germination” Physiologia Plantarum **58**: 243 - 248.
- Trick H. N. und Finer J. J. (1997): “SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation” Transgenic Research **6** (5): 329 - 336.
- Trick H. N. und Finer J. J. (1998): “Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) embryogenic suspension culture tissue” Plant Cell Reports **17** (6-7): 482 - 488.
- Tsukaya H. (2000): “The role of meristematic activities in the formation of leaf blades” Journal of Plant Research **113**: 119 - 126.
- Ueda Y. (2003): "Seed maturation and germination" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **2**: Seiten 623 - 626, Elsevier Academic Press.
- Ueda Y. und Akimoto S. (2001): “Cross- and self-compatibility in various species of the genus *Rosa*” Journal of Horticultural Science and Biotechnology **76** (4): 392 - 395.
- Vain P., Afolabi A. S., Worland B. und Snape J. W. (2003): “Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/pSoup” Theoretical and Applied Genetics **107** (2): 210-217.
- Valles M. und Boxus P. (1987): “Regeneration from rose callus” Acta Horticulturae **212**: 691 - 696.
- Van der Salm T. P. M., Van der Toorn C. J. G., Bouwer R., Hänisch ten Cate C. H. und Dons H. J. M. (1997): “Production of ROL gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability” Molecular Breeding **3** (1): 39 - 47.
- Van der Salm T. P. M., Van der Toorn C. J. G., Hänisch ten Cate C. H. und Dons H. J. M. (1996): “Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the rootstock *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'” Plant Cell Reports **15** (7): 522 - 526.
- Van der Salm T. P. M., Van der Toorn C. J. G., Hänisch ten Cate C. H., Dubois L. A. M., De Vries D. P. und Dons H. J. M. (1994): “Importance of the iron chelate

- formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'" Plant Cell Tissue and Organ Culture **37** (1): 73 - 77.
- Veluthambi K., Ream W. und Gelvin S. B. (1988): "Virulence genes, borders and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*" Journal of Bacteriology **170** (4): 1523 - 1532.
- Visessuwan R., Kawai T. und Mii M. (1997): "Plant regeneration systems from leaf segment culture through embryonic callus formation of *Rosa hybrida* and *R. canina*" Breeding Science **47** (3): 217 - 222.
- von Malek B. und Debener T. (1998): "Genetic analysis of resistance to blackspot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses" Theoretical and Applied Genetics **96** (2): 228 - 231.
- von Malek B., Weber W. E. und Debener T. (2000): "Identification of molecular markers linked to *Rdr1*, a gene conferring resistance to blackspot in roses" Theoretical and Applied Genetics **101** (5-6): 977 - 983.
- Weber S., Friedt W., Landes N., Molinier J., Himber C., Rousselin P., Hahne G. und Horn R. (2003): "Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): Assessment of macerating enzymes and sonication" Plant Cell Reports **21** (5): 475 - 482.
- Wenck A., Czako M., Kanevski I. und Marton L. (1997): "Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation" Plant Molecular Biology **34** (6): 913 - 922.
- Wisniewska-Grzeskiewicz H. und Wojdyla A. T. (1996): "Evaluation of rose cultivars to fungal diseases susceptibility" Acta Horticulturae **424**: 233 - 236.
- Wissemann V. (2003): "Conventional Taxonomy (Wild Roses)" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 111 - 117, Elsevier Academic Press.
- Wyber J. A., Andrews J. und D`Emanuele A. (1997): "The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells" Pharmaceutical Research **14** (6): 750 - 756.
- Wylie A. P. (1954): "The history of garden roses, Part I" Journal of the Royal Horticultural Society **79**: 555 - 571.
- Xu X. und Pettitt T. (2003): "Disease/Downy Mildew" in: Roberts A. V., Debener T. und Gudin S. (Eds.): "Encyclopedia of Rose Science" **1**: Seiten 154 - 158, Elsevier Academic Press.
- Xue A. G. und Davidson C. G. (1998): "Components of partial resistance to black spot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf) in garden roses" Hortscience **33** (1): 96 - 99.
- Yokoya K., Roberts A. V., Mottley J., Lewis R. und Brandham P. E. (2000): "Nuclear DNA amounts in roses" Annals of Botany **85**: 557 - 561.
- Yokoya K., Walker S. und Sarasan V. (1996): "Regeneration of rose plants from cell- and tissue cultures". 2. International Symposium on Roses, Antibes, France, Feb. 1995, ISHS.
- Yusibov V. M., Steck T. R., Gupta V. und Gelvin S. B. (1994): "Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells" Proceedings of the National Academy of Science **91**: 2994 - 2998.

