

Somatische Hybridisierungen
zwischen Vertretern der Gattungen
Petunia und *Calibrachoa*

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung
des akademischen Grades einer

Doktorin der Gartenbauwissenschaften
-Dr. rer. hort.-

genehmigte
Dissertation

von
Dipl.- Ing. agr. Lara Meyer
geboren am 30.09.1974 in Hildesheim

2006

Referent: Prof. Dr. M. Serek

Korreferent: Prof. Dr. T. Winkelmann

Tag der Promotion: 11.05.2007

Kurzfassung

Petunia und *Calibrachoa* sind ein fester Bestandteil des heutigen Beet- und Balkonpflanzensortiments. Von züchterischer Seite besteht ein großes Interesse daran, die positiven Eigenschaften beider Pflanzen, wie z. B. Farbvielfalt der *Calibrachoa* sowie die Toleranz der *Petunia* gegenüber höheren pH-Werten, zu vereinen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die somatische Hybridisierung zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* mittels Protoplastenfusion. Hierbei wurde ein System für die Isolierung und Regeneration von Mesophyll- sowie Petalenprotoplasten für verschiedene *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen etabliert. Abhängig von Genotyp und Versuch variierte dabei die Anzahl der isolierten Protoplasten beträchtlich. So wurden für die *Calibrachoa*-Genotypen im Mittel Ausbeuten zwischen $1,1$ und $4,2 \times 10^6$ Protoplasten je Gramm Frischmasse und für die *Petunia*-Genotypen zwischen $0,6$ und $3,5 \times 10^6$ je Gramm Frischmasse erzielt.

Die Protoplasten- sowie Kalluskultur erfolgte in verschiedenen Medien, welche zu gleichen Teilen Auxin sowie Cytokinin (1,0 bzw. 0,5 mg/l) enthielten. Für die Regeneration von Sprossen wurden verschiedene cytokininbetonte Medien getestet.

Zellteilungen sowie Kallusbildung wurden mit einer Ausnahme bei allen untersuchten Genotypen beobachtet. Abhängig vom Genotyp unterschieden sich die ermittelten Teilungsraten, die für sieben *Calibrachoa*- und vier *Petunia*-Genotypen ermittelt wurden, jedoch beträchtlich. Ebenso wie bei der Teilung wurden auch bei der Sprossregeneration genotypische Unterschiede beobachtet. Vier der neun untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen regenerierten auf den untersuchten Medien keine Sprosse, während bei den anderen fünf Genotypen deutliche Unterschiede in der Regenerationsrate abhängig von dem Phytohormongehalt der Medien beobachtet werden konnten.

Zur Charakterisierung der aus Protoplasten hervorgegangenen Regenerate wurden 55 bzw. 70 Pflanzen zweier *Calibrachoa* Genotypen, sowie 85 bzw. 70 Pflanzen, regeneriert aus Mesophyll- bzw. Petalenprotoplasten eines *Petunia*-Genotyps, ins Gewächshaus überführt. Die Rate der erfolgreich ins Gewächshaus überführten Pflanzen lag bei 96 - 98 %. Neben zwei Pflanzen mit Chlorophylldefekten wurde für 2,3 und 5,8 % der untersuchten Pflanzen eine veränderte Ploidiezahl beobachtet.

Die Selektion der Heterofusionsprodukte sollte zunächst durch die Stoffwechsellinhibitoren Rhodamin 6G und Jodacetamid erfolgen. Es konnte jedoch keine Konzentration ermittelt werden bei der effektiv und reproduzierbar die Teilung der Protoplasten gehemmt wurde.

Für die Protoplastenfusion wurde ein Protokoll zur Massenfusion mittels PEG etabliert. Durch die Verwendung von Petalenprotoplasten, gekennzeichnet durch ihre intensive Färbung als einer der Fusionspartner, war es möglich, die Fusion der Protoplasten sowie die Entwicklung der heterologen Fusionsprodukte während der ersten Teilungen zu verfolgen und so die Fusion zwischen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Protoplasten nachzuweisen. Es konnten Heterofusionsraten von bis zu 17 % erzielt werden.

Durch die Verwendung so genannter "Cell Finder" Objektträger (Objektträger mit einem Koordinatensystem bestehend aus Feldern mit Buchstaben und Zahlen) auf die die Protoplasten nach der Fusion mittels Agarose plattiert wurden, konnte die Position der heterologen Fusionsprodukte auf dem Träger zu jedem Zeitpunkt der Kultur bestimmt

werden. Die mutmaßlich heterologen Mikrokallusse wurden auf ein mit Agarose verfestigtes Kalluswachstumsmedium überführt. Im Anschluss daran erfolgte die Sprossregeneration.

Die Untersuchung der Fusionskallusse erfolgte mittels RAPD- bzw. AFLP-Analyse, dabei wiesen mehrere Kallusse aus Kombinationen verschiedener Genotypen Banden beider Eltern auf. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen um Hybridkallusse handelt. Bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit regenerierten zwei dieser Kallusse Sprosse. Der Hybridstatus dieser Sprosse konnte jedoch mittels RAPD-Analyse nicht nachgewiesen werden.

(Schlagwörter: *Petunia*, Protoplasten, somatische Hybridisierungen)

Abstract

Petunia and *Calibrachoa* are ornamental plants of worldwide economic importance. For breeding purposes it is interesting to combine the favourable characteristics of *Calibrachoa*, such as the spectrum of flower colours, and the better pH tolerance of *Petunia*. Somatic hybridization is a suitable method for combining these characteristics and for creating genetic variability in species that can not be hybridized by sexual crossings.

Somatic hybridization between *Petunia*- and *Calibrachoa*- protoplasts was the main objective of presented PhD thesis. A system for protoplast isolation and regeneration of mesophyll and petal protoplasts was developed for different genotypes of *Petunia* and *Calibrachoa*. Depending on the genotype there was a big variation in the number of isolated protoplasts. Protoplast yield varied between 1,1 and 4,2 x 10⁶ protoplasts per gramm fresh weight for *Calibrachoa* and between 0,6 and 3,5 x 10⁶ protoplasts per gramm fresh weight for *Petunia*.

The protoplast culture media for protoplast regeneration and callus culture contained auxins and cytokinins, both at the same proportion (1,0 or 0,5 mg/l). For shoot regeneration different media with different concentrations of cytokinins and auxins were tested.

Cell division and callus formation were achieved for all genotypes, except one. Depending on the genotypes there was a big variation in cell division rates analyzed for seven *Calibrachoa* and four *Petunia* genotypes. Big differences were also observed in shoot regeneration. Shoot regeneration was only observed for four of nine analyzed *Calibrachoa* genotypes and was depending on phytohormone combination and concentration of the medium.

Shoot regeneration was achieved only for some genotypes. A part of shoots (280 in total, originated from three different genotypes) were transferred into the greenhouse and analyzed by flow cytometry. The acclimatization rate varied between 96 and 98 %. The fraction of plants with changes in ploidy level was higher for two *Calibrachoa* genotypes (7,5 % and 5,8 %), regenerated from diploid base material, than for the *Petunia* genotype (2,3 % and 0 %), regenerated from tetraploid material.

The heterofusion products should be selected by the cell cycle inhibitors rhodamine 6 G and iodoacetate. Unfortunately, no concentration for effective and reproducible inhibition of cell division was found and therefore this strategy was abandoned.

A protocol for protoplast fusion applying PEG was established. The use of petal protoplasts as one fusion partner characterized by their colour allows the observation of heterofusion products during the first cell divisions. But the colour decreased with every cell division. Heterofusion rates up to 17 % could be obtained.

Cell finder slides with a coordinate system offered the opportunity to identify the position of the heterofusion products which were fixed on the slide with agarose. The calluses regenerated from different fusion experiments were transferred to agarose solidified callus regeneration media.

The calluses obtained were analysed RAPD analysis. Some of the amplified band pattern contained bands of both fusion parents. These calluses could be hybrid calluses. The hybrid nature of some calluses was also proven by AFLP analysis. Until the end of the presented PhD study only two of this calluses regenerated shoots but after RAPD analysis no hybrid shoots were detected.

(keywords: *petunia*, protoplasts, somatic hybridization)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	
Tabellenverzeichnis.....	
Abbildungsverzeichnis.....	
1 Allgemeine Einleitung.....	1
2 Charakterisierung des Pflanzenmaterial.....	6
2.1 Einleitung.....	6
2.2 Material und Methoden.....	7
2.2.1 Pflanzenmaterial und Kultur.....	7
2.2.2 Cytogenetische Untersuchung des Pflanzenmaterial mittels Durchfluss- cytometrie.....	10
2.2.3 Molekulargenetische Untersuchung des Pflanzenmaterials.....	10
2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-DNA.....	11
2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese.....	11
2.2.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	12
2.2.3.4 RAPD-PCR.....	12
2.2.3.5 Identifizierung geeigneter Primer zur Differenzierung von <i>Petunia</i> und <i>Calibrachoa</i> sowie potentieller Hybriden.....	14
2.2.3.6 Untersuchung der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen <i>Petunia</i> und <i>Calibrachoa</i> , Erstellung eines Phänogramms mittels RAPD-Marker.....	15
2.2.3.7 Bestimmung der Nachweisgrenze von geringen DNA-Mengen in DNA-Mischproben.....	16
2.3 Ergebnisse.....	18
2.3.1 Cytogenetische Untersuchung des Pflanzenmaterials mittels Durchfluss- cytometrie.....	18
2.3.2 Molekulargenetische Untersuchung des Pflanzenmaterials.....	21
2.3.2.1 Identifizierung geeigneter Primer zur Differenzierung von <i>Petunia</i> und <i>Calibrachoa</i> sowie potentieller Hybriden.....	21

2.3.2.2 Untersuchung der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen <i>Petunia</i> und <i>Calibrachoa</i>	23
2.3.2.3 Bestimmung der Nachweisgrenze von geringen DNA-Mengen in DNA-Mischproben.....	27
2.4 Diskussion.....	28
3 Protoplastenkultur bei <i>Petunia</i> und <i>Calibrachoa</i>.....	36
3.1 Einleitung.....	36
3.2 Material und Methoden.....	38
3.2.1 Pflanzenmaterial.....	38
3.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen und Kulturmedien für die Protoplastenisolation und -kultur.....	39
3.2.3 Isolierung und Reinigung der Protoplasten.....	42
3.2.4 Kultur der Protoplasten.....	43
3.2.4.1 Flüssigkultur.....	44
3.2.4.2 Einbettung in Alginat.....	44
3.2.4.3 Einfluss der Enzymkonzentration auf die Vitalität von <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> -Protoplasten.....	45
3.2.4.4 Entwicklung von Mesophyllprotoplasten verschiedener <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> -Genotypen in Flüssigkultur bzw. Kultur in Alginat.....	45
3.2.4.5 Entwicklung von Petalenprotoplasten verschiedener <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> - Genotypen in Flüssigkultur.....	46
3.2.5 Kalluskultur und Sprossregeneration.....	46
3.2.5.1 Einfluss verschiedener Phytohormone auf die Regeneration von Sprossen an Kallussen aus Mesophyllprotoplasten.....	47
3.2.5.2 Einfluss verschiedener Phytohormone auf die Regeneration von Sprossen an Kallussen aus Petalenprotoplasten.....	47
3.2.6 Charakterisierung der Regenerate aus Protoplasten.....	48
3.2.6.1 Überführung ins Gewächshaus und Kultur.....	48
3.2.6.2 Untersuchung der aus Protoplasten regenerierten Pflanzen auf Abweichungen der Ploidiestufe sowie vom Phänotyp der Ausgangspflanzen.....	49
3.2.7 Bonituren, Auswertungen und statistische Verrechnung.....	50

3.3 Ergebnisse.....	52
3.3.1 Isolierung der Protoplasten.....	52
3.3.1.1 Isolierung von Mesophyllprotoplasten verschiedener <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> -Genotypen.....	52
3.3.1.2 Isolierung von Petalenprotoplasten verschiedener <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> -Genotypen.....	54
3.3.2 Protoplastenkultur und Sprossregeneration.....	55
3.3.2.1 Entwicklung von Mesophyllprotoplasten sowie der Vergleich der beiden Kultursysteme: Flüssigkultur bzw. Kultur in Alginat.....	55
3.3.2.2 Ermittlung der Teilungsraten von Petalenprotoplasten von zwei <i>Petunia</i> - und zwei <i>Calibrachoa</i> -Genotypen.....	58
3.3.2.3 Einfluss verschiedener Phytohormone auf die Regeneration von Sprossen.....	59
3.3.2.4 Einfluss verschiedener Phytohormone auf die Regeneration von Sprossen an Kallussen aus Petalenprotoplasten.....	62
3.3.3 Charakterisierung der Regenerate aus Protoplasten.....	64
3.3.3.1 Überführung ins Gewächshaus.....	64
3.3.3.2 Untersuchung der aus Protoplasten regenerierten Pflanzen auf Abweichungen vom Phänotyp der Ausgangspflanzen.....	65
 3.4 Diskussion.....	 68
 4 Somatische Hybridisierung.....	 78
4.1 Einleitung.....	78
4.2 Material und Methoden.....	80
4.2.1 Pflanzenmaterial.....	80
4.2.2 Einfluss von Rhodamin 6G und Jodacetamid auf die Entwicklung von <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> -Protoplasten.....	81
4.2.3 Fusionsexperimente mit ungehemmten und gehemmten Mesophyllprotoplasten...	81
4.2.4 Fusionsexperimente mit Petalenprotoplasten.....	82
4.2.4.1 Ermittlung der Heterofusionsrate für verschiedene Fusionskombinationen.....	83
4.2.4.2 Selektion der heterologen Fusionsprodukte mittels “Cell Finder“-Objektträgern.....	84
4.2.4.3 Vergleich verschiedener Fusionslösungen und -methoden.....	84

4.2.5 Kultur der fusionierten Protoplasten.....	85
4.2.6 Durchflusscytometrische Untersuchung der aus Fusionsexperimenten gewonnenen Sprosse.....	86
4.2.7 Molekulargenetische Untersuchungen.....	87
4.2.7.1 Untersuchung der aus Fusionsexperimenten gewonnenen Sprosse bzw. Kallusse mittels RAPD-Analyse.....	87
4.2.7.2 Untersuchung der aus Fusionsexperimenten gewonnenen Sprosse bzw. Kallusse mittels AFLP-Analyse.....	88
4.2.8 Statistische Verrechnung.....	93
4.3 Ergebnisse.....	94
4.3.1 Einfluss von R6G und JAA auf die Entwicklung von <i>Petunia</i> -Protoplasten.....	94
4.3.2 Einfluss von R6G und JAA auf die Entwicklung von <i>Calibrachoa</i> -Protoplasten...	97
4.3.3 Fusionsexperimente mit ungehemmten sowie gehemmten Mesophyllprotoplasten	100
4.3.4 Fusionsexperimente mit Petalenprotoplasten.....	107
4.3.4.1 Ermittlung der Heterofusionsraten für verschiedene Fusionskombinationen....	107
4.3.4.2 Selektion der heterologen Fusionsprodukte mittels “Cell Finder“-Objektträgern.....	109
4.3.4.3 Vergleich verschiedener Fusionslösungen und -methoden.....	111
4.3.5 Kultur der fusionierten Protoplasten.....	112
4.3.6 Durchflusscytometrische Untersuchung der Sprosse aus Fusionen mit gehemmten Protoplasten.....	113
4.3.7 Molekulargenetische Untersuchungen.....	115
4.3.7.1 Molekulargenetische Untersuchung der aus Fusionsexperimenten mit gehemmten und ungehemmten Protoplasten regenerierten Sprosse mittels RAPD-Analyse.....	115
4.3.7.2 Molekulargenetische Untersuchung der aus Fusionsexperimenten mit Petalenprotoplasten regenerierten Kallusse und Sprosse mittels RAPD-Analyse.....	116
4.3.7.3 Untersuchung der Fusionskallusse mittels AFLP-Analyse.....	122
4.4 Diskussion.....	125

5 Zusammenfassung.....	137
6 Ausblick.....	139
7 Literaturverzeichnis.....	141
Anhang.....	152

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2iP	6-(γ,γ -Dimethylallylamino)purin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
Bp	Basenpaare
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-2HCl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	Fluoreszeindiacetat
FM	Frischmasse
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'2-ethansulfonsäure
IAA	Indol-3-Essigsäure
JAA	Jodacetamid
KM8p	Medium nach KAO UND MICHAYLUK (1975)
MS	Medium nach MURASHIGE UND SKOOG (1962)
NAA	Naphthylessigsäure (α -Isomer)
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
R6G	Rhodamine 6G
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
TDZ	Thidiazuron
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Upm	Umdrehung pro Minute
VT	Volumenteil

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Liste der untersuchten <i>Petunia</i> -Genotypen.....	9
Tab. 2.2: Liste der untersuchten <i>Calibrachoa</i> -Genotypen.....	9
Tab. 2.3: Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen.....	11
Tab. 2.4: Zusammensetzung 5 x TAE-Puffer.....	12
Tab. 2.5: Zusammensetzung Gel-Ladepuffer (Orange).....	12
Tab. 2.6: Zusammensetzung des RAPD-PCR-Reaktionsansatzes.....	13
Tab. 2.7: RAPD-PCR-Bedingungen.....	13
Tab. 2.8: Zusammensetzung des 10 x Williams-Puffers.....	14
Tab. 2.9: Zusammensetzung des λ Pst-Markers.....	14
Tab. 2.10: Mischungsverhältnis <i>Petunia/Calibrachoa</i> für die Bulkanalyse.....	17
Tab. 2.11: Vergleich der DNA-Gehalte verschiedener Arten in durchflusscytometrischen Analysen.....	20
Tab. 2.12: Distanzmatrix für den paarweisen Vergleich der untersuchten Genotypen (Distanzkoeffizient nach Dice).....	24
Tab. 2.13: Für die Erstellung des Phänogramms verwendete Primer sowie die Anzahl der ausgewerteten Marker.....	25
Tab. 3.1: Zusammensetzung der Präplasmolyselösung.....	40
Tab. 3.2: Zusammensetzung und Herstellung der Enzymlösung für die Protoplastenisolation.....	40
Tab. 3.3: Zusammensetzung der Pufferlösung.....	40
Tab. 3.4: Zusammensetzung und Verwendungszweck der Protoplastenkulturmedien.....	41
Tab. 3.5: Gehalte an Phytohormonen in den Sprossregenerationsmedien und Sprosswachstumsmedien.....	41
Tab. 3.6: Anzahl der kultivierten Schalen sowie die Anzahl der plattierten Kallusse je Schale (Mesophyllprotoplasten).....	47
Tab. 3.7: Anzahl der kultivierten Schalen sowie die Anzahl der plattierten Kallusse je Schale (Petalenprotoplasten).....	48
Tab. 3.8: Einfluss verschiedener Hormonkombinationen und -konzentrationen auf die Sprossregeneration von Kallussen aus Petalenprotoplasten von zwei <i>Petunia</i> - und einem <i>Calibrachoa</i> -Genotypen.....	63
Tab. 3.9: Erfolg bei der Überführung der aus Protoplasten regenerierten Pflanzen ins Gewächshaus.....	64

Tab. 3.10: Anteil der Pflanzen aus Protoplastenkultur mit Chlorophylldefekten.....	65
Tab. 3.11: Anzahl polyploider Regenerate aus Protoplasten.....	66
Tab. 4.1: Zusammensetzung der verwendeten Fusionslösungen.....	85
Tab. 4.2: Zusammensetzung des DNA-Extraktionspuffers nach DOROKOV UND KOCKE (1997).....	88
Tab. 4.3: Zusammensetzung des Restriktionsmixes.....	89
Tab. 4.4: Zusammensetzung des 10 x RL-Puffers.....	89
Tab. 4.5: Zusammensetzung des Ligationsansatzes.....	90
Tab. 4.6: Zusammensetzung des Präamplifikationsmixes.....	90
Tab. 4.7: PCR-Bedingungen für die Präamplifikation.....	90
Tab. 4.8: Reaktionsmix für die Hauptreaktion (Endvolumen 10µl).....	91
Tab. 4.9: PCR-Bedingungen für die Hauptreaktion.....	91
Tab. 4.10: Zusammensetzung des TE-Puffers 10 / 0,1.....	92
Tab. 4.11: Verwendete Primer für die AFLP-Reaktion.....	92
Tab. 4.12: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels (8 %).....	93
Tab. 4.13: Zusammensetzung des Ladepuffers.....	93
Tab. 4.14: Zusammensetzung des Longrun TBE-Puffers.....	93
Tab. 4.15: Liste der durchgeführten Fusionsexperimente, bei denen die Protoplasten mit Hemmstoffen behandelt wurden.....	104- 106
Tab. 4.16: Mittels RAPD-Analyse untersuchte Fusionsprosse.....	115
Tab. 4.17: Liste der molekulargenetisch untersuchten Fusionskallusse.....	116
Tab. 4.18: Auswertung der mit Primer A09 amplifizierten Bandenmuster für verschiedene Fusionskombinationen.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Entwicklung der Verkaufszahlen für <i>Calibrachoa</i> und <i>Petunia</i> im Zeitraum von 2000-2004 (Daten aus dem Geschäftsbericht der NBV-UGA).....	2
Abb. 1.2: Preisentwicklung je Topf für <i>Calibrachoa</i> und <i>Petunia</i> im Zeitraum von 2000-2004 (Daten aus dem Geschäftsbericht der NBV-UGA).....	3
Abb. 2.1: λ Pst-Größenstandard.....	14
Abb. 2.2: Beispiel für die Auswertung der Bandenmuster des Primers A09.....	16
Abb. 2.3: Vergleich der relativen DNA-Gehalte verschiedener <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> -Genotypen (ermittelt in durchflusscytometrischen Analysen).....	19
Abb. 2.4: Durchflusscytometrisch erstellte Histogramme a: <i>Petunia</i> Pt02, b: <i>Calibrachoa</i> Ca02, c: Mischprobe Pt02 und <i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate).....	20
Abb. 2.5: Vergleich der Bandenmuster verschiedener <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> -Genotypen, nach Amplifikation mit Primer A20.....	22
Abb. 2.6: Beispiel für einen Primer (A09) zur Unterscheidung möglicher Hybriden zwischen fünf <i>Petunia</i> - und vier <i>Calibrachoa</i> -Genotypen.....	22
Abb. 2.7: Grafische Darstellung (Phänogramm) des Verwandtschaftsverhältnisses der untersuchten Genotypen sowie weiterer Vertreter aus der Familie der <i>Solanaceae</i> (basierend auf RAPD-Markern).....	26
Abb. 2.8: Bestimmung der Nachweisgrenze von geringen DNA-Konzentrationen innerhalb einer Mischprobe von <i>Calibrachoa</i> und <i>Petunia</i>	27
Abb. 3.1: Schematischer Ablauf der Isolierung, Reinigung und Einbettung bzw. Überführung in flüssiges Medium von <i>Calibrachoa</i> - und <i>Petunia</i> -Protoplasten	43
Abb. 3.2: Protoplastenausbeuten für verschiedene <i>Calibrachoa</i> -Genotypen in Abhängigkeit der Konzentration von Macerozyme und Cellulase.....	53
Abb. 3.3: Protoplastenausbeuten für verschiedene <i>Petunia</i> -Genotypen in Abhängigkeit der Konzentration von Macerozyme und Cellulase.....	53
Abb. 3.4: Einfluss der Enzymkonzentration auf die Vitalität von <i>Petunia</i> - und <i>Calibrachoa</i> -Mesophyllprotoplasten drei Tage nach der Isolierung.	54
Abb. 3.5: Protoplastenausbeute für vier <i>Petunia</i> - und zwei <i>Calibrachoa</i> -Genotypen (0,6 % Macerozyme und 2,0 % Cellulase) bei Isolierung aus Petalenprotoplasten.....	55