- Zhan X., Kawai S., Katayama Y. und Morohoshi N. (1997): "A new approach based on the leaf disc method for *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of aspen" Plant Science **123**: 105 - 112.
- Zhang L., Cheng L., Yuan J., Li C., Jia S., Xu N. und Zhao N. (1991): "Ultrasonic direct gene transfer: the establishment of high efficiency genetic transformation system for tobacco" Scientia Agricultura Sinica **24** (2): 83 - 89.
- Zhang L.-J., Cheng L.-M., Xu N., Zhao N.-M., Li C.-G., Yuan J. und Jia S.-R. (1991): "Efficient transformation of tobacco by ultrasonication" BIO/TECHNOLOGY **9**: 996 - 997.
- Zimmerman T. W. und Scorza R. (1996): "Genetic transformation through the use of hyperhydric tobacco meristems" Molecular Breeding **2** (1): 73 - 80.
- Zuker A., Ahroni A., Tzfira T., Ben-Meir H. und Vainstein A. (1999): "Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)" Molecular Breeding **5** (4): 367 - 375.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	Dichlorophenoxy-Essigsäure
ABA	Abscisinsäure
BAP	Benzylaminopurin
bar	bar, Einheit des Druckes
<i>bar</i>	Bialaphos-Resistenz-Gen aus <i>Streptomyces hygrosopicus</i>
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CoA	Co-Enzym A
CTAB	Hexadecyl-trimethylammoniumbromid
Dig	Digoxygenin
EC	embryogener Kallus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GA ₃	Gibberillinsäure 3
Gfs	Glufosinat (Ammonium-)
GS	Glutaminsynthetase
GUS	β-Glucuronidase
Hz	Genotyp Heckenzauber
IAA	Indol-Essigsäure
IBA	Indol-Buttersäure
kb	Kilobasen
L	Liter
lux	Einheit der Beleuchtungsstärke
m	Meter
M	Molarität
MES	Morpholinoethan-Sulfonsäure
mol	Mol, Einheit der Stoffmenge
MS	Murashige und Skoog-Medium
n	Nano-
n. Chr.	nach Christus
NAA	Naphtyl-Essigsäure
<i>nptII</i>	Neomycin-Phosphotransferase II-Gen
<i>nptIII</i>	Neomycin-Phosphotransferase III-Gen
OD	optische Dichte
p	Pico-
PAT	Phosphinothricin-Acetyl-Transferase
<i>pat</i>	PPT-Resistenz-Gen aus <i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü494

PC	Genotyp Pariser Charme
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylen-Glykol
<i>picA</i>	Gen aus dem Genom von <i>Agrobacterium</i>
PPT	Phosphinothricin
PR	Pathogenesis Related
PVP	Polyvinyl-Pyrrolidon
<i>R.</i>	<i>Rosa</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA _i	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAAT	sonication-assisted <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation = Ultraschall-unterstützte <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	somatische(r) Embryo(nen)
SEG	somatische Embryogenese
T-DNA	Transfer-DNA
T ₀	direkt nach Transformation regenerierte Pflanzen
T ₁	erste transgene Folgegeneration
TDZ	Thidiazuron
T _i	Tumor induzierend
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
v. Chr.	vor Christus
var.	Variante
<i>vstI</i>	Stilbensynthase-Gen aus <i>Vitis vinifera</i>
W	Watt, Einheit der Leistung
Ws	Wattsekunden
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung
μ	Mikro-
λ	Lambda, Einheit der Wellenlänge