Abb. 3.6: Vergleich der Durchmesser von in Alginat eingebetteten und in Flüssigmedium kultivierten Protoplasten am Beispiel von zwei <i>Petunia</i> - und zwei <i>Calibrachoa</i> -Genotypen.....	57
Abb. 3.7: Vergleich der Kultursysteme: Kultur von Mesophyllprotoplasten in Alginat eingebettet bzw. Kultur in Flüssigmedium verschiedener <i>Calibrachoa</i> -Genotypen.....	57
Abb. 3.8: Vergleich der Kultursysteme: Kultur von Mesophyllprotoplasten in Alginat eingebettet bzw. Kultur in Flüssigmedium verschiedener <i>Petunia</i> - Genotypen..	58
Abb. 3.9: Bestimmung der Teilungsraten für Petalenprotoplasten von zwei <i>Petunia</i> - und zwei <i>Calibrachoa</i> -Genotypen nach drei, fünf und siebentägiger Kultur.....	59
Abb. 3.10: Kalluse von Genotyp Pt01 nach achtwöchiger Kultur auf Sprossregenerationsmedium (2,0 mg/l IAA und 1,0 mg/l BAP).....	60
Abb. 3.11: Sprossregeneration von verschiedenen <i>Calibrachoa</i> -Genotypen auf Medien mit unterschiedlichen Phytohormongehalten nach achtwöchiger Kultur.....	61
Abb. 3.12: Sprossregeneration von vier <i>Petunia</i> -Genotypen auf Medien mit unterschiedlichen Phytohormongehalten nach achtwöchiger Kultur.....	61
Abb. 3.13: Kalluse des <i>Petunia</i> -Genotyps Pt03 aus Protoplasten nach achtwöchiger Kultur auf Medien mit unterschiedlichen Phytohormonkombinationen.....	62
Abb. 3.14: Kalluse und Sprosse regeneriert aus Petalenprotoplasten nach achtwöchiger Kultur. Links: <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07. Rechts: <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca07....	63
Abb. 3.15: Aus Protoplasten regenerierte und erfolgreich ins Gewächshaus überführte <i>Petunia</i> -Pflanzen (Genotyp Pt07).....	64
Abb. 3.16: Chlorophylldefekte an Regeneraten aus Protoplastenkultur (<i>Petunia</i> -Genotyp Pt07).....	65
Abb. 3.17: Bild a, b und d sind Beispiele für morphologisch abweichende Pflanzen regeneriert aus Protoplasten, im Vergleich zum Ausgangsphänotyp, Bild c und e. (b-c: <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07, d-e: <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca10).....	67
Abb. 4.1: Einfluss steigender Jodacetamid-Konzentrationen auf die Teilung von <i>Petunia</i> -Protoplasten nach 3, 5 und 7 Tagen.....	95
Abb. 4.2: Einfluss steigender Rhodamin 6G-Konzentrationen auf die Teilung von <i>Petunia</i> -Protoplasten nach 3, 5 und 7 Tagen.....	95
Abb. 4.3: Darstellung der Variation in der Hemmstoffwirkung von Rhodamin 6G auf die Teilung von <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07 zwischen drei durchgeführten Experimenten nach siebentägiger Kultur.....	96

Abb. 4.4: Einfluss der Hemmstoffe R6G und JAA auf den Anteil intakter <i>Petunia</i> -Protoplasten (Genotyp Pt09) nach der Behandlung.	96
Abb. 4.5: Einfluss steigender Jodacetamid-Konzentrationen auf die Teilung in <i>Calibrachoa</i> -Protoplastenkulturen nach 3, 5 und 7 Tagen.	97
Abb. 4.6: Einfluss steigender JAA-Konzentrationen auf die Teilung in <i>Calibrachoa</i> -Protoplastenkulturen am Beispiel der Genotypen Ca07 (a) und Ca06 (b) nach neuntägiger Kultur.	98
Abb. 4.7: Darstellung der Variation in der Hemmstoffwirkung von Jodacetamid auf die Teilung von <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca08 zwischen drei durchgeführten Experimenten nach siebentägiger Kultur.	98
Abb. 4.8: Einfluss steigender Rhodamin-Konzentrationen auf die Teilung von <i>Calibrachoa</i> -Protoplastenkulturen nach 3, 5 und 7 Tagen.	99
Abb. 4.9: Einfluss von 0,55 mM R6G und JAA 0,55 mM auf den Anteil intakter <i>Calibrachoa</i> -Protoplasten (Genotypen Ca03) nach der Behandlung Ca07. (Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen).	100
Abb. 4.10: Mit DAPI angefärbte Zellkerne von Protoplasten (Zellkerne blau) unter UV-Licht Rot eingezeichnet: Protoplasten, bei denen die Zellkerne nicht angefärbt sind.	101
Abb. 4.11: a: Aggregation der Protoplasten in der PEG-Lösung, b: Protoplastenfusion zwischen ungehemmten <i>Calibrachoa</i> - und <i>Petunia</i> Mesophyllprotoplasten und c: Protoplastenfusion zwischen mit R6G behandelten <i>Petunia</i> - (Pt09) und mit JAA behandelten <i>Calibrachoa</i> - Mesophyllprotoplasten (Ca03).	103
Abb. 4.12: Ermittlung der Heterofusionsraten für verschiedene Fusionskombinationen.	107
Abb. 4.13: a: Protoplastenfusion zwischen <i>Calibrachoa</i> -Mesophyllprotoplast (Ca02) und <i>Petunia</i> -Petalenprotoplast (P04); b: nach dem Verschmelzen der Zellen Pt06 und Ca07); c: als Mikrokallus (Pt06 und Ca07); d: auf Cell-Finder-Objektträgern herangewachsene Kallusse (Pt06 und Ca07).	110
Abb. 4.14: Vergleich verschiedener Fusionsmethoden und PEG-Lösungen im Hinblick auf die erzielten Heterofusionsraten. (Variantenbeschreibung siehe Tab. 4.1).	111
Abb. 4.15: Durchflusscytometrische Untersuchung der regenerierten Sprosse aus der Fusion zwischen dem <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca07 und dem <i>Petunia</i> -Genotypen Pt09.	113

Abb. 4.16: Abweichung der Regenerate aus Protoplastenfusion vom Ausgangsphänotyp Pt09	114
Abb. 4.17: Abweichung der Regenerate aus Protoplastenfusion vom Ausgangsphänotyp Pt09	114
Abb. 4.18: Untersuchung der aus Protoplastenfusionsexperiment C1 (Ca12+P04) entstandenen Kallusse mittels RAPD-Analyse (a. Primer A04, b. Primer A12).....	117
Abb. 4.19: Untersuchung der aus Protoplastenfusionsexperiment C1 (Ca12+P04) entstandenen Kallusse mittels RAPD-Analyse (Primer A09).....	118
Abb. 4.20: Auftrennung der mit Primer A09 erhaltenen Amplifikationsprodukte. Von links nach rechts: <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca10, Fusionskallusse 22F-1F, <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07 und Größenstandard λ Pst.....	118
Abb. 4.21: Auftrennung der mit Primer A09 erhaltenen Amplifikationsprodukte. Von links nach rechts: <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca10, Fusionskallusse 6i-2i und <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07 (Größenstandard λ Pst).....	119
Abb. 4.22: Auftrennung der mit Primer A09 erhaltenen Amplifikationsprodukte. Von links nach rechts: <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca10, Fusionskallusse 5h-14h und <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07 (Größenstandard λ Pst).....	119
Abb. 4.23: Auftrennung der mit Primer A15 erhaltenen Amplifikationsprodukte. Von links nach rechts: <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07, Fusionskallusse 4j-3a und <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca10.....	121
Abb. 4.24: Auftrennung der mit Primer A15 erhaltenen Amplifikationsprodukte. Von links nach rechts: <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07, Fusionskallusse und <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca10.....	121
Abb. 4.25: Auftrennung der mit Primer A15 und A09 erhaltene Amplifikationsprodukte (Fusionsexperiment C4, s. Tab. 4.18). Bild links: von links nach rechts: <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07, Fusionsspross h1 und <i>Calibrachoa</i> -Genotyp Ca10. Bild rechts: von links nach rechts: <i>Calibrachoa</i> - Genotyp Ca10, Fusionsspross 3a und <i>Petunia</i> -Genotyp Pt07.....	122
Abb. 4.26: AFLP-Muster von Kallussen aus Protoplastenfusion und ihrer Eltern für die Fusionskombinationen: a: Ca10 + Pt07 (Primerkombination HindIII + AAT / MseI + ACG, Fusionsexperiment C3 und C2, s. Tab. 418) sowie b: Ca12 + P04 (Primerkombination HindIII + AAC / MseI + ACT, Fusionsexperiment C1, s. Tab. 4.18). Hybriden durch Pfeile gekennzeichnet.....	123

Abb. 4.27: AFLP-Muster von Kallussen aus Protoplastenfusion und ihrer Eltern für die Fusionskombinationen: a: Pt06 + Ca07 (Primerkombination HindIII + AAC / MseI + ACT, Fusionsexperiment C6 und C7, s. Tab. 4.18) sowie b: Pt01 + Ca10 (Primerkombination HindIII + AAT / MseI + ACG, Fusionsexperiment C5, s. 4.18). Hybriden durch Pfeile gekennzeichnet..... 124

1. Allgemeine Einleitung

Die *Solanaceae* sind eine der weltweit größten und wichtigsten Pflanzenfamilien. Der Ursprung der meisten Arten ist dabei in Südamerika zu finden (HUNZIKER 1979). Nach HUNZIKER (1979) wurden innerhalb der Familie der *Solanaceae* die Subfamilien, *Solanoideae* und *Cestroideae* unterschieden. Diese beinhalteten sieben bzw. fünf Tribus. Phylogenetische Studien basierend auf cpDNA-Analyse haben das Verständnis der Beziehungen zwischen den Subfamilien jedoch stark verändert (OLMSTEAD UND PALMER 1992). OLMSTEAD UND PALMER (1992) untersuchten die familiären Beziehungen der Subfamilien innerhalb der *Solanaceae*. Dies hatte eine Aufspaltung der Subfamilie *Cestroideae* in fünf neue Subfamilien (*Cestroideae*, *Petunioideae*, *Schizanthoideae*, *Nicotianoideae* und *Schwenckioideae*) zur Folge. Die Subfamilie *Petunioideae* beinhaltet *Petunia*, *Calibrachoa* und alle weiteren *Nicotianeae* Genera (*sensu* Hunziker 1979) ausgenommen *Nicotiana L.*

Die Vertreter der Gattungen *Petunia* und *Calibrachoa* sind hauptsächlich in Südamerika beheimatet. Die Geschichte der Gartenpetunie (*Petunia hybrida* Vilm.) hat ihren Anfang zu Beginn des 19ten Jahrhunderts. Es ist bis heute nicht ganz klar, welche Arten an der Entstehung von *Petunia hybrida* beteiligt waren. WATANABE ET AL. (1996) gehen davon aus, dass die heutigen *Petunia hybrida* auf eine Kreuzung zwischen *Petunia axillaris* (LAM.) BRITTON, STERNS ET POGGENB. und *Petunia integrifolia* (HOOK) SCHINZ UND THELL zurückgehen. Aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu den Petunien wurden die heute der Gattung *Calibrachoa* zugeordneten Arten in der Vergangenheit immer wieder zur Gattung *Petunia* gezählt. TSUKAMOTO ET AL. (2002) schrieben zum Beispiel, dass die Gattung *Petunia*, welche die Arten *Petunia parviflora* und *Petunia nyctaginiflora* (= *Petunia axillaris* (LAM.) BRITTON, STERNS UND POGGENB.) beinhaltete, 1803 von JUSSIEU erstmalig etabliert wurde. Weiter schrieben sie, dass die Gattung *Calibrachoa* bereits 1825 von LA LLAVE UND LEXERCA als *Calibrachoa prucumbens* eingeführt wurde, FRIES (1911) befand diese Gruppe der *Calibrachoa* als identisch mit *Petunia parviflora* JUSS. und ordnete diese der von JUSSIEU (1803) definierten Gruppe der *Petunia parviflora* zu.

Erst WIJSMAN ET AL. (1983) trennten endgültig die Gattung *Petunia* von der Gattung der *Calibrachoa*. Sie untersuchten die Gruppe der *Petunia sensu* JUSSIEU und unterschieden dabei zwei Gruppen. Die *Calibrachoa* mit $2n = 2x = 18$ und *Petunia sensu* WIJSMAN mit $2n = 2x = 14$ Chromosomen. WIJSMAN (1990) führte den Begriff *Calibrachoa* wieder ein und ordnete diesem Genus 15 Arten mit $2n = 2x = 18$ Chromosomen aus der Gruppe *Petunia* zu, welche die gleichen morphologischen Merkmale wie die Art *Petunia parviflora* aufwiesen. STEHMAN

UND SEMIR (1997) fügten dieser Gruppe weitere neun Arten hinzu, so dass heute *Petunia*-Arten mit $2n = 2x = 14$ Chromosomen und *Calibrachoa*-Arten mit $2n = 2x = 18$ Chromosomen in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden.

Aber auch noch heute werden *Calibrachoa* immer wieder fälschlicherweise als Petunien bezeichnet, wie z. B. in der Jahresstatistik der NBV-UGA von 2000-2001 bzw. 2003-2004. Dort werden die unter dem Handelsnamen "Million Bells" vertriebenen *Calibrachoa* als *Petunia* "Million Bells" aufgeführt bzw. werden *Petunia* und *Calibrachoa* als *Petunia* zusammengefasst. Beide Kulturen sind von großer wirtschaftlicher Bedeutung und aus dem heutigen Beet- und Balkonpflanzensortiment nicht mehr wegzudenken. Dies wird deutlich, sieht man sich die nachfolgenden Abbildungen an. In den Jahren 2000 bis 2004 nahm die Anzahl der verkauften *Petunia* und *Calibrachoa* stetig zu, bzw. stagnierte wie im Fall der "Surfinia" (Abb. 1.1). Gleichzeitig sanken jedoch die erzielten Preise pro Topf (Abb. 1.2).

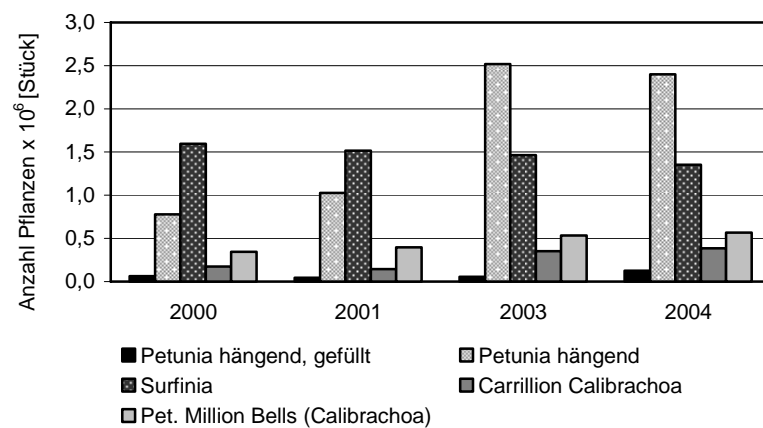


Abb. 1.1: Entwicklung der Verkaufszahlen für *Calibrachoa* und *Petunia* im Zeitraum von 2000-2004 (Daten aus den Geschäftsberichten der NBV-UGA).

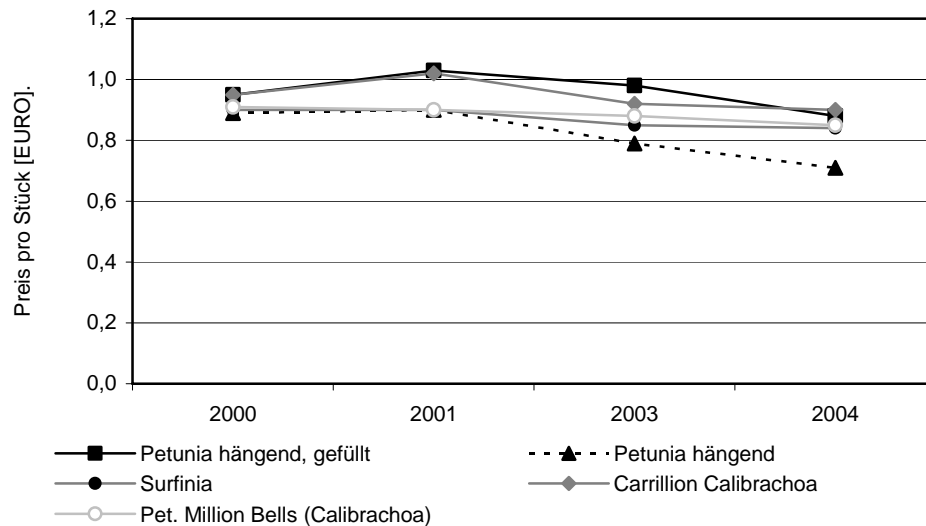


Abb. 1.2: Preisentwicklung je Topf für *Calibrachoa* und *Petunia* im Zeitraum von 2000-2004 (Daten aus den Geschäftsberichten der NBV-UGA).

Gerade die *Calibrachoa* erlebten seit der Markteinführung unter dem Handelsnamen "Million Bells", damals nur in den Farben blau und magenta erhältlich, einen starken Zuwachs. Heute ist das *Calibrachoa*-Sortiment mit seinen vielen verschiedenen Sorten sehr vielfältig in Bezug auf Blütenfarbe und Wuchsform und ebenso wie *Petunia* aus dem heutigen Beet- und Balkonsortiment nicht mehr wegzudenken.

Aufgrund der starken züchterischen Bearbeitung umfasst das heutige Petuniensortiment eine große Anzahl verschiedenster Genotypen, die sich z. T. im Wuchs, aber vor allem in Blütenform, -farbe und -muster unterscheiden. Allerdings ist das Ausgangsmaterial begrenzt und damit sind auch die Möglichkeiten für eine weitere züchterische Bearbeitung eingeschränkt. Aus züchterischer Sicht wäre es jedoch von Interesse, bestimmte züchterisch interessante Merkmale der Gattungen *Petunia* und *Calibrachoa* in einer Pflanze zu vereinen und dadurch im günstigsten Fall ein neues Produkt zu erhalten. Als wünschenswerte Eigenschaften wären z. B. die im Gegensatz zu den *Calibrachoa* hohe pH-Wert Toleranz der *Petunia* aber auch die Wetterbeständigkeit sowie das große Farbspektrum innerhalb der *Calibrachoa* zu nennen.

Aufgrund ihres ähnlichen Aussehens und mit dem Ziel den Genpool zu erweitern, wurden in den 90er Jahren Kreuzungen zwischen den Gattungen *Petunia* und *Calibrachoa* durchgeführt. Allerdings waren diese Kreuzungen trotz vielfältiger Versuche bisher erfolglos (WATANABE ET AL. 1996, 1997 und 2001), wohingegen Kreuzungen innerhalb der Gattung

Petunia sowie innerhalb der Gattung *Calibrachoa* in den meisten Fällen möglich waren (WATANABE ET AL. 1996, 1997).

Die somatische Hybridisierung, d.h. die Fusion von Protoplasten und damit die vollständige, bzw. teilweise Fusion (asymmetrische Fusion) von Genomen, bietet die Möglichkeit der Erweiterung des Genpools einer Art, wenn diese nicht mit Pflanzen anderer Arten oder aber sogar anderer Gattungen, welche die erwünschten Eigenschaften aufweisen, auf herkömmlichen Wege, (d.h. sexuell), auf Grund bestehender Inkompatibilitäten oder abnormaler Gametenbildung kreuzbar sind. Der Erfolg sexueller Kreuzungen wird durch das verwandtschaftliche Verhältnis der zu kreuzenden Arten und somit zumeist auf wenige Genotyp-Kombinationen innerhalb einer Art limitiert (GLEBA UND SYTNIK 1984). Durch die Verwendung von Protoplasten d. h. Zellen deren Mittellamellen sowie Zellwände mit Hilfe von Enzymen abgebaut wurden, sind somatische Hybridisierungen über die Artgrenzen, ja sogar zwischen Vertretern verschiedener Gattungen hinweg möglich. In der Literatur gibt es verschiedene Beispiele für eine erfolgreiche somatische Hybridisierung sowohl innerhalb einer Art bzw. Gattung als auch über die Art- bzw. Gattungsgrenzen hinweg. So wurde z. B. *Dendranthema x grandiflorum* erfolgreich mit *Artemisia sieversiana* J.F. EHRH. EX. WILLD. (FURUTA ET AL. 2004) fusioniert. Die meisten Hybriden, welche durch somatische Hybridisierung entstanden sind, gehen jedoch auf Hybridisierungen innerhalb der Selben Gattung, zwischen verschiedenen Arten zurück, wie z. B. bei Kartoffel (WAARA ET AL. 1991), Kohl (TERADA ET AL. 1987) oder Tomate (O'CONNELL UND HANSON 1987). Während die Fusion der Protoplasten von taxonomisch weit entfernten Arten bzw. zwischen Vertretern verschiedener Gattungen kein großes Problem darstellt, gestaltet sich die Regeneration der Hybriden häufig als schwierig bzw. sind diese häufig nicht stabil. Unter anderem kann es während der Regeneration zur spontanen Eliminierung von Chromosomen eines oder beider Eltern kommen (GLEBA ET AL. 1988). Teilweise wird auch ein abnormales Wachstum bzw. eine abnormale Entwicklung der Hybriden aus symmetrischen Fusionen auf Grund des hohen Anteils an Fremd DNA, welcher zu einer Unverträglichkeit zwischen den Genomen führen kann, beobachtet (LIU ET AL. 2005). Ein weiteres Problem stellt die häufig auftretende Infertilität der regenerierten Pflanzen dar (GOTTSCHALK 1994). Andererseits besteht jedoch die Möglichkeit durch somatische Hybridisierung die Fertilität in den Hybriden, welche aus sterilen Fusionseltern hervorgegangen waren, wiederherzustellen (KOBAYASHI ET AL. 1995), was besonders aus züchterischer Sicht, sollen die aus Protoplastenfusion gewonnenen Pflanzen als Ausgangsmaterial für eine weitere züchterische Bearbeitung eingesetzt werden, als positiv zu bewerten ist. Aus wissenschaftlicher Sicht ist es interessant, mögliche aus der

Fusion zwischen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Protoplasten hervorgegangene Hybriden morphologisch, cytologisch sowie molekulargenetisch zu charakterisieren. Die Regeneration von somatischen Hybriden als Produkt der Fusion zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* wurde bereits von POWER ET AL. (1980) und TAGUCHI ET AL. (1993) beschrieben. Allerdings wurden in beiden Fällen Albino-Mutanten, bzw. Genotypen, welche sich nicht über das Mikrokallusstadium hinaus entwickeln konnten, als Eltern verwendet. Für eine kommerzielle, züchterische Nutzung ist diese Methode weniger geeignet, da sie nur für diese speziellen Genotypen geeignet ist, und diese keine kommerzielle Bedeutung haben und der somit zur Verfügung stehende Genpool stark begrenzt ist. Mit der Entwicklung eines Genotypen unabhängigen Selektionssystems kann diese Einschränkung vermieden werden.