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Southerngel mit verschieden starker Beladung und z. T. unvollständigem Verdau.....	49
Abbildung 2: Southerngel mit gleichmäßiger Beladung und vollständig verdauter DNA.....	49
Abbildung 3: Sprosswachstum <i>in-vitro</i> aus Blattachselknospen im Dunkeln	53
Abbildung 4: Sprosswachstum <i>in-vitro</i> aus Blattachselknospen im Licht	53
Abbildung 5: Spross-Organogenese an Blattspreite-Explantaten von Genotyp B	55
Abbildung 6: Spross-Organogenese an Blattstil-Explantaten von Genotyp B	55
Abbildung 7: Spross-Organogenese an Blattgrund-Explantaten von Genotyp B	55
Abbildung 8: Detailansicht der Spross-Organogenese von Genotyp B	55
Abbildung 9: Explantat ohne GUS-Expression	57
Abbildung 10: GUS-Expression in der Blattachselknospe	57
Abbildung 11: GUS-Expression in/unter der Epidermis	57
Abbildung 12: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz nach Transformation unter Selektionsdruck von 1 mg/L Gfs	57
Abbildung 13: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz ohne Transformation, Ultraschall und Selektion (Positivkontrolle)	57
Abbildung 14: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz nach Ultraschall für vier Minuten ohne Selektion (Ultraschallkontrolle)	58
Abbildung 15: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz nach Transformation ohne Selektion (Agrobakterienkontrolle)	58
Abbildung 16: Sprosse aus Blattachselknospen von Genotyp Hz ohne Transformation und Ultraschall aber mit Selektion (Negativkontrolle).....	58
Abbildung 17: Entwicklung der Sprosse unter Selektion am Beispiel des Genotyps Hz	59
Abbildung 18: Embryogener Kallus an Blattexplantat von Genotyp D.....	60
Abbildung 19: Somatische Embryonen an Blattexplantat von Genotyp D.....	60
Abbildung 20: Somatische Embryogenese an Blattexplantaten von Genotyp PC.....	60
Abbildung 21: Spross-Organogenese an Blattexplantaten von Genotyp PC.....	60
Abbildung 22: Embryogener Kallus an Blattexplantat von Genotyp PC.....	61
Abbildung 23: Somatische Embryonen von Genotyp PC.....	61
Abbildung 24: Sprossprimordien an Blattexplantat von Genotyp PC.....	61
Abbildung 25: sich entwickelnde Adventiv-sprosse an Blattexplantat von Genotyp PC.....	61
Abbildung 26: Proliferierender embryogener Kallus von Genotyp Heckenzauber	65
Abbildung 27: Zwei SE, vorne links mit verwachsenen Kotyledonen	65
Abbildung 28: Kluster somatischer Embryonen.....	65
Abbildung 29: aus embryogenem Kallus entstandene überwiegend weiche strukturlose Kallusmasse	66
Abbildung 30: aus embryogenem Kallus entstandene grüne harte Strukturen.....	66

Abbildung 31: Sprosse mit z. T. abgestorbenen Blättern auf Medium mit 40 mg/L Gfs	69
Abbildung 32: im Ganzen vitale Sprosse auf Medium mit 40 mg/L Gfs	69
Abbildung 33: selektierte Sprosse mit guter (links) und schwacher (rechts) Wurzelbildung .	70
Abbildung 34: nicht transgene Sprosse auf Bewurzelungsmedium ohne Selektion (Positivkontrolle)	70
Abbildung 35: nicht transgene Sprosse auf Bewurzelungsmedium mit Selektion (Negativkontrolle)	70
Abbildung 36: frisch getopfte Pflänzchen aus <i>in-vitro</i> Kultur	71
Abbildung 37: akklimatisierte junge Pflanze im Gewächshaus	71
Abbildung 38: "leaf paint", Wasserkontrolle.....	72
Abbildung 39: "leaf paint", Blättchen mit leichten Symptomen nach Behandlung	72
Abbildung 40:"leaf paint", Negativkontrolle nach Behandlung mit 600 mg/L Glufosinat	72
Abbildung 41: "leaf paint", resistentes Blättchen nach Behandlung mit 600 mg/L Glufosinat . .	72
Abbildung 42: nicht transgene Pflanze ist nach Spritzung mit Basta® vollständig abgestorben (Negativkontrolle)	74
Abbildung 43: potenziell transgene Pflanze nach Spritzung mit Basta® mit schweren Symptomen und Neuaustrieb (Pfeile)	74
Abbildung 44: potenziell transgene Pflanze nach Spritzung mit Basta® mit leichten Symptomen	74
Abbildung 45: chimäres Blatt mit zwei unter-schiedlich stark geschädigten Fiedern (Pfeile) nach Spritzung mit Basta®	74
Abbildung 46: Keimling der T ₁	75
Abbildung 47: junges Pflänzchen der T ₁	75
Abbildung 48: Blütenknospe von nicht transgener Pflanze, Genotyp Hz	76
Abbildung 49: voll geöffnete Blüte von nicht transgener Pflanze, Genotyp Hz	76
Abbildung 50: 18-01 (10) II	77
Abbildung 51: 18-04 (07) I	77
Abbildung 52: 18-04 (10) I	77
Abbildung 53: 18-14 (14) I	77
Abbildung 54: 18-14 (14) IV	77
Abbildung 55: 18-19 (14) I	77
Abbildung 56: 18-14 (14) V	77
Abbildung 57: 18-15 (09) II	77
Abbildung 58: 18-15 (09) IV	77
Abbildung 59: 18-19 (14) VI	77
Abbildung 60: K 02 (04) II	77
Abbildung 61: K 02 (06) I	77

Abbildung 62: Vergleich von T ₀ und T ₁ in der PCR	79
Abbildung 63: Vergleich von T ₀ und T ₁ in der PCR	79
Abbildung 64: falsch-positive PCR Ergebnisse in Proben von Pflanze 18-15 durch Agrobakterien	80
Abbildung 65: Southern Blot von Pflanzen desselben Explantates mit gleichen Banden in allen vier Pflanzen	82
Abbildung 66: Southern Blot von Pflanzen desselben Explantates mit verschiedenem Bandenmuster	82
Abbildung 67: Southern Blot von Pflanzen desselben Explantats mit gleichen und verschiedenen Banden	83
Abbildung 68: Southern Blot von Pflanzen desselben Explantats mit gleichen und verschiedenen Banden	83
Abbildung 69: Southern Blot von Pflanzen derselben Sprosslinie und Proben derselben Pflanze	84
Abbildung 70: Vergleich von T ₀ und T ₁ im Southern Blot, Elter 16-21.....	85
Abbildung 71: Vergleich von T ₀ und T ₁ im Southern Blot , Elter 18-04.....	86
Abbildung 72: Vergleich von T ₀ und T ₁ im Southern Blot , Elter 18-19.....	87
Abbildung 73: RT-PCR einiger T ₀ Pflanzen	89

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotid-Primer.....	38
Tabelle 2: Zusammensetzung analytischer PCRs.....	47
Tabelle 3: Bedingungen für PCR-Analysen	47
Tabelle 4: Zusammensetzung der PCRs zur Herstellung DIG-markierter Sonden	50
Tabelle 5: Programm der PCR zur Herstellung DIG-markierter Sonden	50
Tabelle 6: Induktion von Spross-Organogenese an Blattexplantaten	54
Tabelle 7: Effekt von Ultraschall auf Sprosswachstum aus <i>in-vitro</i> -Blattachselknospen nach der Co-Kultur	56
Tabelle 8: Gewebereaktion nach verschiedener Präparation und 2,4-D-Konzentration	62
Tabelle 9: Reaktion der Genotypen A, B, C, D auf verschiedene Hormonkonzentrationen .	63
Tabelle 10: Reaktion der Genotypen E, F, Hz, PC auf verschiedene Hormonkonzentrationen ..	64
Tabelle 11: Kallusentwicklung unter Selektionsdruck	67
Tabelle 12: Sprossdifferenzierung unter Selektionsdruck	68
Tabelle 13: Etablierung von Sprosslinien nach Transformation unter Selektionsdruck	69
Tabelle 14: Bewurzelung selektierter Sprosse	71
Tabelle 15: "leaf paint" mit 1 g/L Basta® nach 4 Wochen	73
Tabelle 16: Fruchtansatz nach Selbstung, Genotyp Hz	75
Tabelle 17: Keimung der T ₁	76
Tabelle 18: PCR-Ergebnisse der Eltern und Nachkommen	81
Tabelle 19: Southern Blot - Ergebnisse der Regenerate (T ₀) und der Nachkommen (T ₁)	88
Tabelle 20: RT-PCR mit <i>vst</i> -Primern	89

8.4 Zeichnungsverzeichnis

Zeichnung 1: Entstehung "backbone"-freier T ₁ aus Eltern mit "backbone"-Sequenzen	109
Zeichnung 2: Trennung von zwei unabhängigen transgenen Loci in der T ₁	115
Zeichnung 3: Entwicklung eines gefiederten Blattes	120

8.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. H.-J. Jacobsen dafür danken, dass er mir das Thema der Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat. Zu danken ist auch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Referats.

Bei Prof. Th. Debener bedanke ich mich für seine Unterstützung in Fragen der Molekularbiologie und besonders für seine spontane Bereitschaft zur kurzfristigen Übernahme des Korreferats.

Dr. Heiko Kiesecker danke ich herzlich für seine zuverlässige Betreuung und moralische Unterstützung, auch und gerade nach seinem Weggang aus Hannover.

Herrn Prof. Grunewald und seinem Team danke ich für freundlich Aufnahme während meines Aufenthalts im IZZ in Ahrensburg.