Unter züchterischen Gesichtspunkten betrachtet war das Ziel dieser Arbeit die Fusion von kommerziell bedeutenden *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen, um mit Hilfe dieser Technik neues züchterisch interessantes Pflanzenmaterial zu erstellen, welches als Ausgangsmaterial für die weitere züchterische Bearbeitung dienen sollte. Mit Hilfe dieses Materials sollte der besonders bei *Petunia*, durch die weit fortgeschrittene Züchtung eingeschränkte Genpool erweitert werden, um so neue Sorten mit neuen Eigenschaften, Farben etc. bis hin zu einer völlig neuen Pflanze zu erstellen. Vom wissenschaftlichen Standpunkt aus lag das Ziel zum einen in der Erstellung der Hybriden, was die Entwicklung eines Protokolls zur Protoplasten-isolation, -selektion und -fusion voraussetzte und zum anderen in dem Nachweis sowie der Charakterisierung der Hybriden mittels molekularer Marker, da hierüber keine Kenntnisse vorlagen. Dies ist besonders interessant, da sich bei der somatischen Hybridisierung im Gegensatz zur sexuellen Kreuzung eine Vielzahl an neuen Möglichkeiten ergibt, da hier ganze Protoplasten, die Plasma mit den dazugehörigen Organellen ebenso wie den Zellkern beinhalten, miteinander fusioniert werden. Eine Voraussetzung für die somatische Hybridisierung ist, dass sich Protoplasten aus beiden Partnern isolieren lassen. Deshalb wurde ein Protokoll für die Protoplastenisolation und -regeneration erarbeitet. Des Weiteren wurde ein Protokoll für die Fusion der Protoplasten erarbeitet. Um den Arbeitsaufwand möglichst gering zu halten, sollten die heterologen Fusionsprodukte mit Hilfe der Zellteilungshemmstoffe Rhodamine 6G und Jodacetamid selektiert werden. Die Analyse der aus den Fusionen gewonnenen Kallusse bzw. Sprosse sollte mittels molekulargenetischer Marker (RAPD- und AFLP-Marker) erfolgen. Die mittels Marker identifizierten Hybridsprosse sollten morphologisch und molekulargenetisch charakterisiert werden. Um das verwandtschaftliche Verhältnis zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* abschätzen zu können, sollte ein Phänogramm mittels RAPD-Primern erstellt werden.

2 Charakterisierung des Pflanzenmaterials

2.1 Einleitung

Bei dem zur Verfügung gestellten Pflanzenmaterial handelte es sich um eine Vielzahl verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen, die zunächst durchflusscytometrisch charakterisiert werden sollten, um genauere Aussagen zum Ploidiegrad des vorliegenden Pflanzenmaterials, sowie zur Möglichkeit, potentielle Fusionshybriden mittels Durchflusscytometrie zu identifizieren, treffen zu können.

Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis über die Chromosomenanzahl / Ploidie von einem der zu untersuchenden Genotypen, um einen Standard definieren zu können. Die Durchflusscytometrie beruht auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung. Die freigesetzten Zellkerne werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff, in der vorliegenden Arbeit mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), welcher in die AT-reichen Regionen der DNA interkaliert (DOLEZEL UND BARTOS 2005), angefärbt und nacheinander an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Eine Messsonde detektiert die emittierte Strahlung der einzelnen Kerne, welche mit der im Zellkern enthaltenen DNA-Menge korreliert. Eine spezielle Software ermittelt den Mittelwert sowie den Variationskoeffizienten (cv-Wert) und stellt die Daten in Form eines Histogramms dar. Je kleiner der cv-Wert, desto genauer ist die Messung. Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Durchflusscytometrie sind die Zellzyklusanalyse, mit der die verschiedenen Zellzyklusphasen, wie z. B. die G₀/G₁, die Synthesephase und die G₂/M Phase erfasst werden können (CONIA ET AL. 1987) sowie das „Cell sorting“, bei dem bestimmte mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Zellen aus einer Vielzahl an Zellen selektiert werden können. Dieses Verfahren wurde zum Beispiel angewendet, um die heterologen Fusionsprodukte nach der Fusion von den übrigen Protoplasten zu trennen, was WAARA ET AL. (1998) erfolgreich am Beispiel von fusionierten Kartoffelprotoplasten zeigten. Allerdings sind die Geräte für die Durchführung derartiger Analysen sehr teuer und wie in unserem Fall nur bedingt verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurden die Analysen an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung im Institut für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg durchgeführt.

Neben den durchflusscytometrischen Analysen, erfolgte die molekulargenetische Untersuchung des Pflanzenmaterials mittels RAPD-Analyse. Durch die Einführung der PCR-Technik wurde die Möglichkeit für neue Methoden zum Nachweis von DNA-Polymorphismen ohne Kenntnis der Nukleotidsequenz der zu untersuchenden DNA

geschaffen. Eine dieser Methoden ist die RAPD-Analyse. Die Eignung von Oligonukleotidprimern zum Nachweis von DNA-Polymorphismen welche als genetische Marker genutzt werden können, wurde von WILLIAMS ET AL. (1990) untersucht und beschrieben. Die Primer amplifizieren genomische DNA-Segmente, welche in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Polymorphismen werden durch Unterschiede in den Bandenmustern zwischen verschiedenen Individuen sichtbar. Voraussetzung ist jedoch, dass genügend genetische Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Individuen vorliegen. Die Vorteile der RAPD-Marker liegen vor allem in ihrer einfachen Handhabung. Ein weiterer Vorteil der RAPD-PCR besteht in der geringen Einsatzmenge an DNA. Diese variiert zwischen den einzelnen Protokollen zum Teil beträchtlich.

So geben DE FILIPPIS ET AL. (1996) eine Einsatzmenge von 10 ng DNA an während die eingesetzte DNA-Menge bei WILLIAMS ET AL. (1990) 25 ng DNA und HANSEN ET AL. (1998) 50 ng DNA je Ansatz beträgt. Als Nachteil wird dagegen häufig die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse angeführt, da bereits geringste Abweichungen der Amplifikationsbedingungen sowohl zwischen zwei Experimenten als auch zwischen zwei verschiedenen Laboren zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. (SKROCH UND NIENHUIS 1995 und JONES ET AL. 1997).

Ziel der Untersuchung war es, geeignete RAPD-Marker zu identifizieren, um potentielle Hybriden selektieren zu können. Neben weiteren molekulargenetischen Methoden wie der AFLP-Analyse (VOS ET AL. 1995 und KATO ET AL. 2004), der Isoenzymanalyse oder Southern-Blots wird die RAPD-Analyse auf Grund ihrer einfachen Handhabung immer häufiger zum Nachweis von Hybriden eingesetzt.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Pflanzenmaterial und Kultur

Bei dem von der Firma Klemm & Sohn (Stuttgart) zur Verfügung gestellten Pflanzenmaterial handelte es sich um In-vitro-Sprosse verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen (Tab. 2.1 und 2.2). Unter den *Calibrachoa*-Genotypen befanden sich mehrere Wildarten, während es sich bei den *Petunia*-Genotypen ausschließlich um Kultursorten handelte. Dem

Pflanzenmaterial wurde eine Bezeichnung bestehend aus dem Anfangsbuchstaben (Pt bzw. Ca,) der jeweiligen Art und einer Nummer für die jeweiligen Genotypen zugeordnet (Ausnahmen, Genotyp R31 = *Calibracha*-Genotyp Nr. 31 und P04 = *Petunia* siehe Tab. 2.1 und 2.2). Um ein möglichst großes Spektrum an Genotypen zu untersuchen, wurden auch einige der bereits im Labor vorhandenen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen, welche ebenfalls von der Firma Klemm & Sohn (Stuttgart) zur Verfügung gestellt worden waren, in die durchfluscytometrischen Untersuchungen miteinbezogen. Für die weiteren Untersuchungen in Kapitel drei und vier waren diese, ebenso wie die Genotypen Pt10 und Pt18 jedoch nicht weiter von Bedeutung. Diese Genotypen wurden lediglich durch eine Nummer gekennzeichnet (z. B. 1, 2 usw.). Eine Liste dieser Genotypen befindet sich im Anhang (Tab. A1) Die Sprosse wurden in Gläsern auf MS-Medium (MURASHIGE UND SKOOG 1962) welches 0,1 mg/ml 2iP enthielt (Rezept siehe Anhang Tab. A.4), bei 24 °C und einer Beleuchtungsintensität von 31,5 bis 47,7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ im Kulturraum kultiviert. Die tägliche Belichtungsdauer betrug 16 Stunden.

Tab. 2.1: Liste der untersuchten *Petunia*-Genotypen

Genotyp	Art	Blütenfarbe	Bemerkungen
Pt01	<i>Petunia hybrida</i>	weiß	flach, hängend
Pt02	<i>Petunia hybrida</i>	weiß, gelb geadert, gefüllt	aufrecht
Pt03	<i>Petunia hybrida</i>	rosa, gefüllt	aufrecht
Pt04	<i>Petunia hybrida</i>	rot, gelbe Mitte	aufrecht
Pt05	<i>Petunia hybrida</i>	hellblau	aufrecht-hängend
Pt06	<i>Petunia hybrida</i>	dunkelblau	kompakt, gute Verzweigung
Pt07	<i>Petunia hybrida</i>	blau, gefüllt	aufrecht
Pt08	<i>Petunia hybrida</i>	gelb	kompakt, schlechte Verzweigung
Pt09	<i>Petunia hybrida</i>	lila, gefüllt	aufrecht-hängend
P04	<i>Petunia hybrida</i>	magenta	hängend

Tab. 2.2: Liste der untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen

Genotyp	Art	Blütenfarbe	Bemerkungen
Ca01	<i>Calibrachoa</i>	hellrosa	flach, kleines Laub, schlechte Verzweigung
Ca02	<i>Calibrachoa</i> , unbekannte Herkunft, mit Wildtypcharakter	creme	flach, gute Verzweigung, kleines Laub
Ca03	<i>Calibrachoa</i> , unbekannte Herkunft, mit Wildtypcharakter	flieder	flach, gute Verzweigung, kleines Laub, Blüte öffnet nicht bei Schwachlicht
Ca04	<i>Calibrachoa parviflora</i>	flieder	flach, sehr gute Verzweigung, kleine Blüten, öffnet nicht bei Schwachlicht
Ca05	<i>Calibrachoa parviflora</i>	flieder	flach, sehr gute Verzweigung, kleine Blüten, evtl. tetraploid
Ca06	<i>Calibrachoa parviflora</i>	weiß	flach, sehr gute Verzweigung, sehr kleine Blüten, öffnet nicht bei Schwachlicht
Ca07	<i>Calibrachoa</i>	orange-rot	aufrecht, wild
Ca08	<i>Calibrachoa</i>	orange	flach-aufrecht, gute Verzweigung
Ca09	<i>Calibrachoa</i>	weiß	flach, gute Verzweigung
Ca10	<i>Calibrachoa</i>	blau	flach
Ca11	<i>Calibrachoa</i>	hellblau	flach-aufrecht
Ca12	<i>Calibrachoa</i>	lemon-gelb	flach, gute Verzweigung
R31	<i>Calibrachoa</i>	hellblau	flach, gute Verzweigung

2.2.2 Cytogenetische Untersuchung des Pflanzenmaterials mittels Durchflusscytometrie

Um genauere Aussagen zum Ploidiegrad des vorliegenden Pflanzenmaterials sowie zur Möglichkeit, Fusionshybriden mittels Durchflusscytometrie zu identifizieren, machen zu können, wurden die *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen durchflusscytometrisch untersucht.

Aufbereitung des Probenmaterials

Für die Freisetzung der Zellkerne wurden ca. 0,5 cm² junges Blattmaterial unter Zugabe von 0,4 ml Kernextraktionspuffer (CyStain[®] UV Precise P der Firma Partec) mit einer Rasierklinge zerhackt. Die entstandene Suspension wurde mit 1,6 ml DAPI-Lösung (CyStain[®] UV Precise P der Firma Partec) versetzt, mit einer Einmalpipette aufgenommen und durch einen Filter (CellTrics[®], Maschenweite 30µm, Firma Partec), filtriert. Das Filtrat wurde in 3,5 ml Probenröhrchen (Sarstedt) aufgefangen und diese nach einer Wartezeit von ca. 5 min. zur Messung in das Durchflusscytometer (PAS III, Partec, Münster) eingesetzt und der DNA-Gehalt der in der Lösung freigesetzten Kerne bestimmt. Die Daten wurden mit der vorhandenen Partec Software verarbeitet und in Form eines Histogramms dargestellt.

In die Untersuchung wurden 16 *Petunia*- und 15 *Calibrachoa*-Genotypen einbezogen. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 4,5 Partikel/Sekunde, der Gain-Wert (510) war bei allen Messungen identisch. Die in den Ergebnissen dargestellten Werte gehen auf jeweils eine Messung, bei der mindestens 2500 Partikel erfasst wurden, zurück. Neben den Messungen an *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen wurde außerdem der DNA-Gehalt von *Lycopersicon esculentum* (Tomate) untersucht und als Standard mit *Petunia* (Genotyp Pt02) und *Calibrachoa* (Genotyp Ca10) verglichen.

2.2.3 Molekulargenetische Untersuchung des Pflanzenmaterials

Um mögliche Hybriden später schnell und einfach mittels Markern identifizieren zu können, wurden verschiedene Oligonukleotid-Primer (Tab. 2.3) mittels PCR (polymerase chain reaction) hinsichtlich ihrer Eignung zur Unterscheidung der Genotypen sowohl innerhalb der Genera als auch zwischen den *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen in Bezug auf die amplifizierten Bandenmuster sowie deren Reproduzierbarkeit untersucht.

Tab. 2.3: Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen
(Kit A der Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

Primer Bezeichnung	Primersequenz von 5`nach 3`	Primer Bezeichnung	Primersequenz von 5`nach 3`
A01	CAG GCC CTT C	A11	CAA TCGCCG T
A02	TGC CGA GCT G	A12	TCG GCG ATA G
A03	AGT CAG CCA C	A13	CAG CAC CCA C
A04	AAT CGG GCT G	A14	TCT GTG CTG G
A05	AGG GGT CTT G	A15	TTC CGA ACC C
A06	GGT CCC TGA C	A16	AGC CAG CGA A
A07	GAA ACG GGT G	A17	GAC CGC TTG T
A08	GTG ACG TAG G	A18	AGG TGA CCG T
A09	GGG TAA CGC C	A19	CAA ACG TCG G
A10	GTG ATC GCA G	A20	GTT GCG ATC C

2.2.3.1 Isolierung von Gesamt- DNA

Das Pflanzenmaterial (Blätter von In-vitro-Material bzw. Gewächshauspflanzen) wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und ca. 100-120 mg des Pulvers in 1,5 ml Eppendorfgefäße eingewogen. Die Gesamt-DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Mini Plant Kits von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert und die DNA in 200 µl Eluierungspuffer (AE-Puffer des Isolations-Kits) aufgenommen.

2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Für die Herstellung der Gele wurden 1,5 g Agarose (SEakem-Agarose, Biozym) in 150 ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach kurzem Abkühlen 4 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) hinzupipettiert. Die noch flüssige Agarose wurde unter dem Abzug in einen Gelträger gegossen und die Probentaschenkämme eingesetzt.

Die Konzentrationsbestimmung sowie die Auftrennung der DNA-Proben erfolgten mittels horizontaler Gelelektrophorese in 1x TAE-Puffer (siehe Tabelle 2.4).

Tab. 2.4: Zusammensetzung 50 x TAE-Puffer

Substanz	Menge
Tris Base	242 g (2 mM)
EDTA	100 ml 0,5 M
Konz. Essigsäure	57,1 ml
auffüllen mit H ₂ O dest. auf 1 Liter, pH-Wert 8.0	

(Für 1 x TAE werden 20 ml 50 x TAE mit 980 ml H₂O dest. gemischt)

2.2.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte visuell durch den Vergleich zu Standards bekannter Größe. 1 µl der zu messenden DNA Probe wurde zusammen mit 1µl Ladepuffer und 8 µl H₂O bidest. gemischt und auf ein Agarose-Gel (1,0 %) aufgetragen. Um die Konzentration abschätzen zu können, wurden zusammen mit der DNA-Probe verschiedene Konzentrationen von DNA des Bakteriophagen λ (Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 Volt (Power Pac 300, Bio-Rad).

Tab. 2.5: Zusammensetzung Gel-Ladepuffer (orange)

Substanz	Menge
Glycerin	6 ml
A. bidest	13,95 ml
Orange G	0,05 g

2.2.3.4 RAPD-PCR

Die RAPD-PCR wurde nach einer modifizierten Methode von WILLIAMS ET AL. (1990) durchgeführt. Als Primer dienten Decamer-Primer (Primer Kit A, Carl Roth, Karlsruhe). Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Die 20 Primer wurden hinsichtlich ihrer Eignung, stabile Banden zu produzieren, untersucht. Der Reaktionsansatz für die PCR hatte ein Volumen von 25 µl und setzte sich wie folgt zusammen (Tab. 2.6):

Tab. 2.6: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes

DNA	20 ng
dNTPs (2 mM)	1 μ l
10 x Williams-Puffer (Zusammensetzung Tab. 2.9)	2,5 μ l
Taq-Polymerase (Axon-Labortechnik)	0,5 U
Primer (s. Tab. 2.3, 5 pMol/ μ l)	2 μ l
A. bidest	Auffüllen bis auf 25 μ l

Die Amplifikation der DNA erfolgte im Thermocycler (T3, Biometra) unter folgenden Bedingungen:

Tab. 2.7: RAPD-PCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min.]	Zyklen
Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	92	1	} 40
Annealing	35	1	
Elongation	72	2	
Elongation	72	10	1

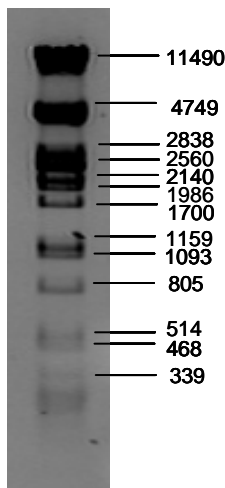
Nach der Amplifikation wurden dem Reaktionsansatz 3 μ l Ladebuffer (Tab. 2.5) zugegeben und mit diesem gemischt. 23 μ l dieses Gemisches wurden auf ein 1,0 %iges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte horizontal bei 100 Volt. Als Größenstandard für die Größenermittlung der amplifizierten Banden wurden 3 μ l λ Pst-Marker (Zusammensetzung siehe Tab. 2.9, Abb. 2.1) aufgetragen .

Tab. 2.8: Zusammensetzung des 10 x Williams-Puffers (WILLIAMS ET AL. 1990)

Substanz	Konzentration
Tris pH 8,3	100 mM
KCl	500 mM
MgCl ₂	20 mM
Gelatine	0,01 %

Tab. 2.9: Zusammensetzung des λ Pst-Markers

Substanz	Menge
A. bidest	75 μ l
λ DNA (0,3 μ g/ μ l, Fermentas)	187 μ l
PstI (10 U/ μ l, Fermentas)	8 μ l
Puffer 0 (Fermentas)	30 μ l

Abb. 2.1: λ Pst-Größenstandard (Angaben in bp)

Herstellung des λ Pst-Markers

Die λ DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 300 μ l mit 80 Einheiten PstI unter Zusatz des entsprechenden Restriktionspuffers für 3 Stunden bei 37 °C verdaut. Im Anschluss erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 70 °C.

2.2.3.5 Identifizierung geeigneter Primer zur Differenzierung von *Petunia* und *Calibrachoa* sowie potentieller Hybriden.

In einem Vorversuch wurden 20 RAPD-Primer (siehe Tab.2.3) hinsichtlich ihrer Eignung stabile Bandenmuster zu amplifizieren am Beispiel von fünf *Petunia*- und vier *Calibrachoa*-Genotypen untersucht. Fünf der untersuchten Primer amplifizierten keine Banden, zwei amplifizierten nur schwache Banden, die nicht reproduzierbar waren. 13 der 20 Primer zeigten reproduzierbare Bandenmuster. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden 12 dieser Primer

hinsichtlich ihrer Eignung zur Differenzierung zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* sowie innerhalb der Genera untersucht.

Untersuchte Genotypen:

Calibrachoa: Ca02, Ca03, Ca05, Ca06, Ca07, Ca11, Ca12, R31

Petunia: Pt02, Pt03, Pt05, Pt06, Pt09

Im Hinblick auf eine mögliche Nutzung der Daten zur Erstellung einer Distanzmatrix sowie eines Phänogramms wurden ebenfalls zwei *Fabiana*-Genotypen, *Nicotiana tabacum* cv. `Samsun` sowie *Salpiglossis sinuata* in die Untersuchung miteinbezogen.

Nach der Amplifikation (PCR-Bedingungen Tab. 2.7) wurden die Proben im Agarose-Gel aufgetrennt. Jede PCR-Reaktion wurde je Genotyp und Primer in zwei bis drei Wiederholungen durchgeführt. Anschließend wurden die amplifizierten Bandenmuster miteinander verglichen.

2.2.3.6 Untersuchung der verwandtschaftlichen Beziehung zwischen *Petunia* und *Calibrachoa*, Erstellung eines Phänogramms mittels RAPD-Marker

Aufgrund ihrer guten Reproduzierbarkeit wurden die Daten aus der unter 2.2.3.4 beschriebenen RAPD-Untersuchung für die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums sowie einer Distanzmatrix genutzt, um weitere Aussagen über den Verwandtschaftsgrad zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* treffen zu können, auch in Bezug auf weitere Genera aus der Familie der *Solanaceae*.

Die reproduzierbaren Banden wurden erfasst, ausgewertet und eine 0/1-Matrix erstellt. Hierbei stand Null für die Abwesenheit der Bande, 1 für ihre Anwesenheit. In Abbildung 2.2 ist ein Beispiel für die Auswertung der Banden dargestellt. Dort ist zu sehen, dass Bande Nr. 1 zum Beispiel bei den Genotypen Ca03, Ca05 und Ca06 stabil auftrat. In der 0/1 Matrix wäre diesen Genotypen die Ziffer 1, den übrigen die Ziffer 0 zugeordnet worden.

Die fertige 0/1-Matrix wurde in das Computerprogramm RAPD-distance (www.rsbs.anu.edu.au/Products&services/) eingegeben, welches anhand dieser Daten eine Distanzmatrix (welche paarweise die Dice-Koeffizienten angibt, aus denen sich der Verwandtschaftsgrad ableiten lässt, Tab. 2.12), sowie basierend auf dieser ein Phänogramm

(Abb. 2.7, verwendeter Distanzkoeffizient: Dice, Phänogramm mit UPGMA Prozedur erstellt) erstellt hat.

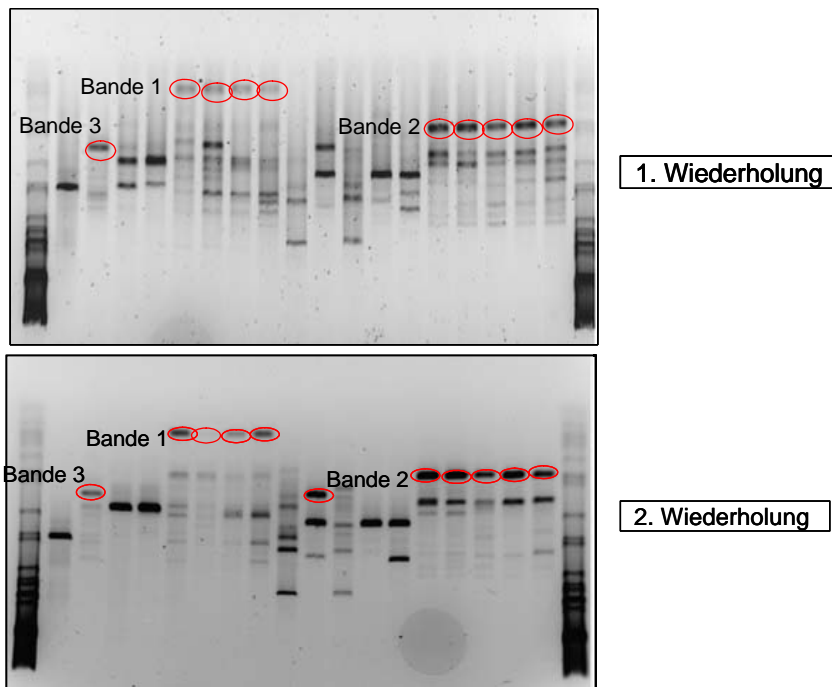


Abb. 2.2: Beispiel für die Auswertung der Bandenmuster des Primers A09.

Von links nach rechts:

Untersuchte Genotypen: *Salpiglossis sinuata*, *Nicotiana tabacum*, *Fabiana* Genotyp 1000, *Fabiana* Genotyp 2000, Ca02, Ca03, Ca05, Ca06, Ca11, Ca12, R31, Ca09, Ca07 (*Calibrachoa*), Pt02, Pt03, Pt05, Pt06, Pt09 (*Petunia*).

2.2.3.7 Bestimmung der Nachweisgrenze von geringen DNA-Mengen in DNA-Mischproben

Da die DNA-Extraktion aus einer großen Pflanzenanzahl sehr aufwändig ist, wäre es von Vorteil ein Screening der Sprosse aus den Fusionsexperimenten anhand von Mischproben durchführen zu können. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es möglich ist, aus einer DNA-Mischprobe, bestehend aus den Blättern beider Fusionspartner, in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen ein zusammengesetztes Bandenmuster, bestehend aus den Bandenmustern beider Eltern bzw. einzelne Banden beider Eltern, mittels RAPD-Analyse zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden Proben, welche aus etwa gleich großen Blattstücken

bestanden, mit einem Korkbohrer (0,8 cm Durchmesser) in den unten aufgeführten Mischungsverhältnissen gemischt, in flüssigem Stickstoff gemörsert und die DNA aus diesen Proben isoliert (DNeasy Mini Plant Kits von Qiagen s. 2.2.3.1). Ein Vorversuch ergab, dass ein Mischungsverhältnis von 1:20 und 1:50 zu groß war. Daraufhin wurde das Mischungsverhältnis in einem zweiten Versuch deutlich niedriger gewählt. Geprüft wurden Mischungsverhältnisse von 1:1, 1:5, 1:10 und 1:20 *Calibrachoa/Petunia*. Für diesen Versuch wurde anstelle der Anzahl der Blattscheiben das Gewicht der einzelnen Blattscheiben berücksichtigt, so dass die eingewogenen Mengen in Gramm den oben angegebenen Mischungsverhältnissen entsprachen.

Tab. 2.10: Mischungsverhältnis *Petunia/Calibrachoa* für die Bulk-Analyse

Verhältnis	Mischungsverhältnis <i>Petunia / Calibrachoa</i> (Blattscheiben)	
1:1	0,062 g (9 Blattscheiben Pt09)	0,059 g (21 Blattscheiben Ca07)
5:1	0,095 g (12 Blattscheiben Pt09)	0,026 g (8 Blattscheiben Ca07)
10:1	0,106 g (12 Blattscheiben Pt09)	0,012 g (Blattscheiben Ca07)
20:1	0,111 g (13 Blattscheiben Pt09)	0,006 g (1 Blattscheiben Ca07)

Neben den oben aufgeführten Mischproben wurden ebenfalls PCR-Ansätze der Genotypen Ca07 und Pt09 als Kontrollen bzw. zum Vergleich der Bandenmuster in die Untersuchung miteinbezogen. Des Weiteren wurde bereits isolierte DNA beider Eltern in den oben genannten Verhältnissen gemischt und ebenfalls amplifiziert (Primer A15). Dieser Versuch wurde zweimal wiederholt.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Cytogenetische Untersuchung des Pflanzenmaterials mittels Durchflusscytometrie

Die durchflusscytometrischen Untersuchungen lieferten durchweg Histogramme mit Peaks hoher Qualität, was an den cv-Werten erkennbar ist (Tab. A2 im Anhang).

In Abbildung 2.3 sind die relativen DNA-Gehalte für die untersuchten *Calibrachoa*- und *Petunia*-Genotypen dargestellt. Auf der Ordinate findet sich die Fluoreszenzintensität des Hauptpeaks, die im Durchflusscytometer ermittelt wurde, und die mit dem DNA-Gehalt der Pflanzen korreliert. Die DNA-Gehalte der einzelnen Genotypen unterschieden sich teilweise deutlich voneinander. So wiesen z.B. die Genotypen Ca02, Ca03, Ca04 DNA-Gehalte entsprechend einer Fluoreszenzintensität von ca. 70 auf. Die DNA-Gehalte der übrigen untersuchten Genotypen lagen mit Werten zwischen 85 und 130 dagegen teilweise deutlich höher (Abb. 2.3). Bei 13 der 15 untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen handelte es sich vermutlich um diploide Pflanzen ($2x = 18$). Bei den Genotypen Ca05 und Ca06 (Abb. 2.3) scheint es sich dagegen um tetraploide Pflanzen ($4x = 36$) zu handeln.

Im Vergleich zu den *Calibrachoa*-Genotypen wiesen die DNA-Gehalte der untersuchten *Petunia*-Genotypen eine wesentlich geringere Variation auf. Die Fluoreszenzintensität der DNA lag bei der Mehrheit der Genotypen bei einem Wert um 100. Eine Ausnahme bildeten die beiden Genotypen Pt07 und 2. Hier handelte es sich vermutlich um tetraploide Pflanzen (Abb. 2.3). Insgesamt lässt sich festhalten, dass das untersuchte *Petunia*-Material bezogen auf die DNA-Gehalte weniger heterogen war als das untersuchte *Calibrachoa*-Material.

Es wird davon ausgegangen, dass der Unterschied zwischen den Partnern mindestens 20 % der Fluoreszenzintensität betragen sollte, um eine sichere Unterscheidung zu gewährleisten. Eine solche Differenz wurde nur für Kombinationen von diploiden *Petunia*- mit den *Calibrachoa*-Genotypen Ca02, Ca03, Ca04, Ca05, Ca06 und Ca10 erreicht.

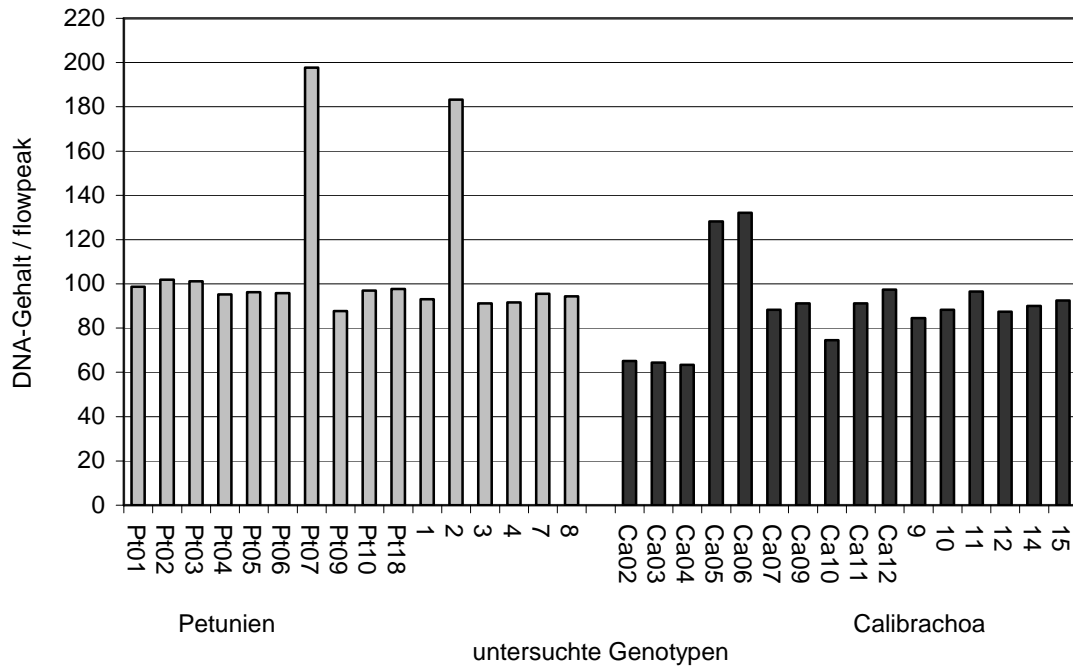


Abb. 2.3: Vergleich der relativen DNA-Gehalte verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen (ermittelt in durchfluscytometrischen Analysen)

Tomate (*Lycopersicon esculentum*), welche zu den molekulargenetisch besonders intensiv untersuchten Pflanzen (mit bekanntem DNA-Gehalt) zählt und ebenfalls wie *Petunia* und *Calibrachoa* zur Familie der *Solanaceae* gehört, wurde als Standard eingesetzt, um den DNA-Gehalt von ausgewählten *Calibrachoa*- (*Ca10*) und *Petunia*-Genotypen (Pt02) abzuschätzen. Aus der Datenbank des Botanischen Gartens in Kew, UK (<http://www.kew.org/cvalues>) ließ sich der DNA-Gehalt von *Lycopersicon esculentum* (1C = 1,03 pg) entnehmen. Durch den direkten Vergleich der ermittelten Fluoreszenzintensitäten dieses Standards mit den zu untersuchenden *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen (Tab. 2.11), die teilweise in Mischproben, d. h. in einer Messung kombiniert wurden (Abb. 2.4c), ließen sich folgende DNA-Gehalte abschätzen:

Pt 02: 1C = 1,48 pg (verglichen mit *Lycopersicon esculentum*)

Ca10: 1C = 1,06 pg (verglichen mit *Lycopersicon esculentum*)

Tab. 2.11: Vergleich der DNA-Gehalte verschiedener Arten in durchflusscytometrischen Analysen.

	Peak 1			Peak 2		
	Mean	cv	area	Mean	cv	area
<i>Lycopersicon esculentum</i>	110,9	5,1	46,6	209,5	4,2	30,3
Pt 02 Gewächshaus	156,3	3,7	77,2	290,5	2,6	2,2
Ca 10 Gewächshaus	113,6	5,7	68,1			

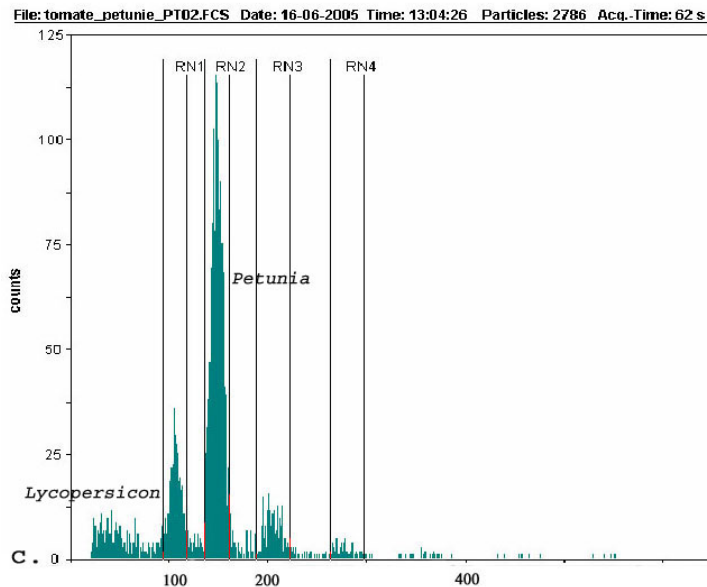
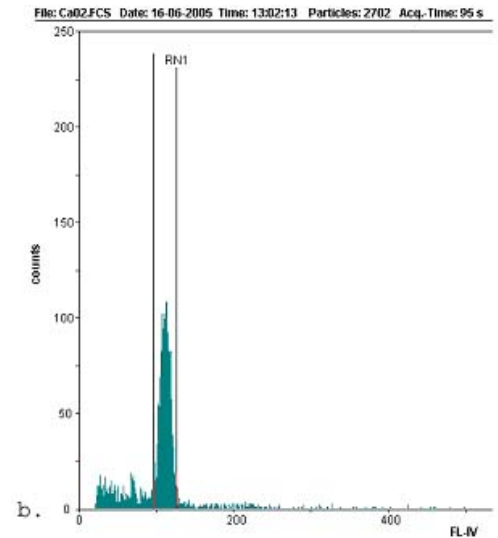
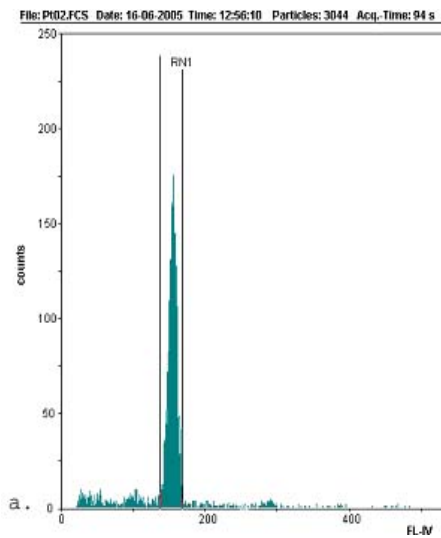


Abb. 2.4: Durchflusscytometrisch erstellte Histogramme
 a: *Petunia* Pt02 b: *Calibrachoa* Ca02
 c: Mischprobe Pt02 und *Lycopersicon esculentum* (Tomate)

2.3.2 Molekulargenetische Untersuchung des Pflanzenmaterials

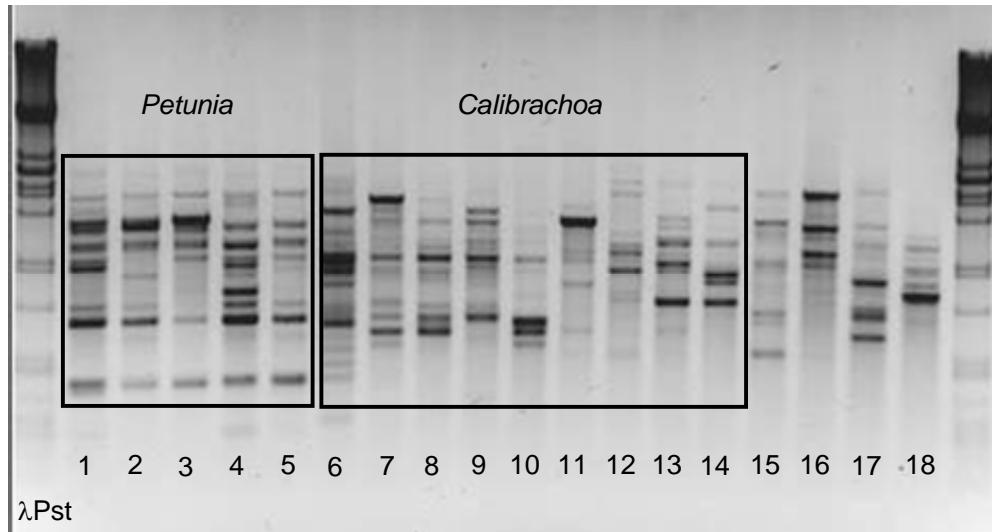
Isolierung von DNA aus Blattmaterial

Die Isolierung der Gesamt-DNA mit dem DNeasy Plant Kit von Qiagen ergab für die verschiedenen Genotypen Ausbeuten zwischen 25,2 bei Ca11 und 60,0 µg/g FM bei Pt06. Dabei variierten die DNA-Ausbeuten zwischen den einzelnen Isolierungen zum Teil beträchtlich, wie aus Tabelle A3 im Anhang hervorgeht. So betrug die DNA-Ausbeute für Genotyp Ca03 zum Beispiel einmal 17,2, während in der Wiederholung die dreifache DNA-Menge erzielt wurde (47,1 µg/g FM).

2.3.2.1 Identifizierung geeigneter Primer zur Differenzierung von *Petunia* und *Calibrachoa* sowie potentieller Hybriden

Um geeignete Primer für die Hybrididentifizierung zu ermitteln, wurden fünf *Petunia*- sowie neun *Calibrachoa*-Genotypen mit 12 RAPD-Primern wie unter 2.2.3.4 beschrieben, untersucht.

Alle zwölf in die Analyse einbezogenen Primer zeigten reproduzierbare Bandenmuster. Die Bandenmuster der *Petunia*-Genotypen unterschieden sich dabei bei den meisten Primern von denen der *Calibrachoa*. Eine schnelle Identifizierung möglichen Hybriden mittels RAPD-Analyse (der ausgewählten Primer Tab. 2.13) erschien daher möglich. Eine Unterscheidung der einzelnen *Petunia*-Genotypen war in den meisten Fällen ebenfalls möglich, jedoch zeigten sich zum Teil nur sehr geringe Unterschiede in den Bandenmustern sowie in der Anzahl der Banden. Oft unterschieden sich die einzelnen Genotypen nur in ein bzw. zwei Banden wie in Abbildung 2.5 dargestellt. Im Gegensatz dazu wiesen die Bandenmuster der untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen zum Teil beträchtliche Unterschiede im Bandenmuster auf. Ein Beispiel für einen Primer, mit dem sich die einzelnen Genotypen (vor allem die Petunien) relativ gut unterscheiden ließen, ist in Abbildung 2.5 zu sehen. Teilweise, wie hier in Abbildung 2.5 dargestellt, waren die amplifizierten Bandenmuster sehr komplex und wiesen eine Vielzahl an Banden auf. Abbildung 2.6 zeigt ein Beispiel für einen Primer zur Unterscheidung möglicher Hybriden zwischen verschiedenen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen.



Genotyp	Pt09	Pt06	Pt05	Pt03	Pt02	Ca07	Ca09	R31	Ca12	Ca11	Ca06	Ca05	Ca03	Ca02
Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

Abb. 2.5: Vergleich der Bandenmuster verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen nach Amplifikation mit Primer A20. Spur 1-5 : *Petunia*, Spur 6-14 *Calibrachoa*, Spur 15-18: *Salpiglossis sinuata*, *Nicotiana tabacum*, *Fabiana* 1000 und *Fabiana* 2000.

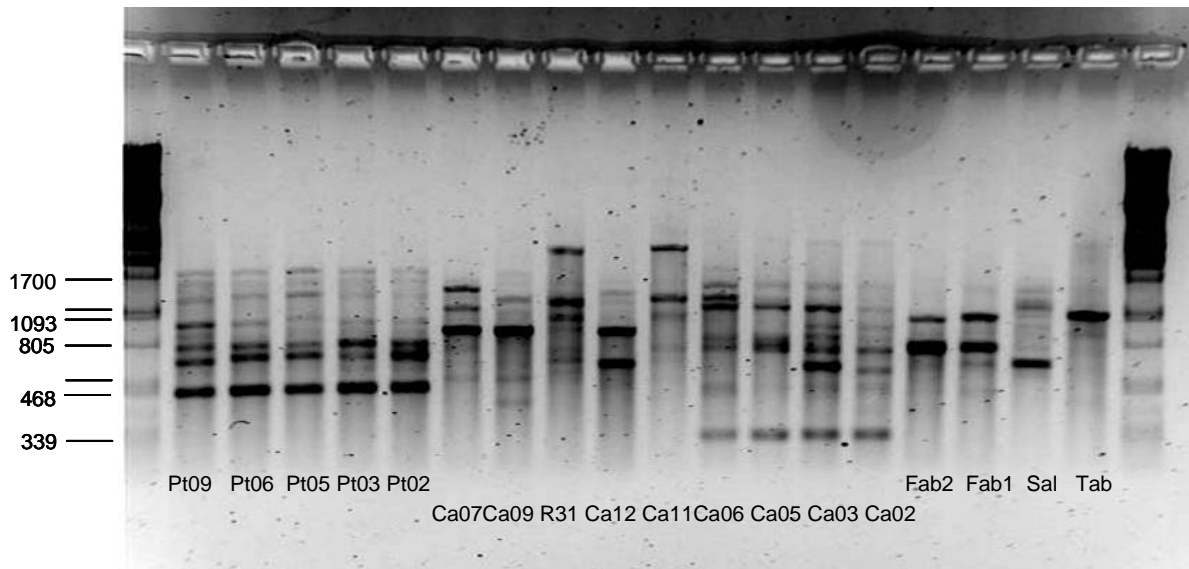


Abb. 2.6: Beispiel für einen Primer (A09) zur Unterscheidung möglicher Hybriden zwischen fünf *Petunia*- und neun *Calibrachoa*-Genotypen. Größenangabe der Banden in bp.

2.3.2.2 Untersuchung der verwandtschaftlichen Beziehung zwischen *Petunia* und *Calibrachoa*

Die Daten aus den RAPD-Untersuchungen wurden genutzt, um eine Distanzmatrix sowie ein Phänogramm zu erstellen. Die für die Untersuchung verwendeten Primer sowie die Anzahl der ausgewerteten Banden sind Tabelle 2.13 zu entnehmen.

Wie bereits dargestellt, war es mittels RAPD-Analyse möglich, die einzelnen Genotypen voneinander zu unterscheiden, was eine Voraussetzung für die Erstellung der Distanzmatrix sowie des in Abbildung 2.7 dargestellten Stammbaumes war.

Bei Betrachtung der folgenden Distanzmatrix (Tab. 2.12) kann man deutlich die sehr enge Verwandtschaft der untersuchten *Petunia*-Genotypen untereinander erkennen (Tab. 2.12, gelb markiert). Sieht man sich die Gruppe der züchterisch bearbeiteten *Calibrachoa*-Sorten an, so kann man auch hier eine relativ enge Verwandtschaft dieser Genotypen untereinander erkennen (Tab. 2.12, violett markiert). Deutlich größer ist der Abstand zwischen der Gruppe der „Wildarten“, bestehend aus den *Calibrachoa parviflora* Genotypen Ca05 und Ca06 bzw. den diesen morphologisch sehr ähnlichen Genotypen Ca03 und Ca02, (Tab. 2.12, grün markiert) und den Kultursorten (violett markiert). *Nicotiana*, *Salpiglossis* und *Fabiana* scheinen von den *Calibrachoa* verwandtschaftlich gesehen ähnlich weit entfernt zu sein wie *Petunia*. Auffällig sind die Distanzwerte zwischen *Salpiglossis* und allen untersuchten *Petunia*-Genotypen, die mit Werten über 0,9 besonders hoch waren. Zwischen den beiden *Fabiana*-Genotypen besteht wie zu erwarten eine relativ enge Verwandtschaft, was der Wert von 0,319 widerspiegelt. Anhand dieser Matrix ist es ebenfalls möglich, diejenigen Partner herauszusuchen, bei denen die Aussicht auf eine erfolgreiche Kreuzung / Protoplastenfusion am wahrscheinlichsten ist. In Fall der untersuchten *Calibrachoa*- und *Petunia*-Genotypen wäre das die Kombination *Petunia*-Genotyp Pt02 mit *Calibrachoa*-Genotyp Ca12 (siehe Tab. 2.12, rot markiert).

Tab. 2.12: Distanzmatrix für den paarweisen Vergleich der untersuchten Genotypen (Distanzkoeffizient nach Dice)

Genotyp		Salpi-glossis	Tabak	Fabiana 1000	Fabiana 2000	Ca02	Ca03	Ca05	Ca06	Ca11	Ca12	R31	Ca09	Ca07	Pt02	Pt03	Pt05	Pt06	Pt09
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Salpi-glossis	1	0																	
Tabak	2	0,882	0																
Fabiana1000	3	0,85	0,737	0															
Fabiana2000	4	0,86	0,756	0,319	0														
Ca02	5	0,826	0,909	0,76	0,774	0													
Ca03	6	0,795	0,946	0,767	0,783	0,388	0												
Ca05	7	0,811	0,922	0,825	0,9	0,556	0,5	0											
Ca06	8	0,83	0,822	0,882	0,889	0,649	0,6	0,5	0										
Ca11	9	0,852	0,923	0,793	0,738	0,813	0,825	0,831	0,785	0									
Ca12	10	0,8	0,833	0,815	0,719	0,833	0,774	0,791	0,672	0,500	0								
R31	11	0,857	0,889	0,833	0,746	0,848	0,781	0,731	0,324	0,400	0,400	0							
Ca09	12	0,783	0,864	0,76	0,968	0,821	0,796	0,746	0,719	0,438	0,400	0,394	0						
Ca07	13	0,843	0,918	0,818	0,793	0,770	0,667	0,735	0,677	0,507	0,415	0,437	0,443	0					
Pt02	14	0,905	0,9	0,87	0,837	0,885	0,822	0,729	0,698	0,8	0,643	0,742	0,731	0,719	0				
Pt03	15	0,913	0,818	0,84	0,849	0,893	0,837	0,714	0,754	0,844	0,667	0,788	0,786	0,738	0,154	0			
Pt05	16	0,915	0,867	0,843	0,852	0,895	0,84	0,781	0,759	0,846	0,705	0,791	0,825	0,774	0,283	0,263	0		
Pt06	17	0,911	0,907	0,837	0,846	0,891	0,833	0,774	0,75	0,841	0,695	0,785	0,818	0,767	0,216	0,236	0,142	0	
Pt09	18	0,913	0,909	0,84	0,811	0,929	0,918	0,841	0,895	0,875	0,733	0,788	0,857	0,803	0,385	0,393	0,438	0,309	0

■ = *Calibrachoa*-Wildarten bzw. Arten unbekannter Herkunft

■ = *Calibrachoa*-Sorten

■ = Mögliche optimale Fusionskombination

■ = *Petunia*-Genotypen

Aus den Daten der Distanzmatrix wurde ein Phänogramm erstellt. Anhand des erstellten Phänogramms ist deutlich zu erkennen, dass sich die unterschiedlichen Arten wie erwartet in einzelne Gruppen aufteilten. So bildeten der *Salpiglossis*-Genotyp ebenso wie der *Nicotiana*-Genotyp und die zwei *Fabiana*-Genotypen jeweils einen eigenen Zweig. Ebenso ließen sich die *Calibrachoa*- und *Petunia*-Genotypen in zwei Gruppen aufteilen, wobei sich die *Calibrachoa* innerhalb ihrer Gruppe in zwei Untergruppen gliederten (Abb. 2.7). Diese bestanden zum einen aus den Wildtypen Ca05 und Ca06 sowie zwei weiteren Genotypen Ca02 und Ca03, deren Herkunft nicht ausreichend bekannt ist, und zum anderen aus gezüchteten Kulturformen. Insgesamt war die Uniformität in der Gruppe der *Petunia* deutlich größer als in der Gruppe der *Calibrachoa*.

Tab. 2.13: Für die Erstellung des Phänogramms verwendete Primer sowie die Anzahl der ausgewerteten Marker

Primer- bezeichnung	A02	A03	A04	A05	A07	A08	A09	A10	A12	A14	A15	A20
Anzahl der stabil auftretenden und aus- gewerteten Banden	14	14	19	8	13	19	15	6	13	6	8	17
$\Sigma =$	152											

2.3.2.3 Bestimmung der Nachweisgrenze von geringen DNA-Konzentrationen aus DNA-Mischproben

Im Hinblick auf eine spätere Minimierung des Arbeitsaufwandes wurde untersucht, inwieweit es möglich ist, ein Screening der aus den Fusionsexperimenten entstandenen Sprosse anhand von Mischproben des Ausgangsmaterials für die DNA-Extraktion durchzuführen. Es wurden zwei Versuche durchgeführt. Das Bandenmuster entsprach in einem ersten Versuch immer dem Bandenmuster des Elters mit dem höheren Anteil (20:1 oder 50:1) an Blattstücken. Dabei ergab es keinen Unterschied, ob es sich um *Calibrachoa* oder *Petunia* handelte (Ergebnisse nicht dargestellt). Auf Grund dieser Ergebnisse, wurden Mischungsverhältnisse von 1:1, 1:5, 1:10 und 1:20 anstelle von 1:20, bzw. 1:50 gewählt. Ein kombiniertes Fragmentmuster wurde bei den Proben, welche aus dem Blattgemisch beider Eltern isoliert wurden, nur bei einer Konzentration von 1:1 bzw. 1:5 gefunden (Abb. 2.8) Wurde die DNA beider Eltern nach der Isolierung gemischt, lag die Nachweisgrenze für ein kombiniertes Fragmentmuster bei einem Mischungsverhältnis von 1:10 (nicht dargestellt).

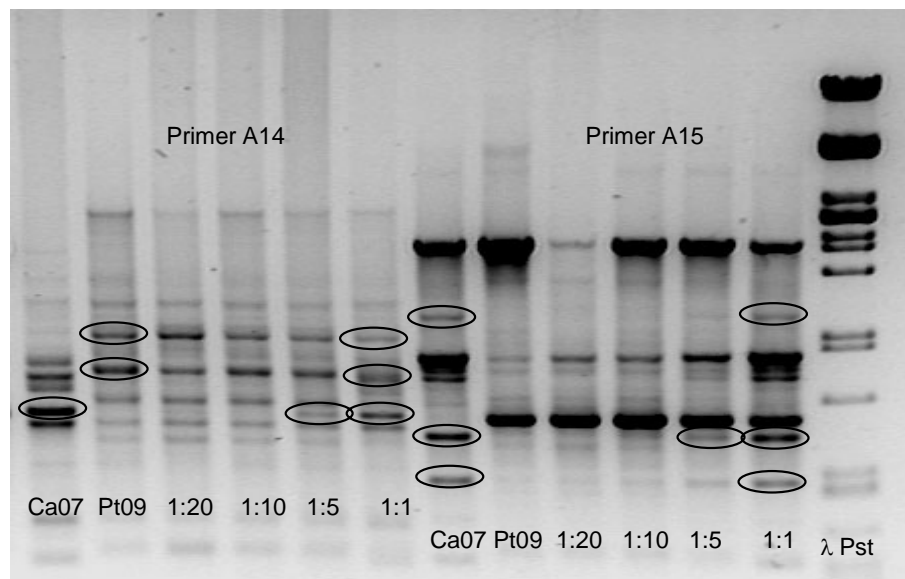


Abb. 2.8: Bestimmung der Nachweisgrenze von geringen DNA-Konzentrationen innerhalb einer Mischprobe von *Petunia*- und *Calibrachoa*-Blattstücken.

2.4 Diskussion

Durchflusscytometrische Untersuchung

Ein effektives Verfahren zur Bestimmung der DNA-Gehalte bei Pflanzen mittels Durchflusscytometrie wird bei ULRICH UND ULRICH (1991) beschrieben. Außer mit DAPI kann die Bestimmung des DNA-Gehaltes z. B. mit Propidiumjodid (MISHIBA ET AL. 2000) erfolgen. Neben der Bestimmung des DNA-Gehaltes besteht eine weitere Anwendung der Durchflusscytometrie bei Pflanzenzellen in der Bestimmung der Ploidiestufe (XU ET AL. 2004, SHIBA UND MII 2005) sowie der Identifikation möglicher Hybriden (HORITA ET AL. 2003). Bei den ermittelten Werten handelt es sich jedoch immer um relative DNA-Gehalte, da nur relative Fluoreszenzintensitäten analysiert werden (DOLEZEL UND BARTOS 2005).

Wurden die für die *Petunia*-Genotypen ermittelten Werte / Fluoreszenzintensitäten mit denen der *Calibrachoa*-Genotypen verglichen, so wurde deutlich, dass die Unterschiede im DNA-Gehalt zwischen den einzelnen *Petunia*- und den meisten *Calibrachoa*-Genotypen und somit für die Mehrheit der möglichen Fusionskombinationen nicht ausreichten, um eine eindeutige Unterscheidung der heterologen von den homologen Fusionsprodukten anhand ihres DNA-Gehaltes vornehmen zu können. Bei der Mehrheit der untersuchten *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen lag die gemessene Fluoreszenzintensität im Bereich zwischen 80 und 100 (Abb. 2.3). Damit wäre eine Bestimmung möglicher Hybriden auf Grund ihres DNA-Gehaltes für die Mehrzahl der untersuchten Genotypen nicht möglich, da der Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen den Eltern mindestens einen Messunterschied von 20 % betragen sollte. Nur bei einigen wenigen Fusionskombinationen, so z.B. zwischen den *Calibrachoa*-Genotypen Ca02, Ca03, Ca04, bzw. den tetraploiden Ca05 und Ca06 und sämtlichen *Petunia*-Genotypen wäre die Identifizierung nach durchflusscytometrischen Messungen möglich. Diese Kombinationen sind jedoch zumeist züchterisch uninteressant. Bei den züchterisch relevanten *Calibrachoa*-Genotypen lagen die ermittelten DNA-Gehalte dagegen zu nahe an denen der *Petunia*-Genotypen mit Ausnahme zweier tetraploider Genotypen (Pt07 und Genotyp 2, Abb. 2.3) Daher war in diesen Fällen eine durchflusscytometrische Identifizierung möglicher Hybriden unmöglich. Für die Aussagekraft der Messung ist der Variationskoeffizient (cv-Wert) eine wichtige Größe. Je kleiner dieser Wert ist, desto genauer ist die Messung. Im Allgemeinen gilt ein cv-Wert von 3 % als akzeptabel, wenn DAPI zum Anfärben der Kerne verwendet wurde. Werden die Kerne mit Propidiumjodid angefärbt, liegen die zu erwartenden cv-Werte etwas höher (DOLEZEL UND

BARTOZ 2005). Die in Tabelle A1 im Anhang für die untersuchten Genotypen dargestellten cv-Werte schwanken zwischen 2,3 und 4,3 %. Sie lagen damit zum Teil höher als der angestrebte cv-Wert von 3 %. Für die Untersuchung der Ploidiestufe war die Qualität der Analyse jedoch ausreichend, da der Ploidiegrad eindeutig aus den gemessenen DNA-Gehalten abzulesen war.

Die eigenen Untersuchungen zeigten weiterhin, dass das untersuchte *Petunia*-Material bezogen auf die DNA-Gehalte weniger heterogen war als das untersuchte *Calibrachoa*-Material. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von MISHIBA ET AL. (2000). Sie untersuchten verschiedene *Petunia*- und *Calibrachoa*-Taxa hinsichtlich ihres DNA-Gehaltes. Wobei die DNA-Gehalte der untersuchten *Petunia*-Taxa relativ eng beieinander lagen, ebenso wie die der meisten *Calibrachoa* mit Ausnahme von *C. pygmaea* und *C. parviflora*. Diese wiesen DNA-Gehalte auf, die etwa 50 % niedriger waren als die der übrigen untersuchten *Calibrachoa*-Taxa. Sie schlossen aus diesen Ergebnissen, dass es innerhalb der *Calibrachoa* zwei Gruppen gibt, eine bestehend aus der Gruppe, die durch *C. parviflora* und *C. pygmaea* gebildet wird, und einer weiteren bestehend aus den restlichen *Calibrachoa*-Genotypen. Das Vorhandensein von zwei Gruppen innerhalb der Gattung *Calibrachoa* wird zusätzlich durch die Ergebnisse von WATANABE ET AL. (1999) untermauert. Diese zeigten, dass sich *C. parviflora* und *C. pygmaea* hinsichtlich der Morphologie ihrer Samen von allen übrigen *Calibrachoa*-Genotypen unterscheiden. Sowohl *C. parviflora* als auch *C. pygmaea* zeigen nach der Kreuzung mit *C. pubescens* ($2n = 18$) keinen Samenansatz, wohingegen es bei allen übrigen 23 untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen zum Samenansatz kam. Der Ansatz von Samenkapseln wurde bei *C. pygmaea* nur nach Kreuzung mit *C. parviflora* beobachtet (WATANABE ET AL. 1997). ANDO ET AL. (2001) konnten nach Kreuzung von *C. parviflora* mit *C. heterophylla* ($2n = 18$) ebenfalls keinen Samenansatz erzielen. In der vorliegenden Untersuchung wiesen die Genotypen Ca02, Ca03 und Ca04 ebenfalls DNA-Gehalte auf, die deutlich unter denen der übrigen *Calibrachoa*-Genotypen lagen, während die übrigen Genotypen ähnliche DNA-Gehalte wie die untersuchten *Petunia*-Genotypen aufwiesen. Bei den Genotypen Ca04, Ca05 und Ca06 handelte es sich um *C. parviflora*. Würde man bei den Genotypen Ca05 und Ca06 von diploiden Pflanzen ausgehen, so wären diese Genotypen auch in die Gruppe der *C. parviflora* einzuordnen. Die Herkunft der Genotypen Ca02 und Ca03 ist unklar. Morphologisch ähneln sie den *C. parviflora*, jedoch ist ihr Wuchs wesentlich kompakter mit sehr schmalen Blättern und größeren Blüten als bei *C. parviflora*.

Die geringere Heterogenität der *Petunia*-Genotypen dürfte zum einen auf die stärkere züchterische Bearbeitung innerhalb der Gattung *Petunia* zurückgehen, zum anderen befanden

sich unter den *Calibrachoa*-Genotypen verschiedene Wildtypen, wie z.B. die Genotypen Ca04, Ca05 und Ca06 (*C. parviflora*).

Um einen Vergleich zwischen den in der vorliegenden Untersuchung ermittelten DNA-Gehalten und den in der Literatur, bzw. Datenbanken angegebenen C-Werten für *Petunia hybrida* durchführen zu können, musste die Größe des Kerngenoms ermittelt werden. Die Bestimmung der Größe des Kerngenoms mittels Durchflusscytometrie wird von DOLEZEL UND BARTOS (2005) diskutiert. Die Genomgröße einer unbekannt Probe kann nur im Vergleich mit einer Referenz, einem Standard, ermittelt werden. Es werden zwei Möglichkeiten des Vergleichs unterschieden. Zum einen, die externe Standardisierung, bei der eine separate Analyse der Zellkerne der unbekannt Probe und des Standards durchgeführt wird, und zum anderen die interne Standardisierung. Hier werden die Kerne der unbekannt Probe zusammen mit denen des Standards (Mischprobe) isoliert und angefärbt und gleichzeitig untersucht. Variante eins kann zu ungenauen Ergebnissen führen, wenn die Bedingungen für beide Proben nicht völlig identisch sind (Geräteeinstellungen, Probenpräparation etc). Durch Möglichkeit zwei werden diese Probleme umgangen.

Ein weiteres Problem beim Vergleich verschiedener C-Werte sind laut JOHNSTON ET AL. (1999) die unterschiedlichen Standards, die als Berechnungsgrundlage für die DNA-Gehalte dienen, da es sich bei diesen teilweise um tierische Zellkerne, im besonderen Hühnererythrocyten handelte. Für die Bestimmung der DNA-Gehalte von Pflanzen eignen sich jedoch pflanzliche Zellen besser. Darüber hinaus sollte ein idealer Standard eine ähnliche Genomgröße wie das zu untersuchende Objekt aufweisen (VINDELOV ET AL. 1983). Des Weiteren konnten MISHIBA ET AL. 2000 zeigen, dass sich die durchflusscytometrisch ermittelten DNA-Gehalte abhängig von dem verwendeten Farbstoff, Propidiumjodid oder DAPI, unterschieden. Die Verwendung von DAPI führte zu höheren Schätzungen des relativen DNA-Gehalts.

Um den DNA-Gehalt für einen der untersuchten *Petunia*-Genotypen zu ermitteln, wurde Genotyp Pt02 zusammen mit *Lycopersicon esculentum* in einer Mischprobe, was der internen Standardisierung entspricht, gemessen und der C-Wert errechnet. Dieser errechnete C-Wert wurde mit dem für *Petunia hybrida* angegebenen Wert der Datenbank des Botanischen Gartens Kew, UK (<http://www.kew.org/cvalues>) verglichen. Der für Pt02 ermittelte Wert von $1C = 1,48 \text{ pg}$ zeigt eine relativ gute Übereinstimmung mit dem entsprechenden Wert der Datenbank, die für *Petunia hybrida* einen DNA-Gehalt von $1,68 \text{ pg/C}$ angibt.

Allerdings wurde der dort von BENNETT UND SMITH (1976) angegebene C-Wert für *Petunia hybrida* ebenso wie der für *Lycopersicon esculentum* ermittelte Wert mittels "Feulgen Mikro

Densitometry“ (FMD) bestimmt und ist somit nur eine ungefähre Vergleichsgröße, da sich die C-Werte abhängig von der für die Ermittlung der relativen DNA-Gehalte verwendeten Methode bzw. Fluoreszenzfarbstoff deutlich voneinander unterscheiden können. MISHIBA ET AL. (2000) zeigten dies am Beispiel der von WHITE UND REES (1987) mittels FMD und ARUMUGANATHAN UND EARLE (1991) mittels Durchflusscytometrie gemessenen C-Werte für *Petunia axillaris subsp. parodii*, welche einen C-Wert von 3,0 bzw. 2,53 pg aufwiesen. Während Ethidiumbromid und Propidiumjodid unabhängig von der Basenzusammensetzung in doppelsträngige DNA-Bindungen interkalieren, bindet z. B. DAPI an AT reiche Regionen. Da zumeist die AT-Gehalte der untersuchten Arten nicht bekannt sind, und diese zwischen den Arten variieren, führt dies zu ungenauen Ergebnissen. DOLEZEL ET AL. (1992) befürworten die Verwendung von Ethidiumbromid und Propidiumjodid zur Bestimmung von absoluten DNA-Gehalten. Zum Zeitpunkt der Untersuchung stand in der vorliegenden Arbeit kein Gerät für die Messung der DNA-Gehalte mittels Ethidiumbromid- oder Propidiumjodid-Fluoreszenzfärbung zur Verfügung.

Molekulargenetische Untersuchungen

Da weder bestimmte Gensequenzen noch nähere Informationen über den Aufbau des Genoms für die untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen vorlagen, erschien die Anwendung der RAPD-Analyse auf Grund ihrer einfachen Handhabung und dem damit verbundenen geringen Zeitaufwand zur Charakterisierung möglicher Hybriden sinnvoll.

Mit dem verwendeten DNA-Isolierungskit von Qiagen ließ sich DNA aus 100-120 mg In-vitro-Blattmaterial in ausreichender Menge und guter Qualität isolieren. Abhängig von den Genotypen und Isolierungen schwankten die isolierten DNA-Mengen zwischen 17,0 und 66,1 µg/g FM jedoch beträchtlich (Tab. A3 im Anhang). Die von Qiagen für das verwendete Extraktionskit angegebenen DNA-Ausbeuten für *Lycopersicon esculentum* bzw. *Nicotiana tabacum* wurden mit 10 bzw. 20-25 µg DNA je 100 mg FM beziffert. Sie lagen deutlich höher als die in der vorliegenden Untersuchung für die verschiedenen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen erzielten Ausbeuten. Durch die Verringerung des eingesetzten Pflanzenmaterials könnte die Höhe der DNA-Ausbeute möglicherweise gesteigert werden. Bei dem verwendeten DNA-Isolierungs Kit von Qiagen wird die negativ geladene DNA über die positiv geladene Membran der Extraktionssäule gebunden. Neben der DNA können aber auch andere positiv

geladene Bestandteile des Extraktionsmixes wie z. B. Polysaccharide an diese Membran binden und die Bindungsstellen blockieren.

Identifizierung geeigneter Primer zur Differenzierung von *Petunia* und *Calibrachoa* sowie potentieller Hybriden.

Damit eine Identifizierung potentieller Hybriden über RAPD-Marker überhaupt möglich wird, müssen zuerst geeignete Primer für die zu untersuchenden Genotypen, sowie die unterschiedlichen Fusionskombinationen gefunden werden, da es beträchtliche Unterschiede zwischen den Primern in Bezug auf die Anzahl der amplifizierten Banden und deren Reproduzierbarkeit gibt. Durch die Selektion geeigneter Primer zur Untersuchung verschiedener Genotypen von *Phaseolus vulgaris* L. gelang es SKROCH UND NIENHUIS (1995) die Reproduzierbarkeit der Bandenmuster von 76 % auf 88 % zu erhöhen. Aus diesem Grund wurden 20 RAPD-Primer hinsichtlich ihrer Eignung und Reproduzierbarkeit untersucht. 13 der 20 untersuchten RAPD-Primer zeigten reproduzierbare Bandenmuster, zwei amplifizierten nur schwache Muster, die nicht reproduzierbar waren, und fünf Primer führten zu keinerlei Banden.

Zwölf dieser Primer wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Differenzierung zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* sowie möglicher Hybriden untersucht. Die amplifizierten Bandenmuster, die auf die 12 ausgewählten Primer zurückgingen, zeigten deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen. Der Nachweis möglicher Hybriden sollte daher mit ausgesuchten, auf die Elternkombinationen abgestimmten Primern möglich sein. Die amplifizierten Bandenmuster der untersuchten *Petunia*-Genotypen zeigten untereinander eine höhere Übereinstimmung, was auf eine geringere Heterogenität zwischen den untersuchten *Petunia*-Genotypen schließen lässt und auf die starke züchterische Bearbeitung innerhalb der *Petunia* zurückzuführen sein dürfte. Es handelte sich bei den untersuchten *Petunia*-Genotypen um *P. hybrida*, deren genaue Elternschaft jedoch bis heute nicht geklärt ist. Man geht jedoch davon aus, dass sie auf eine Kreuzung zwischen einer weiß blühenden und einer magentafarbenen blühenden *Petunia*-Art zurückgehen.

Die amplifizierten Bandenmuster der untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen wiesen dagegen stärkere Unterschiede in den amplifizierten Bandenmustern auf. Dies dürfte auf das sehr heterogene Material zurückzuführen sein, da sich unter dem untersuchten *Calibrachoa*-

Material auch einige Wildarten wie z.B. *C. parviflora*-Genotypen sowie zwei Genotypen mit unbekannter Herkunft befanden. Die amplifizierten Bandenmuster waren teilweise sehr komplex, was die Identifikation möglicher Hybriden erschweren kann. JONES ET AL. (1997) zeigten, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der RAPD-Analyse im Vergleich zur AFLP-Analyse sowie SSR-Technik, wenn die Versuche unter gleichen Bedingungen, aber in unterschiedlichen Laboren durchgeführt wurden, nicht gegeben war. CASTIGLIONE ET AL. (1993) konnten dagegen nach der Optimierung der PCR-Bedingungen keine Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse feststellen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nur teilweise bestätigt werden. Durch die Auswahl geeigneter Primer ließen sich die Ergebnisse für die besonders stark amplifizierten Banden reproduzierbar wiederholen. Geringe Unterschiede gab es lediglich in der Intensität der Banden. Neben diesen amplifizierte die Mehrheit der Primer jedoch auch Banden von sehr schwacher Intensität. Diese ließen sich oft nicht reproduzieren. Aus diesem Grund sollten für die Analyse möglicher Hybriden Primer gewählt werden, die jeweils zwei bis drei spezifische Banden von hoher Intensität für jeden Elter reproduzierbar amplifizieren.

Untersuchung des verwandtschaftlichen Verhältnisses zwischen *Calibrachoa* und *Petunia*

Da es mit Hilfe der ermittelten RAPD-Primer möglich war, die verschiedenen *Petunia*- sowie *Calibrachoa*-Genotypen voneinander zu unterscheiden, war damit die Voraussetzung für die Erstellung eines Phänogramms gegeben. Neben den verschiedenen *Calibrachoa*- und *Petunia*-Genotypen wurden Vertreter weiterer Gattungen (*Salpiglossis*, *Fabiana* und *Nicotiana*) in die Verwandtschaftsanalyse miteinbezogen. Mit Hilfe des erstellten Phänogramms war es möglich, Informationen über das verwandtschaftliche Verhältnis zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* sowie zu weiteren Spezies innerhalb der *Solanaceae* zu erhalten (Abb. 2.7). Die basierend auf den Ergebnissen der RAPD-Analyse erstellte Distanzmatrix (Abb. 2.12) zeigte deutlich das enge Verwandtschaftsverhältnis innerhalb der untersuchten *Petunia*-Genotypen. Innerhalb der untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen gab es ebenfalls eine Gruppe von Genotypen die enger miteinander verwandt waren. Bei diesen handelte es sich um züchterisch bereits bearbeitetes Material. Diese zeigten im Gegensatz zu den verschiedenen *C. parviflora* Genotypen ebenfalls eine engere Verwandtschaft zu den untersuchten *Petunia*-Genotypen. Mit Hilfe der Distanzmatrix können diejenigen

Fusionspartner bestimmt werden, bei denen die Aussicht auf eine erfolgreiche Kreuzung bzw. Fusion am wahrscheinlichsten ist bzw. jene, bei denen die Aussicht auf Erfolg am unwahrscheinlichsten ist, geht man davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fusion bzw. Regeneration von Hybriden umso größer ist je enger zwei Arten bzw. Genotypen miteinander verwandt sind. Basierend auf den Daten der Distanzmatrix wurde ein Phänogramm erstellt, um erste Aussagen über das Verwandtschaftsverhältnis zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* treffen zu können, da zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine Veröffentlichungen hierzu vorlagen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass keine Absicherung der Daten des Phänogramms über das Bootstrap-Verfahren erfolgte.

Erst Mitte 2005 bzw. 2006 wurden von ANDO ET AL. (2005), bzw. KULCHESKI ET AL. (2006) hierzu Untersuchungen veröffentlicht. Die von ANDO ET AL (2005) veröffentlichten Stammbäume wurden auf der Basis von Chloroplasten-DNA (cpDNA) und mittels RFLP-Analyse erstellt. Der verwandtschaftlichen Analyse von KULCHESKI ET AL (2006) lagen drei verschiedene Marker-Systeme zugrunde. Neben der ribosomalen RNA wurden auch cpDNA und mtDNA untersucht. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit bildeten die untersuchten *Calibrachoa* und *Petunia* jeweils eine eigene Gruppe. Bei ANDO ET AL (2005) lässt sich aus den dargestellten Stammbäumen außerdem entnehmen, dass beide Genera verwandtschaftlich enger miteinander verwandt sind als *Petunia* mit Tabak, bzw. *Calibrachoa* mit Tabak. Die Erstellung genetischer Stammbäume mittels RAPD-Analyse ist umstritten. Andererseits zeigten einige Untersuchungen nur geringe Unterschiede zwischen Stammbäumen die auf RAPD-Analyse beruhten, und Stammbäumen, die z.B. auf AFLP- und RFLP-Marker zurückgingen. So stellten FEDERICI ET AL. (1998) nur geringe Unterschiede in einem Vergleich zwischen RAPD-Markern und RFLP-Markern zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes beruhend auf molekulargenetischen Analysen innerhalb der Gattung *Citrus* sowie nah verwandten Gattungen, fest.

Das in der vorliegenden Arbeit mittels RAPD-Primern erstellte Phänogramm zeigt jedoch eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ANDO ET AL. (2005) bezüglich des Verwandtschaftsverhältnisses zwischen *Calibrachoa* und *Petunia* sowie *Nicotiana*. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Salpiglossis sinuata* weniger verwandt mit *Petunia* zu sein scheint als *Petunia* und *Calibrachoa* untereinander. Dies ist insofern interessant, da bereits somatische Hybridisierungen zwischen *Petunia* und Tabak (GLIMELIUS AND BONNETT 1986, PENTAL ET AL. 1986 und HINNISDAELS ET AL. 1991) sowie *Petunia* und *Salpiglossis* (LEE ET AL. 1994) beschrieben wurden. Im Fall der *Salpiglossis* basieren die Ergebnisse auf Chromosomenzählungen und Isoenzymanalyse. Bei den Fusionen, aus denen Hybriden

zwischen Tabak und *Petunia* hervorgegangen waren, handelte es sich um asymmetrische Fusionen. Bei den Hybriden handelte es sich zumeist um stark asymmetrische Hybriden, die nur zu einem sehr geringen Anteil Chromosomen, bzw. Teile einzelner Chromosomen des einen Partners aufwiesen, bzw. die Chromosomen eines Elters eliminiert wurden, was auf eine Inkompatibilität zwischen den Genomen hinweist (PENTAL ET AL. 1986).

Bestimmung der Nachweisgrenze von geringen DNA-Konzentrationen aus DNA-Mischproben

Die Bestimmung niedriger DNA-Konzentrationen war bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:5 möglich (Abb. 2.8). Dabei machte es einen Unterschied, ob es sich um eine Mischprobe bereits isolierter DNA handelte oder einer Mischprobe aus Blattmaterial, aus welchem anschließend die DNA isoliert wurde. Um den Arbeitsaufwand bei der Isolierung und Analyse einer hohen Anzahl möglicher Hybridsprosse einzuschränken, wäre die Zusammenfassung der zu analysierenden Sprosse zu Bulks durchaus denkbar. Es bleibt jedoch zu überlegen, ob diese Methode sensitiv genug ist, wenn sich unter den Sprossen asymmetrische, bzw. Hybriden. ZHANG ET AL. (2006) beschrieben ein Pooling System für die Identifizierung von Transgenen in markerfreien Transformanten bei Weizen aus einer hohen Anzahl zu untersuchender Proben. Mit diesem System war es möglich, die zehn positiven Proben aus einer Gesamtzahl von 1000 negativen Proben mit nur 96 PCR-Reaktionen zu identifizieren. Die Effektivität dieser Methode ist jedoch erst bei einer sehr hohen Anzahl zu untersuchender Proben gegeben. Dieses System könnte bei einer ausreichend hohen Anzahl regenerierter Fusionssprosse ebenfalls angewendet werden, um so die Anzahl der notwendigen PCR-Reaktionen auf ein Minimum reduzieren zu können, vor allem dann, wenn kein geeignetes Selektionssystem zur Selektion der heterologen Protoplasten zur Verfügung steht.

3 Protoplastenkultur bei *Petunia* und *Calibrachoa*

3.1 Einleitung

Die Isolation von Protoplasten aus pflanzlichem Gewebe wurde bereits für eine Vielzahl von Zierpflanzen, so z. B. für *Dimorphotheca aurantiaca* (AL-ATABEE ET AL. 1990), *Felicia bergeriana* und *Brachycome iberidifolia* (MALAURE ET AL. 1990), *Dianthus* (NAKANO UND MII 1992), *Rosa hybrida* (MARCHAND ET AL. 1997) sowie *Cyclamen persicum* MILL. (WINKELMANN ET AL. 2006) beschrieben.

Ebenso wurde die Isolation und Regeneration von Protoplasten aus *Petunia* und *Calibrachoa* bereits mehrfach dargestellt (BINDING 1974, IZHAR UND POWER 1977, SINK UND POWER 1977 und FORD-LOGAN UND SINK 1988). Allerdings handelte es sich bei den untersuchten *Petunia*-Genotypen um einige wenige Modellgenotypen bzw. Genotypen, die heute keine züchterische Relevanz mehr haben. Bei *Calibrachoa* wurden dagegen ausschließlich Wildarten (*C. parviflora*, *C. alpicola* und *C. variabilis*) untersucht, da Ende der 70er bis Mitte der 90er Jahre das heutige züchterisch bearbeitete Sortiment noch nicht vorhanden war.

Bei Protoplasten handelt es sich um Zellen, die weder Mittellamelle noch Zellwand besitzen. Die ersten Protoplasten wurden bereits 1892 isoliert. Die Freisetzung der Protoplasten erfolgte damals im Gegensatz zu heute mechanisch, indem die Zellen einem Plasmolytikum ausgesetzt und mit einer feinen Klinge geschnitten wurden. Wurden die Zellen nur im Bereich der Zellwand aufgeschnitten, kam es zur Freisetzung der Protoplasten (BHOJWANI UND RADZAN 1996). Anfang der 60er Jahre wurden Protoplasten erstmalig durch den Verdau der Zellwand mittels Cellulase, welche von einem Pilzes produziert wurde, isoliert (COCKING, 1960). Gegen Ende der 60er, Anfang der 70er Jahre waren Enzyme wie Cellulase und Pektinase bereits kommerziell erhältlich (BHOJWANI UND RADZAN 1996). Erst diese Enzyme ermöglichten die Isolierung von Protoplasten im großen Umfang. Die Behandlung des Pflanzenmaterials mit Pektinasen führt zum Abbau der Mittellamellen, wohingegen die Cellulasen wie bereits erwähnt für den Abbau der Zellwände verantwortlich sind. Als Ausgangsmaterial können, abhängig von der Pflanzenart, z. B. Blätter (Mesophyll), Sprosse oder Kallus verwendet werden. Damit es weder zur Plasmolyse noch zur Deplasmolyse der Protoplasten kommt, müssen alle Medien, die zur Isolierung und auch zu Beginn der Protoplastenkultur verwendet werden, einen bestimmten osmotischen Wert aufweisen. Dieser liegt je nach Pflanzenart im Bereich zwischen 450 und 800 mOsmol/kg H₂O (BHOJWANI UND RADZAN 1996). Als Osmotikum dienen dabei zumeist Mannit (BINDING 1974) und Sorbitol aber auch Saccharose. Nach verschiedenen Wasch- und Zentrifugationsschritten erhält man am Ende das

Protoplastenpellet. Für ein optimales Wachstum ist die Dichte der kultivierten Protoplasten von entscheidender Bedeutung. Die Protoplasten können nach erfolgter Isolierung entweder eingebettet z. B. in Alginat bzw. Agarose oder flüssigem Medium kultiviert werden.

Die verwendeten Medien basieren häufig auf dem von KAO UND MICHAYLUK (1975) entwickelten KM8p-Medium (BHOJWANI UND RADZAN 1996). Dieses Medium enthält neben Makro- und Mikroelementen sowie Säuren und Vitaminen verschiedene Wachstumsregulatoren, die im weiteren Verlauf der Arbeit als Phytohormone bezeichnet werden. Als Phytohormone finden meist Auxine (NAA, IAA und 2,4-D) und Cytokinine (BAP, Kinetin und 2iP) Verwendung. Abhängig von der Pflanzenart variieren die verwendeten Konzentrationen sowie das Verhältnis von Auxin zu Cytokinin während der Kultur teilweise stark. Während zur Anregung der Zellteilung sowie zur Wurzelbildung das Verhältnis zu Gunsten des Auxin verschoben ist, werden für die Sprossregeneration höhere Cytokinin-Konzentrationen angestrebt.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Protoplastenkultur ist die Osmolarität.

Während der Kultur der Protoplasten wird die Osmolarität in mehreren Schritten, meist zweien oder dreien, soweit abgesenkt, bis eine Osmolarität von ca. 300 mOsmol/kg H₂O erreicht ist. Diese entspricht der Osmolarität der Sprossregenerations- und Sprosskulturmedien. Durch diese Anpassung soll ein osmotischer Schock bei der Überführung der Kallusse auf das Sprossregenerationsmedium vermieden werden. Die Sprossregeneration sowie die Regeneration von Wurzeln werden durch Zusatz entsprechender Phytohormone zum Medium induziert.

In diesem Kapitel soll neben der Protoplastenisolation, -reinigung, -kultur und Sprossregeneration ebenfalls die Charakterisierung der Regenerate aus Protoplasten erfolgen.

Bei der Regeneration ganzer Pflanzen aus Protoplasten können genetische und morphologische Veränderungen auftreten. Häufig handelt es sich bei diesen Veränderungen um die Erhöhung der Ploidiezahl. Es können aber auch Chlorophylldefekte, welche einzelne Bereiche der Pflanze bzw. die ganze Pflanze betreffen können, sowie das Auftreten von Albinopflanzen beobachtet werden. Das Auftreten von Pflanzen mit veränderten Eigenschaften, welche aus Protoplasten hervorgingen, wurde, z. B. von WINKELMANN UND GRUNEWALDT (1995) beschrieben. Sie beobachteten morphologische Veränderungen an *Saintpaulia ionantha*, welche aus Protoplasten regeneriert wurden. Bei einigen dieser Pflanzen kam es zu einer Veränderung der Ploidie. Des Weiteren wurden verschiedene Chlorophylldefekte beobachtet. Die Stabilität eines Protoplastenregenerationssystems, dies beinhaltet sowohl mögliche genetische und morphologische Veränderungen als auch

Überführungs- und Akklimatisierungsraten, ist für seine Anwendbarkeit von großer Bedeutung. Dabei kann das Kulturverfahren das Auftreten morphologischer Veränderungen zum Teil stark beeinflussen. Zu einer Erhöhung der Ploidiestufe kann es bereits bei der Inkubation des Pflanzenmaterials in der Enzymlösung durch sogenannte spontane Fusionen kommen. YE UND EARLE (1991) beschrieben eine Erhöhung der spontanen Fusionsrate von Mais-, Spargel- und Reis-Protoplasten während der Inkubation in einer Cellulysin haltigen Enzymlösung. Bei Tomate, Kohl und Petunie war dagegen die Rate an mehrkernigen Protoplasten nicht erhöht. FREARSON ET AL. 1973 berichteten, dass das Auftreten von Protoplasten mit mehr als einem Zellkern durch die Inkubation des Pflanzenmaterials in einer präplasmolytischen Lösung vor der Isolierung vermindert werden kann. Da für die Anwendbarkeit dieses Protoplastenregenerationssystems die Stabilität der aus Protoplasten hervorgegangenen Pflanzen wichtig ist, wurde ein Teil der aus Protoplastenkultur regenerierten Pflanzen von zwei *Calibrachoa*- und einem *Petunia*-Genotypen (Sprosse regeneriert aus Mesophyll- sowie aus Petalen-Protoplasten) ins Gewächshaus überführt, die Überführungsraten ermittelt und die Pflanzen auf morphologische Veränderungen hin untersucht.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial, das zur Isolierung der Mesophyllprotoplasten diente, wurde in vitro angezogen. Sowohl die *Petunia*- als auch die *Calibrachoa*-Sprosse wurden im Kulturraum bei 24 °C und einer Beleuchtungsintensität von 31,5 bis 47,7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ in Gläsern kultiviert.

Die Beleuchtungsdauer betrug 16 Stunden. Verwendet wurden in der Regel Blätter fünf bis sechs Wochen alter Sprosse. Die für die Isolierung von Petalenprotoplasten verwendeten Blüten stammten von Gewächshauspflanzen. Die Düngung mit Flory Mega 3 (0,7 ‰) erfolgte hier mit jedem Gießen.

Die benötigten Blüten wurden für 1 min in 70 %igem Ethanol desinfiziert und anschließend in einer 3 %igen Natriumhypochloritlösung für 10 min sterilisiert. Im Anschluss an die Sterilisation folgten drei Waschgänge in sterilem H_2O dest. für 1, 3 und 5 min. Für die Isolierung am besten geeignet waren Blüten, kurz nach der Anthese. Eine Liste aller Genotypen befindet sich unter 2.2.1 (Tab. 2.1 und 2.2).

3.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen und Kulturmedien für die Protoplastenisolation und -kultur

Für alle Medien und Lösungen, die für die Protoplastenkultur verwendet wurden, wurde ausschließlich Reinstwasser, das im folgenden als Aqua bidest. bezeichnet wird, verwendet. Die Einstellung des pH-Wertes auf 5,8 erfolgte bei allen Medien mit 0,1 bzw. 1,0 M KOH und 0,1 bzw. 1,0 M HCl. Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren bzw. Autoklavieren eingestellt.

Alle Protoplastenmedien und Lösungen, ausgenommen das mit Plant-Agar (Duchefa) verfestigte KF2-Medium, wurden filtersterilisiert. Dabei wurden je nach Menge der zu sterilisierenden Lösung, Spritzenfilter (0,2 µm Porengröße, Sarstedt), die auf eine Kunststoffspritze (50 ml) geschraubt wurden, oder Bottle-Top-Filter (250 ml und 500 ml Fassungsvermögen, Nalgene) mit einer Cellulose-Acetat-Membran (0,2 µm Porengröße, Sartorius) verwendet.

Der Vorteil der Bottle-Top-Filter, die im Autoklaven (Systec V-150) sterilisiert wurden, bestand darin, dass sie direkt auf eine Laborflasche (100-1000 ml, Schott) geschraubt werden konnten und im Gegensatz zu den Spritzenfiltern keine Kraft aufgewendet werden musste, da der Filter an eine Pumpe angeschlossen wurde.

Die Präplasmolyselösung setzte sich wie in Tabelle 3.1 angegeben zusammen. Für die Herstellung der Enzymlösung wurden 2 g Cellulase und 0,6 g Macerozyme wie in Tabelle 3.2. angegeben (bzw. 1,0 g Cellulase und 0,3 g Macerozyme, Onozuka R-10, Duchefa) eingewogen, mit 5 ml H₂O bidest. gemischt und für ca. zwei Stunden auf einem Magnetrührer bei höchster Stufe gerührt. Die Lösung wurde anschließend auf 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt und ca. 30 s bei 13 000 Upm (Eppendorfcentrifuge 5415D, Rotor F45-24-11) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 95 ml des BNE 9-Mediums gemischt. Der pH-Wert wurde auf 5,6 eingestellt und das Medium filtersterilisiert und ebenso wie die Enzyme bis zu seiner Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Zusammensetzung der Pufferlösung ist in Tabelle 3.3 angegeben und bestand aus zwei Lösungen, Lösung A und Lösung B. Von Lösung A wurde 1 Liter, von Lösung B 100 ml angesetzt. Von der Pufferlösung (Lösung A + B) wurde immer 1 Liter angesetzt und dieser in Portionen von jeweils 200 ml, aufgeteilt auf 250er Laborflaschen (Schott), autoklaviert. Die übrige Lösung B wurde bis zu ihrer erneuten Verwendung bei -18 °C eingefroren.

Das Medium, welches für die Kultur der In-vitro-Sprosse Verwendung fand, die das Ausgangsmaterial für die Isolierung der Protoplasten darstellten, enthielt neben verschiedenen

MS Makro- und Mikroelementen sowie Vitaminen, 20 g/l Saccharose und 0,1 mg/l 2iP (s. Anhang Tab. A.5). Die aus Kallus regenerierten Sprosse wurden ebenfalls auf diesem Medium kultiviert, jedoch ohne 2iP.

Die Zusammensetzung der für die Kultur der Protoplasten verwendeten Medien wird in Tabelle 3.4 angegeben. Die genauen Gehalte an Makro- und Mikronährstoffen, Vitaminen, organischen Säuren und Zuckern sind Tabelle A4 im Anhang zu entnehmen. Die Phytohormonkombinationen und -konzentrationen für die verschiedenen untersuchten Sprossregenerationsmedien und Sprosswachstumsmedien sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Diese enthielten neben Makro- und Mikroelementen (MURASHIGE UND SKOOG 1962), 20 g/l Saccharose (handelsüblicher Haushaltszucker), verschiedene Vitamine und 8,0 mg/l Plant Agar (Duchefa). Die vollständigen Rezepte befinden sich im Anhang (Tab. A5.).

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Präplasmolyselösung

Sorbitol	0,3 M
Glycin	0,1 M
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,05 M
Filtersterilisation	

Tab. 3.2: Zusammensetzung und Herstellung der Enzymlösung für die Protoplastenisolation

Macerozyme	0,6 g
Cellulase	2,0 g
BNE9-Medium	95 ml
H ₂ O bidest.	5 ml
Filtersterilisation	

Tab. 3.3: Zusammensetzung der Pufferlösung

Lösung A	KCl Saccharose NH ₄ NO ₃ KH ₂ PO ₄ pH Sterilisation	18,8 g/l 23,0 g/l 160 mg/l 136 mg/l 5,6
Lösung B	CaCl ₂ x 2 H ₂ O pH Sterilisation	44,2 g/l 5,6
Pufferlösung	250 ml Lösung A + 3,75 ml Lösung B pH Sterilisation Osmotischer Wert	5,6 Autoklavieren 550-560 mOsmol/kg H ₂ O

Tab. 3.4: Zusammensetzung und Verwendungszweck der Protoplastenkulturmedien

Medium	Makro- elemente	Mikro- elemente, Vitamine	Org. Säuren	Sacch. [g/l]	Osmo- larität [mOsmol/ kg H ₂ O]	NAA [mg/l]	BAP [mg/l]
Grundmedium für die Enzymlyösung (BNE9)	mod. KM8p ³⁾	B5 ²⁾	KM8 ¹⁾	120	535	0	0
Startmedium für die Protoplastenkultur (8pm7)	mod. KM8p	B5	KM8p	125	560	1,0	1,0
Kallusinduktionsmedium (KF1)	mod. KM8p ³⁾	B5	KM8p	90	400	0,5	0,5
Kalluswachstumsmedium (KF2)	mod. KM8p	B5	KM8p	65	300	0,5	0,5
Kalluswachstumsmedium (KF2 fest)	mod. KM8p	B5	KM8p	65	300	0,5	0,5

- 1) KAO AND MICHAYLUK (1975)
- 2) GAMBORG ET AL. (1968)
- 3) verändert nach KAO AND MICHAYLUK (1975): 0,3 g/l NH₄NO₃ und 0,9 g/l CaCl₂

Tab. 3.5: Gehalte an Phytohormonen in den Sprossregenerationsmedien und Sprosswachstumsmedien.

Medium	2-iP [mg/l]	NAA [mg/l]	IAA [mg/l]	TDZ [mg/l]	BAP [mg/l]	Zeatin [mg/l]
Pet 1	-	1,0	-	-	0,5	-
Pet 2	-	2,0	-	-	1,0	-
Pet E	-	0,1	-	-	1,0	-
Pet G	-	-	-	-	-	1,0
Pet H	-	0,1	-	-	2,0	-
Pet I	-	-	0,2	-	2,0	-
Pet J	-	-	0,2	0,5	-	-
Pet K	-	-	0,2	1,0	-	-
5.0	-	-	-	-	-	-
5.3	0,1	-	-	-	-	-

3.2.3 Isolierung und Reinigung der Protoplasten

Die Isolierung der Protoplasten erfolgte nach dem in Abbildung 3.1. dargestellten Schema. Das Pflanzenmaterial wurde in schmale Streifen von ca. 1 mm geschnitten und für ein bis zwei Stunden in 5 ml Präplasmolyselösung (Zusammensetzung siehe Tab. 3.2) in Plastikpetrischalen (6 cm Durchmesser, Sarstedt) inkubiert. Je Ansatz wurden ca. 400 mg Pflanzenmaterial verwendet. Anschließend wurde die Präplasmolyselösung gegen 5 ml Enzymlösung (2 % Cellulase und 0,6 % Macerozyme, Tab. 3.3) ausgetauscht. Die Inkubation fand über Nacht für ca. 15 Stunden bei 24 °C im Dunkeln statt. Nach diesen 15 Stunden wurden die Schalen ca. 5 bis 10 Minuten bei ca. 65 Upm auf einem Kreisschüttler (GFL 3015) geschwenkt und anschließend ca. 1 h stehen gelassen. Im Anschluss daran wurde dasselbe Volumen, in diesem Fall 5 ml, einer 20 %igen Saccharoselösung in die Petrischalen pipettiert. Die eigentliche Isolierung begann mit der Filtration der Protoplastensuspension durch ein Siebgewebe mit einer Maschenweite von zunächst 500 µm und anschließend 100 µm. Das Filtrat, welches in einem 12 ml Glasröhrchen aufgefangen wurde, wurde mit 1,5 ml einer Pufferlösung überschichtet und bei 259 x g in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Sigma 3K18, Rotor 11133) für 10 min zentrifugiert. Die intakten Protoplasten sammelten sich in Form einer gut sichtbaren Bande in der Phase zwischen den beiden Schichten. Sie wurden mit einer Glaspipette abgesaugt und in ein vorbereitetes Glasröhrchen, welches 5 ml Pufferlösung enthielt, überführt und vorsichtig mit der Pufferlösung gemischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 65 x g für 6 min, an dessen Ende sich am Boden des Röhrchens ein Pellet gebildet hatte. Der Überstand wurde abgesaugt und erneut 5 ml Pufferlösung hinzugegeben, das Röhrchen leicht geschwenkt, und bei 65 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand ein weiteres Mal abgesaugt und 1 ml Pufferlösung hinzugegeben. Die Dichte der Protoplasten je ml wurde mit Hilfe einer Bürker-Türk-Zählkammer bestimmt, indem ca. 0,1 ml der Protoplastensuspension mit einer Glaspipette aufgenommen, in die Kammer pipettiert und die Anzahl der Protoplasten je Großquadrat bestimmt wurde. Je Probe wurden vier Großquadrate gezählt. Der ermittelte Wert lag den Berechnungen für die Einstellung der Kulturdichte zugrunde. Zu der im Röhrchen verbliebenen Protoplastensuspension wurden 5 ml Pufferlösung hinzugegeben und diese ein letztes Mal bei 76 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet abhängig vom Kulturverfahren in verschiedenen Lösungen suspendiert.

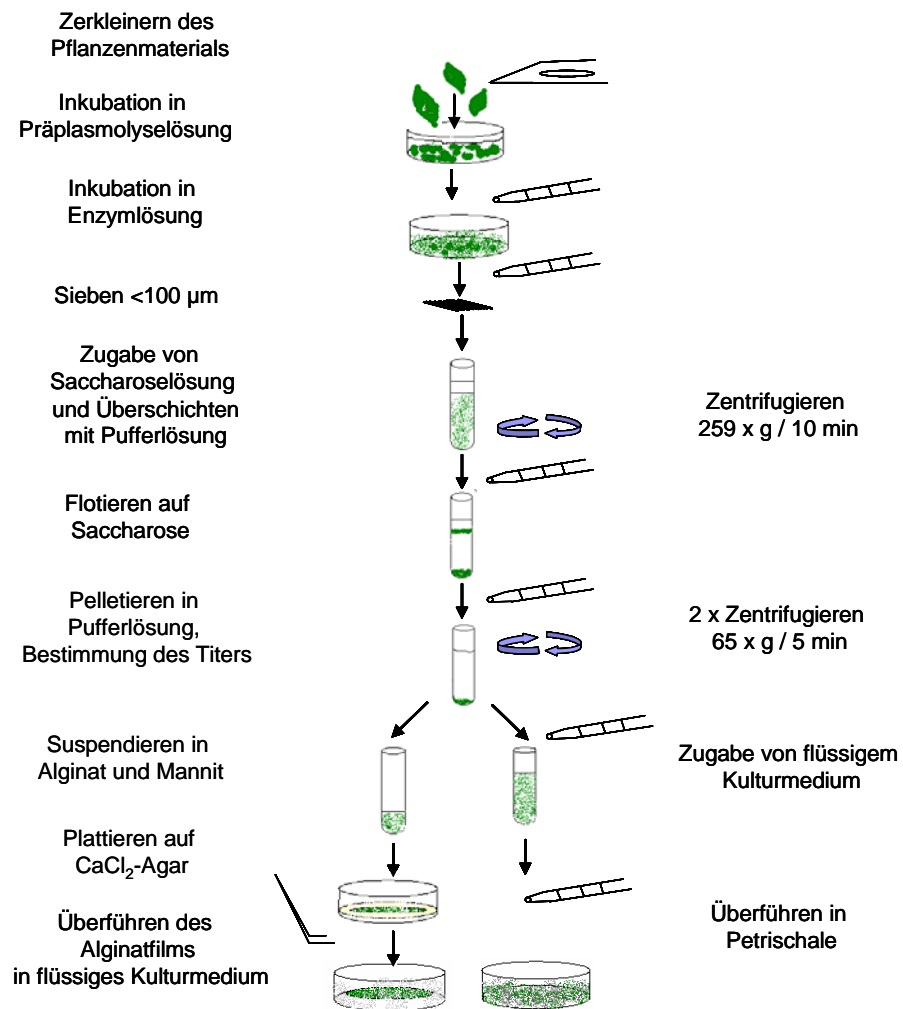


Abb. 3.1: Schematischer Ablauf der Isolierung, Reinigung und Einbettung bzw. Überführung in flüssiges Medium von *Calibrachoa*- und *Petunia*-Protoplasten.

3.2.4 Kultur der Protoplasten

Die Kultur der Protoplasten erfolgte bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln. Es wurden zwei Kulturverfahren angewendet. Zum einen die Flüssigkultur, bei der die Protoplasten in flüssigem Medium suspendiert werden, und zum anderen die Kultur der Protoplasten eingebettet in Alginat (wird im weiteren Verlauf als Alginat-Kultur bezeichnet). Bei der Kultur in Alginat wurden die Protoplasten wie in Abbildung 3.1 dargestellt, in einen Alginatfilm eingebettet und dieser in flüssigem Medium kultiviert.

3.2.4.1 Flüssigkultur

Bei der Flüssigkultur wurden die sedimentierten Protoplasten in flüssigem 8pm7-Medium (Tab. 3.4) aufgenommen und mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Protoplasten / ml in Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm bzw. 3,5 cm kultiviert. Je Petrischale wurden 3 ml (6 cm Petrischale) bzw. 1,5 ml (3,5 cm Petrischale) der Protoplastensuspension hineinpipettiert.

Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen. Abhängig von der Teilungsfrequenz wurden nach sieben Tagen 3 bzw. 1,5 ml (3,5 cm Petrischale) KF2-Medium (Tab. 3.4) zu der Protoplastensuspension hinzupipettiert und anschließend auf zwei Schalen aufgeteilt, bzw. bei den sich sehr langsam teilenden Genotypen erfolgte die Mediumzugabe einige Tage später. Nach weiteren sieben Tagen wurden erneut 2 bzw. 1 ml KF2-Medium hinzupipettiert, und noch einmal sieben Tage später hatten die Kallusse der gut regenerierenden Genotypen bereits eine Größe erreicht, die es ermöglichte, das Medium fast vollständig mit einer 1000 μ l Mikropipette abzusaugen und gegen 3 bzw. 1,5 ml KF2-Medium auszutauschen. Im wöchentlichen Abstand wurde das Medium gewechselt bis die Kallusse ca. eine Größe von 0,1 bis 1 mm aufwiesen und auf mit Plant Agar (Duchefa) verfestigtes KF2-Medium plattiert werden konnten. Nach zehn bis 14 Tagen auf demselben Medium wurden die Kallusse vereinzelt und subkultiviert.

3.2.4.2 Einbettung in Alginat

Für die Einbettung in Alginat wurde das Protoplastenpellet in einer 0,5 M Mannitollösung in einer Dichte von $3,0 \times 10^5$ Protoplasten/ml aufgenommen und mit demselben Volumen einer 2,1 %igen Na-Alginatlösung (Carl Roth), welche ebenfalls Mannitol (0,44 M, Duchefa) enthielt, vorsichtig gemischt. Von diesem Gemisch wurden ca. 0,7 ml auf CaCl_2 -Agar in 6 cm Petrischalen (0,02 M $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,48 M Mannitol und 8 g Plant-Agar (Duchefa)) ausplattiert. Nach ca. ein bis zwei Stunden polymerisierte das Alginat und bildete einen dünnen Film auf der Oberfläche des CaCl_2 -Agars. Dieser Film, welcher die Protoplasten enthielt, wurde vorsichtig mit einer Wägebipzette abgezogen und in eine Petrischale (6 cm Durchmesser) mit 3,5 ml 8pm7-Medium überführt. Die Petrischale wurde mit Parafilm verschlossen. Das 8pm7-Medium wurde nach fünf Tagen gewechselt und nach weiteren vier Tagen gegen Kallusinduktionsmedium (KF1, Tab. 3.4) und wiederum zehn Tagen gegen Kalluswachstumsmedium (KF2) ausgetauscht. Der Austausch des KF2-Mediums erfolgte

dann im wöchentlichen Wechsel. Nach vier bis fünf Wochen wurden die Alginatfilme mit Kaliumcitrat (0,2 M) aufgelöst. Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium abgesaugt und es wurden 5 ml der Kaliumcitratlösung auf den Alginatfilm pipettiert. Um die Kallusse freizusetzen wurden die Schalen ca. 30 bis 60 min auf dem Kreisschüttler bei 65 Upm geschüttelt. Die Kallusse wurden auf mit Plant-Agar verfestigtes KF2-Medium überführt. Hierzu wurde die Suspension mit einer Pipette aufgenommen und auf das Medium plattiert. Nach 10 min hatten sich die Kallusse auf der Medienoberfläche abgesetzt, so dass die überflüssige Kaliumcitratlösung mit einer 1000 µl Pipette vorsichtig abgesaugt werden konnte. In einigen Fällen, bei sehr wüchsigen Genotypen, musste der Alginatfilm schon früher aufgelöst werden. Nach 10- bis 14tägiger Kultur wurden die Kallusse vereinzelt und subkultiviert.

3.2.4.3 Einfluss der Enzymkonzentration auf die Vitalität von *Petunia*- und *Calibrachoa*- Protoplasten

Der Einfluss der Enzymkonzentration auf die Vitalität der Protoplasten wurde am Beispiel von zwei *Petunia*- (Pt06 und Pt03) und zwei *Calibrachoa*-Genotypen (Ca02 und Ca07) untersucht. In zwei Wiederholungen wurden je Variante (einfache- und doppelte Enzymkonzentration) zwei Schalen (3,5 cm im Durchmesser) kultiviert. Die Protoplasten wurden in flüssigem 8pm7-Medium kultiviert und nach drei Tagen wurde die Vitalität mittels FDA-Färbung (Fluoreszeindiacetat) wie unter 3.2.7 beschrieben bestimmt. Dann wurden die Versuche abgebrochen.

3.2.4.4 Entwicklung von Mesophyllprotoplasten verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*- Genotypen in Flüssigkultur bzw. in Alginat-Kultur

Für die Kultur von Protoplasten wurden unterschiedliche Kultursysteme (siehe 3.2.4.1 und 3.2.4.2) beschrieben. Um zu untersuchen wie sich diese auf die Entwicklung von Mesophyllprotoplasten verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen auswirken, wurden verschiedene Parameter wie z. B. der Protoplastendurchmesser, die Teilungsrate sowie der Einfluss der Kultursysteme auf den Anteil nicht intakter Protoplasten ermittelt. Für den Vergleich zwischen der Alginat- und der Flüssigkultur, wurden je Genotyp in zwei

(*Calibrachoa*) bzw. vier (*Petunia*) Versuchen je Variante zwei Schalen wie unter 3.2.4.1 bzw. 3.2.4.2 beschrieben kultiviert.

3.2.4.5 Entwicklung von Petalenprotoplasten verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*- Genotypen in Flüssigkultur

Ebenso wie die Entwicklung der Mesophyllprotoplasten wurde auch die Entwicklung der Petalenprotoplasten untersucht. Die Kultur erfolgte in mehreren Ansätzen für zwei *Petunia*- (Pt05 und Pt06) und zwei *Calibrachoa*-Genotypen (Ca07 und Ca10). Die Protoplasten wurden in Plastikpetrischalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm in flüssigem 8pm7-Medium wie unter 3.2.4.1 beschrieben kultiviert.

3.2.5 Kalluskultur und Sprossregeneration

Die nach der Flüssig-, bzw. Alginatkultur auf KF2-Medium wachsenden Kallusse wurden bis zu ihrer Überführung auf Sprossregenerationsmedium im Dunkeln bei 24 °C kultiviert. Wenn die Kallusse einen Durchmesser von 0,2 bis 0,3 cm erreicht hatten, wurden sie auf Sprossregenerationsmedium (s. Tab. 3.2) überführt und ebenfalls bei 24 °C, jedoch im Licht kultiviert. In den ersten Tagen bzw. Wochen nach der Überführung vom Dunkel ins Licht wurden die Kallusse mit einem Vlies abgedeckt, um die Lichtintensität zu verringern. Dabei betrug die Lichtintensität unter dem Vlies ca. 23,6 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$. Die aus Kallus regenerierten Sprosse wurden zunächst auf hormonfreies Medium (5.0) überführt und anschließend auf einem mit 0,1 mg / l 2-iP angereicherten Medium (5.3, Tab. 3.5) weiterkultiviert. Die Bewurzelung der Sprosse fand ebenfalls auf diesem Medium statt.

3.2.5.1 Einfluss verschiedener Phytohormone auf die Regeneration von Sprossen an Kallussen aus Mesophyllprotoplasten

In einem Sprossregenerationsversuch wurden verschiedene *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen hinsichtlich ihrer Regenerationsfähigkeit untersucht. Die in dem Versuch verwendeten Medien, welche sich in der Hormonkombination und -konzentration unterschieden, sind in Tabelle 3.5 zu finden. Nach der Flüssig- und Kalluskultur wie unter 3.2.4.1 beschrieben wurden die Kallusse auf die Sprossregenerationsmedien überführt und weiterkultiviert. Die Anzahl der kultivierten Schalen sowie die Anzahl der Kallusse je Schale sind in Tabelle 3.6 zu finden.

Tab. 3.6: Anzahl der kultivierten Schalen sowie die Anzahl der plattierten Kallusse je Schale für die durchgeführten Sprossregenerationsversuche

Genotyp	Medium + Anzahl Schalen je Medium						Anzahl plattierte Kallusse je Schale
	Pet E	Pet G	Pet H	Pet I	Pet J	Pet K	
Pt01	9	6	5	5	5	5	16
Pt03	4	4	5	5	5	5	15
Pt07	7	5	5	7	5	5	14
Pt09	5	6	6	6	6	5	15
Ca02	5	5	5	5	5	5	15
Ca03	5	5	5	5	5	5	15
Ca04	5	5	5	5	5	5	12
Ca06	5	5	5	5	5	5	20
Ca07	5	5	5	5	5	5	15
Ca10	5	5	5	5	5	5	14
Ca11	4	4	4	4	4	4	12
Ca12	5	5	5	5	5	5	12

3.2.5.2 Einfluss verschiedener Phytohormone auf die Regeneration von Sprossen an Kallussen aus Petalenprotoplasten

Ebenso wie die Mesophyllprotoplasten wurden die aus Petalenprotoplasten gewonnenen und wie unter 3.2.4.1 kultivierten Kallusse der Genotypen Pt06, Pt07 und Ca07 hinsichtlich ihrer

Fähigkeit zur Sprossregeneration untersucht. Je Genotyp und Phytohormonkombination wurden mit Ausnahme des Genotyps Pt07, fünf Petrischalen (6,0 cm Durchmesser) mit je 15 Kallussen plattiert. Für Genotyp Pt07 wurden sechs Petrischalen mit je 15 Kallussen plattiert, allerdings nur für die Phytohormonkombinationen 2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA sowie 2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA.

Tab. 3.7: Anzahl der kultivierten Schalen sowie die Anzahl der plattierten Kallusse je Schale für die durchgeführten Sprossregenerationsversuche

Genotyp + Versuche	Medium + Anzahl Schalen je Medium						Anzahl plattierte Kallusse je Schale
	Pet E	Pet G	Pet H	Pet I	Pet J	Pet K	
Pt07 Blüte	0	0	0	6	6	0	15
Pt06 Blüte	5	5	5	5	5	5	15
Ca07 Blüte	5	5	5	5	5	5	15

3.2.6 Charakterisierung der Regenerate aus Protoplasten

3.2.6.1 Überführung ins Gewächshaus und Kultur

Die aus Protoplasten regenerierten Sprosse wurden, nachdem sie bewurzelt waren, ins Gewächshaus überführt. Aus der In-vitro-Kultur kommende Sprosse mussten von anhaftenden Medienresten an den Wurzeln, welche auf Grund des darin enthaltenen Zuckers eine Nahrungsquelle für Pilze darstellen, durch gründliches Waschen in lauwarmem Wasser entfernt werden. Anschließend wurden die Sprosse zur Desinfektion in eine 0,1 %ige Chinosollösung (8-Hydroxychinosol, Sigma) getaucht, in Styroporboxen bzw. R&S-Kisten in Einheitserde P pikiert, und mit einer 0,15 %igen Previkur N-Lösung zum Schutz vor Pilzbefall angegossen. Die Kultur erfolgte bei 22-24 °C im Folientunnel bei nahezu 100 %iger Luftfeuchtigkeit, welche im Verlauf der weiteren Kultur durch zeitweiliges Öffnen des Tunnels nach und nach reduziert wurde. Zwei bis drei Wochen nach dem Pikieren wurden die Pflanzen in Einheitserde T in 8er bzw. 12er Töpfe getopft, je nachdem welche Größe die Pflanzen zum Zeitpunkt des Topfens hatten. Die Düngung mit Flory Mega 3 (0,7 %) erfolgte mit jedem Gießen.

3.2.6.2 Untersuchung der aus Protoplasten regenerierten Pflanzen auf Abweichungen der Ploidiestufe sowie vom Phänotyp der Ausgangspflanzen.

Die Bestimmung der Ploidiestufe der aus Protoplastenkultur gewonnenen und ins Gewächshaus überführten Sprosse der Genotypen Pt07, zum einen aus Mesophyll-, zum anderen aus Petalenprotoplasten regeneriert, sowie Ca10 und Ca12 aus Mesophyllprotoplasten regeneriert, erfolgte durchflusscytometrisch wie unter 2.2.2 beschrieben. Die Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Senula am IPK Gatersleben durchgeführt. Bei dem Gerät handelte es sich wie in den vorangegangenen Untersuchungen (s. Kapitel 2) ebenfalls um ein Durchflusscytometer der Fa. Partec. Jede der zu messenden Proben wurde zusammen mit dem diploiden *Calibrachoa*-Standard Ca10 zusammen aufbereitet und gemessen. Da es sich um eine Vielzahl von Pflanzen (274 Stück) handelte und eine durchflusscytometrische Untersuchung aller Pflanzen zu aufwendig gewesen wäre, wurden die Pflanzen visuell vorselektiert. Selektierte Pflanzen zeichneten sich durch abnormales Wachstum, wie verdickte, fleischige Blätter und Stängel aus. Die Aufbereitung des Probenmaterials für die durchflusscytometrische Untersuchung sowie die Verarbeitung und Darstellung der Daten erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben.

3.2.7 Bonituren, Auswertungen und statistische Verrechnung

Versuch zur Protoplastenausbeute / Enzymlösungsversuche

Die Protoplastenausbeuten wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

Der vollständige Abbau der Zellwände nach der Inkubation in Enzymlösung wurde durch Färbung mit Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28, Sigma) überprüft (GALBRAITH 1981, HAHNE ET AL. 1983). Hierzu wurden 10 µl einer Stammlösung (10 mg Calcofluor White wurden in 10 ml H₂O gelöst) zu 1 ml der Protoplastensuspension hinzupipettiert und nach 10 min bei 65 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Protoplasten in flüssigem Kulturmedium suspendiert, und unter einem Zeiss Axioskop bei 200- bzw. 800facher Vergrößerung betrachtet (Filterkombination BP 440-405, FT 455 und LP 440, AHF Analystechnik AG).

Bestimmung der Vitalität

Die Bestimmung der Vitalität der Protoplasten erfolgte nach WIDHOLM (1972) mittels FDA-Färbung (Fluoreszeindiacetat). Ca. 0,1 ml der zu untersuchenden Probe wurden auf einem Objektträger mit einem Tropfen (ca. 5 bis 10 µl) einer 0,025 %igen FDA-Lösung (FDA in DMSO, Roth, gelöst) gemischt. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurde die Probe unter einem Zeiss Axioskop mit der Filterkombinationen BP 450-490, FT 510 und LP 520 (Zeiss) bei 100facher Vergrößerung betrachtet und in fünf Gesichtsfeldern die Anzahl der fluoreszierenden, sowie der nicht fluoreszierenden Protoplasten ermittelt. Die Vitalität wurde nach der folgenden Formel berechnet:

Anzahl fluoreszierender Protoplasten / Anzahl Protoplasten gesamt * 100.

Versuche zur Kultur der Protoplasten

Die Teilungsfrequenzen wurden nach drei, fünf und sieben Tagen, bzw. bei einigen der in Alginate eingebetteten Protoplasten auch noch nach 16 Tagen, ermittelt. Für die übrigen Genotypen wurden ebenfalls Teilungsfrequenzen nach fünf- bzw. neuntägiger Kultur ermittelt.

Die Teilungsfrequenz wurde nach der folgenden Formel berechnet:

Teilungsfrequenz = Anzahl geteilte Protoplasten/Anzahl Protoplasten gesamt * 100,

Die Berechnung des Anteils der intakten Protoplasten (s. Anhang Abb. A1 und A2) erfolgte ebenfalls nach dieser Formel.

Für die Bestimmung des Protoplastendurchmessers wurden je Genotyp/Variante unter einem Inversmikroskop (Zeiss) bei 320facher Vergrößerung mit Hilfe eines Messokulars in zwei, bzw. bei den *Petunia* Genotypen, in drei Versuchen je 100 Protoplasten in verschiedenen Gesichtsfeldern gezählt und aus diesen Werten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Sprossregenerationsversuche

Die Sprossregenerationsraten wurden nach achtwöchiger Kultur nach der folgenden Formel berechnet:

Sprossregeneration = Anzahl Kallusse mit Spross/Anzahl plattierter Kallusse * 100

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der unter <http://cran.at.r-project.org/> frei erhältlichen Statistik-Programm R durchgeführt. Die statistische Analyse der für den Vergleich der Kultursysteme erhobenen Daten für die verschiedenen *Calibrachoa*- und *Petunia*-Genotypen erfolgte nach Tukey bei $p = 0,05$. Die statistische Verrechnung der für die Sprossregeneration erhobenen Daten für *Petunia* und *Calibrachoa* erfolgte mittels eines Paarweisen t-Tests bei $p = 0,05$. Auf Grund der Datenlage war nur bei diesen Versuchen eine statistische Verrechnung möglich.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Isolierung der Protoplasten

3.3.1.1 Isolierung von Mesophyllprotoplasten verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen

Aus allen Genotypen konnten erfolgreich Mesophyllprotoplasten isoliert werden. Für die Isolierung der Protoplasten wurde zunächst eine Enzymlösung mit 0,3 % Macerozyme und 1,0 % Cellulase verwendet. Dabei variierte die Protoplastenausbeute der *Calibrachoa*-Genotypen im Mittel zwischen 0,4 und 1,5 (Abb. 3.2), die der *Petunia*-Genotypen zwischen 0,3 und 2,0 x 10⁶ Protoplasten/g Frischmasse (Abb. 3.3). Da diese Ausbeuten im Hinblick auf eine anschließende Fusion nicht zufriedenstellend waren, wurde die Menge an Macerozyme und Cellulase verdoppelt (0,6 % Macerozyme und 2,0 % Cellulase). Dies führte mit einer Ausnahme (Pt05) bei allen Genotypen zu einer Steigerung der Protoplastenausbeute, bei den Genotypen Ca03 und Pt01 sogar um mehr als das vier bis fünffache. Die Protoplastenausbeuten der *Calibrachoa*-Genotypen variierten nach der Verdopplung der Konzentration im Mittel zwischen 1,1 und 4,2 (Abb. 3.2), die der *Petunia*-Genotypen zwischen 0,6 und 3,5 (Abb. 3.3) x 10⁶ Protoplasten/g Frischmasse.

Die Menge an isolierten Protoplasten schwankte zwischen den einzelnen Versuchen und Ansätzen zum Teil beträchtlich wie aus den Abbildung 3.2 und 3.3, sieht man sich die z. T. sehr starken Standardabweichungen an (Ca02, Ca03 und P04), ersichtlich wird. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen waren dabei größer als der Unterschied zwischen den beiden Arten. Einige Genotypen wie z. B. die Genotypen Ca10 und Pt06 wiesen auch bei einer hohen Anzahl an Isolierungen (25 und 18) nur geringe Schwankungen in der Protoplastenausbeute auf.

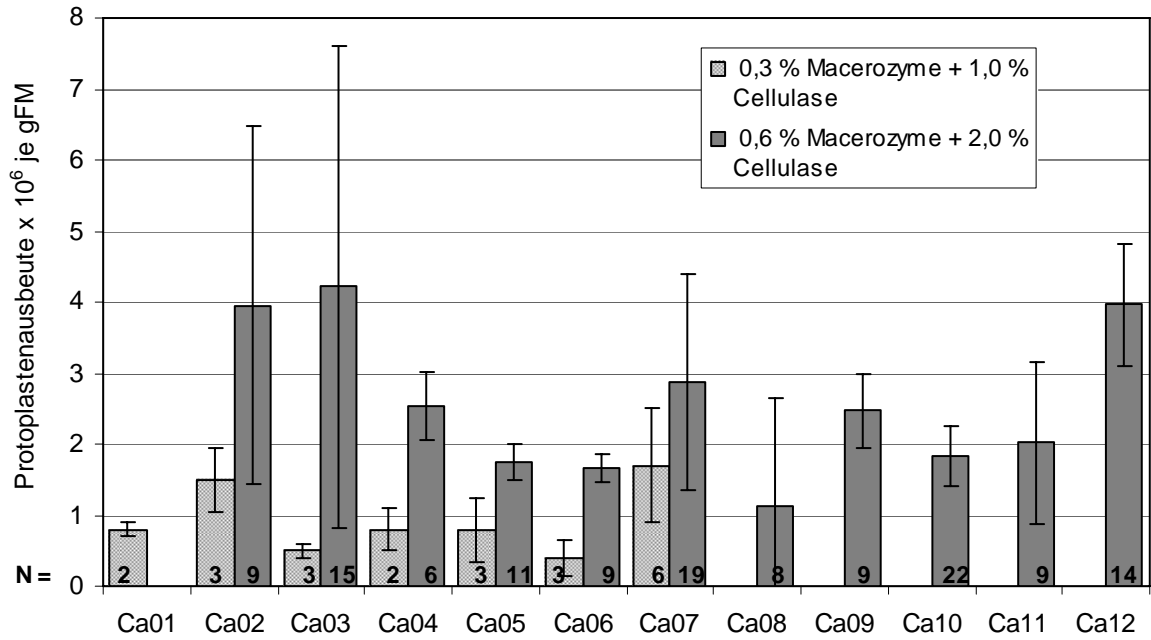


Abb. 3.2: Protoplastenausbeuten für verschiedene *Calibrachoa*-Genotypen in Abhängigkeit der Konzentration von Macerozyme und Cellulase. (dargestellt sind die Mittelwerte aus N Wiederholungen sowie die Standardabweichungen).

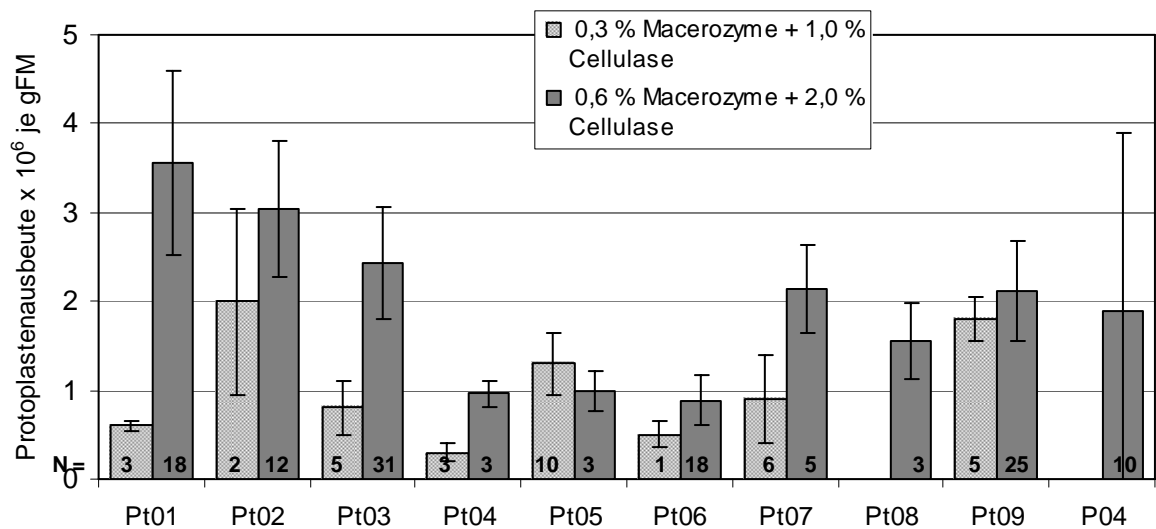


Abb. 3.3: Protoplastenausbeuten für verschiedene *Petunia*-Genotypen in Abhängigkeit der Konzentration von Macerozyme und Cellulase. (dargestellt sind die Mittelwerte aus N Wiederholungen sowie die Standardabweichungen).

Eine Erhöhung der Enzymkonzentration wirkte sich nicht negativ auf die Vitalität der Protoplasten aus, wie die Überprüfung mittels FDA-Färbung drei Tage nach der Isolierung, zeigte (Abb. 3.4).

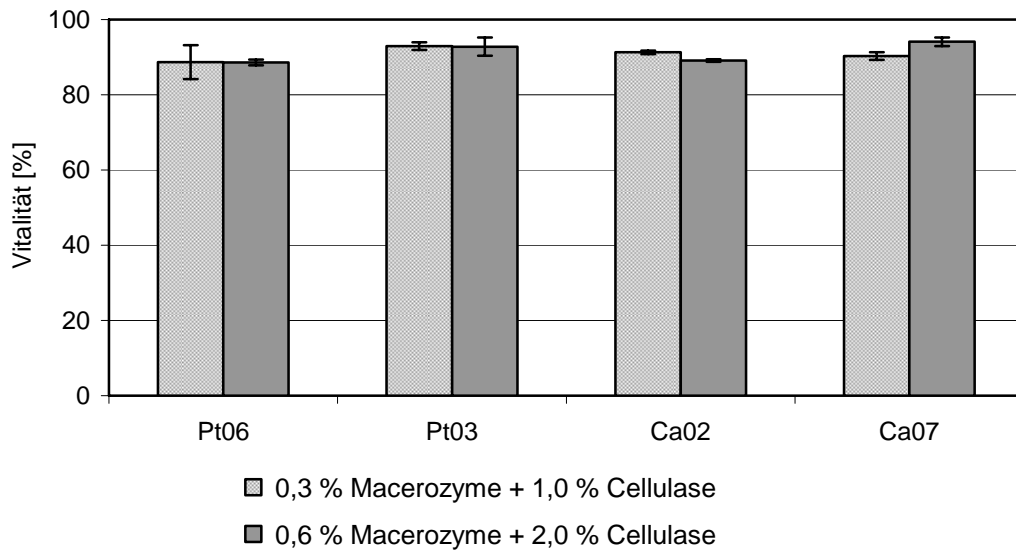


Abb. 3.4: Einfluss der Enzymkonzentration auf die Vitalität von *Petunia*- und *Calibrachoa*-Mesophyllprotoplasten drei Tage nach der Isolierung. (dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Wiederholungen, s. 3.2.4.3 sowie die Standardabweichungen).

3.3.1.2 Isolierung von Petalenprotoplasten aus verschiedenen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen

Aus den Petalen verschiedener *Calibrachoa*- und *Petunia*-Genotypen ließen sich ebenfalls Protoplasten in ausreichender Menge isolieren, wobei es auch hier starke Schwankungen in der Protoplastenausbeute zwischen den einzelnen Experimenten, den Ansätzen sowie den verschiedenen Genotypen gab (Abb. 3.5). Für eine hohe Ausbeute war es wichtig, dass für die Isolierung nur Blüten verwendet wurden, die sich kurz zuvor geöffnet hatten. Blüten, die länger geöffnet waren, bzw. bereits leichte Farbveränderungen zeigten, verloren nach der Sterilisation in NaOCl ihre Farbe, das Gewebe wurde zersetzt und konnte somit nicht mehr verwendet werden.

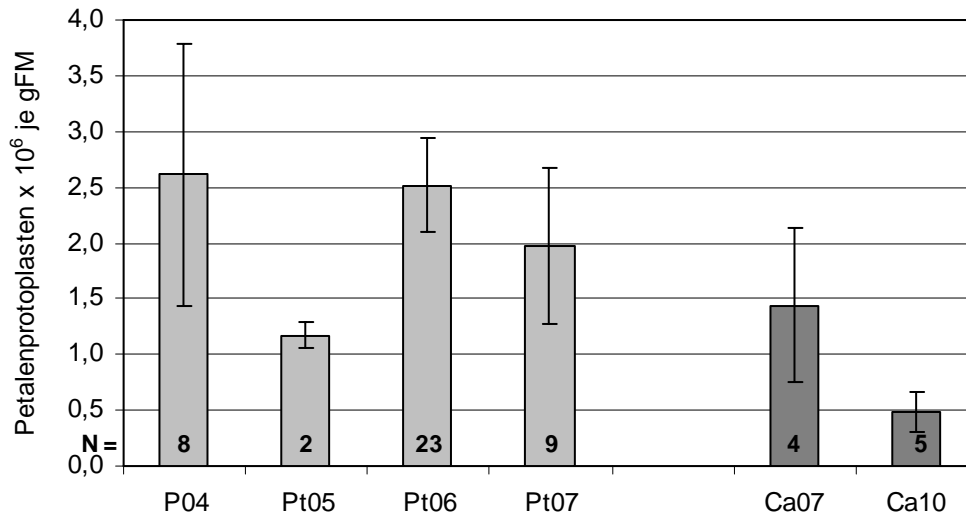


Abb. 3.5: Protoplastenausbeute für vier *Petunia*- und zwei *Calibrachoa*-Genotypen (0,6 % Macerozyme und 2,0 % Cellulase) bei Isolierung aus Petalen. (dargestellt sind die Mittelwerte aus N Wiederholungen sowie die Standardabweichungen).

3.3.2 Protoplastenkultur und Sprossregeneration

3.3.2.1 Entwicklung von Mesophyllprotoplasten sowie der Vergleich der beiden

Kultursysteme: Flüssigkultur bzw. in Alginat

Zu Beginn der Versuche enthielt die für die Isolation der Mesophyllprotoplasten verwendete Enzymlösung 0,3 % Macerozyme und 1 % Cellulase. Zudem wurden die Protoplasten nach der Isolierung wie unter 3.2.4.2 beschrieben in Alginat eingebettet kultiviert. Die Teilungsfrequenz wurde nach fünf- bzw. neuntägiger Kultur bestimmt. Mit Ausnahme eines Genotyps (Ca01) konnte bei allen zur Verfügung stehenden Genotypen eine Teilung der Protoplasten beobachtet werden (Daten nicht dargestellt). Ein Teil dieser Ansätze wurde bis zum Mikrokallus bzw. Kallus weiterkultiviert. Im weiteren Verlauf wurden sowohl die Enzymkonzentration sowie das Kultursystem, die Protoplasten wurden fortan in flüssigem Medium kultiviert, verändert. Dies hatte eine Neubestimmung der Teilungsraten sowie den Vergleich der beiden Kultursysteme Flüssigkultur und Alginatkultur zur Folge. Dabei zeigte sich, dass die Durchmesser, welche 0, 1 und 2 Tage nach der Isolierung bestimmt wurden, bei allen untersuchten Genotypen in den in Alginat kultivierten Varianten über denen der in flüssigem Medium kultivierten Protoplasten lagen (Abb. 3.6). Innerhalb

eines Genotyps variierten die gemessenen Durchmesser stark. Die Teilungsraten wurden jeweils nach drei-, fünf- und siebentägiger Kultur ermittelt. Bei den *Petunia*-Genotypen konnte bereits nach dreitägiger Kultur die Teilung von Zellen bei allen vier untersuchten Genotypen beobachtet werden (Abb. 3.8). Bei einigen der *Calibrachoa*-Genotypen, wie zum Beispiel Genotyp Ca07, setzte die Teilung dagegen erst später ein (Abb. 3.7).

Um zu überprüfen, welchen Einfluss das Kulturverfahren auf die Entwicklung der Protoplasten hat, wurden die beiden Kultursysteme, Kultur der Protoplasten in Alginat eingebettet und Kultur der Protoplasten in Flüssigkultur, miteinander verglichen, indem die Teilungsfrequenzen für sieben *Calibrachoa*- und vier *Petunia*-Genotypen nach drei, fünf und sieben Tagen ermittelt wurden (Abb. 3.7 und 3.8). In beiden Versuchen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturverfahren nach siebentägiger Kultur festgestellt werden (Abb. 3.7 und 3.8, schwarze Buchstaben). Eine statistische Verrechnung der Daten nach drei bzw. fünf Tagen war auf Grund der verschiedenen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren nicht möglich. Bei *Calibrachoa* war besonders auffällig, dass die Wildarten (*Calibrachoa parviflora*, die Genotypen Ca06 und Ca04) sowie der Genotyp Ca03, der diesen morphologisch sehr ähnelt, im Gegensatz zu den züchterisch bearbeiteten Genotypen (Ca07, Ca10, Ca11 und Ca12) signifikant höhere Teilungsraten nach siebentägiger Kultur (unabhängig vom Kulturverfahren) aufwiesen (Abb. 3.7, rote Buchstaben). Im Gegensatz zu den untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen wiesen die untersuchten *Petunia*-Genotypen hinsichtlich der Teilungsraten nach sieben Tagen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 3.8). Nach 16tägiger Kultur wurde wie zu erwarten ein weiterer Anstieg der Teilungsrate bei den in Alginat eingebetteten Genotypen beobachtet (Daten nicht dargestellt). Da sich die in flüssigem Medium kultivierten Protoplasten bereits nach siebentägiger Kultur zu Aggregaten zusammengelagert hatten, war hier eine Bestimmung der Teilungsrate zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr möglich. Der Anteil nicht intakter Protoplasten war deutlich höher, wenn die Protoplasten in Alginat eingebettet waren (s. Anhang Abb. A1 und A2). Aus allen Ansätzen konnten Kallusse regeneriert werden.

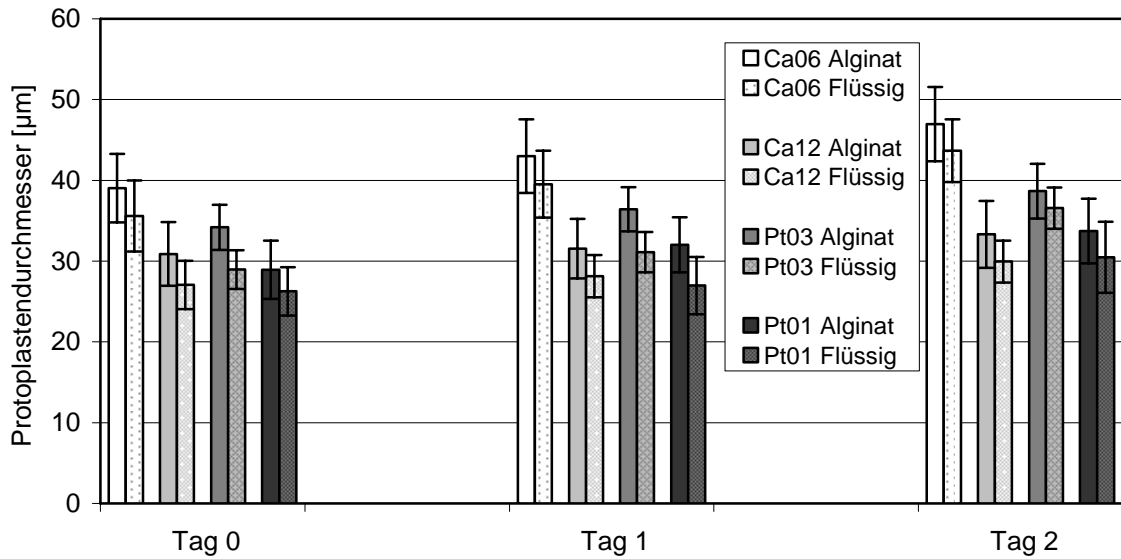


Abb. 3.6: Vergleich der Durchmesser von in Alginat eingebetteten und in Flüssigmedium kultivierten Protoplasten am Beispiel von zwei *Petunia*- und zwei *Calibrachoa*-Genotypen. (Dargestellt sind die Mittelwerte aus N Wiederholungen s. 3.2.4.5 sowie die Standardabweichungen)

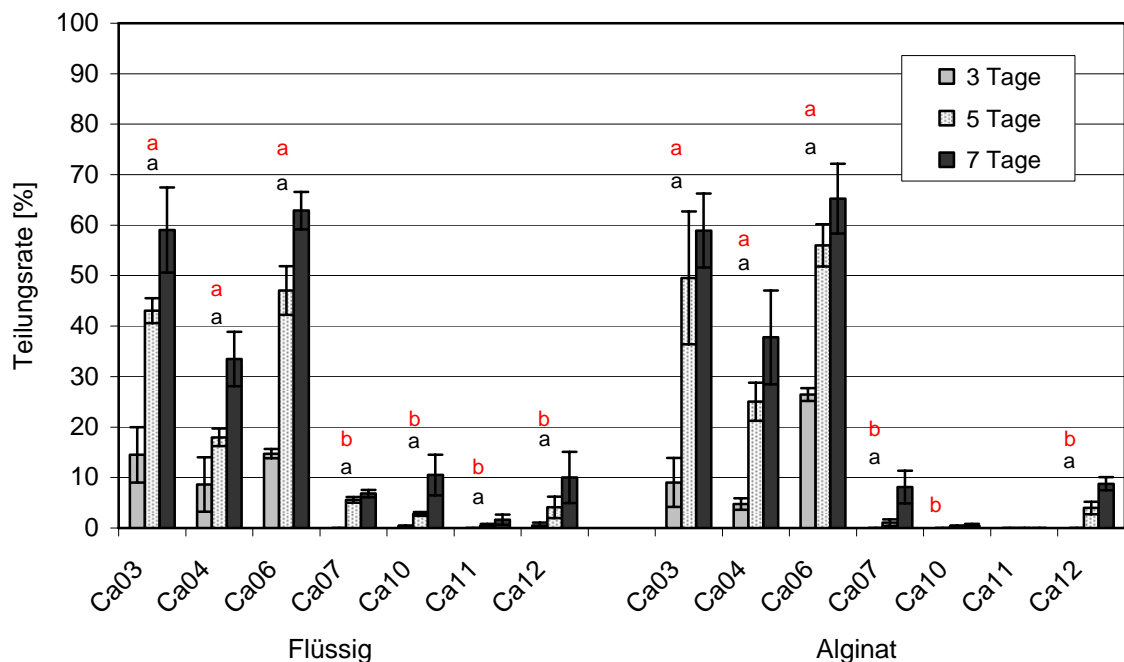


Abb. 3.7: Vergleich der Kultursysteme: Kultur von Mesophyllprotoplasten in Alginat eingebettet bzw. Kultur in Flüssigmedium verschiedener *Calibrachoa*-Genotypen. (Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen, schwarze Buchstaben ermöglichen den Vergleich der beiden Kultursysteme jeweils für einen Genotypen, während rote Buchstaben den Vergleich zwischen Genotypen innerhalb des Kultursystems bezeichnen. Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nach Tukey-Test bei $p = 0,05$ nicht signifikant voneinander)

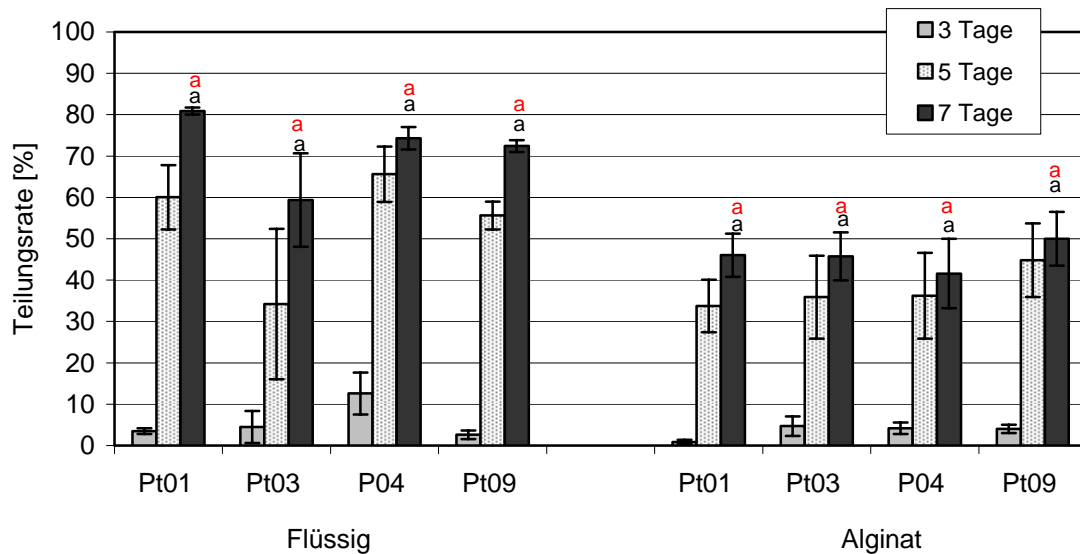


Abb. 3.8: Vergleich der Kultursysteme: Kultur von Mesophyllprotoplasten in Alginat eingebettet bzw. Kultur in Flüssigmedium verschiedener *Petunia*-Genotypen. (Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus vier Wiederholungen, schwarze Buchstaben ermöglichen den Vergleich der beiden Kultursysteme jeweils für einen Genotypen, während rote Buchstaben den Vergleich zwischen Genotypen innerhalb des Kultursystems bezeichnen. Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nach dem Tukey-Test bei $p = 0,05$ nicht signifikant voneinander)

3.3.2.2 Ermittlung der Teilungsraten von Petalenprotoplasten von zwei *Petunia*- und zwei *Calibrachoa*-Genotypen

Ebenso wie für die Mesophyllprotoplasten wurden die Teilungsraten für Petalenprotoplasten, welche aus zwei *Petunia*- und zwei *Calibrachoa*-Genotypen gewonnen wurden, nach drei, fünf und sieben Tagen (Abb. 3.9) ermittelt. Auch hier waren die Teilungsraten für die einzelnen Genotypen sehr unterschiedlich. Im Gegensatz zu den aus *Petunia*-Blättern isolierten Protoplasten teilten sich die aus Petalen isolierten Protoplasten