Frau Dr. A. Dohm gilt mein besonderer Dank für die Einarbeitung in die somatische Embryogenese bei Rosen sowie ihre Beratung und Hilfsbereitschaft bei der Etablierung im Labor in Hannover.

Herrn Dr. R. Hein, Bayer Crop Science, ist für die Bereitstellung des Konstruktes mit *vst* für die Transformation zu danken.

Den Rosenzüchtern gilt mein Dank für die bereitgestellten Pflanzen und besonders Dr. Th. Proll für sein Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Meinen Mit-Doktoranden danke ich für geteiltes Freud und Leid und ihre Kollegialität.

Maresa Kiel, Andrea Schmoll und Stephanie Bickel danke ich für ihre technische Assistenz.

Ganz besonders und herzlich danke ich meiner Partnerin Anke, die mich entlastet, gefordert, aufgemuntert, angetrieben, abgelenkt, korrigiert und noch etliches mehr getan hat. Sie hat sehr viel Verständnis und Geduld gehabt und wusste immer, womit sie mich gerade am besten unterstützen konnte.

Es sei hier auch allen gedankt, die mich auf die eine oder andere Weise unterstützt haben und nicht persönlich erwähnt werden.

8.6 Lebenslauf

Name: Halbach
Vorname: Thomas
Geburtsdatum: 26.03.1973
Geburtsort: Lüdenscheid
Wohnort: Johann-Sebastian-Bach-Str. 21
38820 Halberstadt
Familienstand: eheähnliche Gemeinschaft

Schulbildung:

4 Jahre Grundschule
2 Jahre Orientierungsstufe
7 Jahre Ratsgymnasium Hannover
Abitur 1992

Zivildienst:

10/92 – 01/94 Ortsgruppe Laatzen des Naturschutzbund Deutschland e.V. (Nabu)
Betreuung des Informations-Zentrums „Südliche Leinemasch“:
U.a. Zusammenstellung von Informationsmaterial, Führungen von
Gruppen, Beobachtungen und Kontrollen im Naturschutzgebiet.

Studium:

10/93 - 12/98 Studium der Biologie an der Universität Hannover
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Pflanzenphysiologie
Diplom 1998

Diplomarbeit an der Universität Hannover,
Lehrgebiet für Molekulargenetik,
Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Titel: Etablierung von *in-vitro* Kulturen und Experimente zur
Transformation von *Lens culinaris* Medik.

Berufstätigkeit:

- 01/99 - 03/03 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrgebiet für Molekulargenetik der Universität Hannover, Prof. Dr. H.-J. Jacobsen
- Projekt: Niedersächsischen Forschungsschwerpunkt Agrarbiotechnologie
- Thema: Entwicklung und Etablierung molekulargenetischer Methoden zur Produktion pilzresistenter Zierpflanzen am Objekt Rose, *Rosa*
- Schwerpunkt der Arbeitstechniken im Labor:
Methoden der pflanzlichen Gewebekultur und der Transformation, molekularbiologische Methoden
- Betreuung mehrwöchiger, ganztägiger Studentenpraktika
- 04/03 – 07/04 erwerbslos, Fortführung der Promotion
- 08/04 – 12/04 Laborleitung im Gewebekulturlabor der Firma Fr. Strube Saatzucht KG, Söllingen, sowie Durchführung eines Projekts zur Produktion von Doppelhaploiden Zuckerrüben (Mutterschaftsvertretung)
- ab 01/05 Elternzeit, Fortführung der Promotion

Weitere Tätigkeiten:

- 01/00 – 01/02 Referent bei der Deutschen Stiftung für internationale Entwicklung (DSE) im Rahmen von Kursen aus dem Bereich Biotechnologie:
- Vorlesung und Übung “laboratory calculations“ (in Zschortau)
Betreuung des praktischen Programmteils “tissue culture methods“ (in Oberdorla/Hannover)
- 08/03 Referent im Rahmen einer Fortbildung Bioinformatik:
einwöchiges Seminar „Grundlagen der Genetik“

Besondere Kenntnisse:

- Sprachen Sehr gutes Englisch in Wort und Schrift
- EDV Gute Kenntnisse im Umgang mit allen gängigen Programmen zur Tabellenkalkulation, Textverarbeitung, Bildbearbeitung und Präsentation (MS-Office, Corel-Office, StarOffice u.a.), Internetnutzung
- GenTSV Teilnahme an einem Fortbildungslehrgang zur Gentechnischen Sicherheit nach § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV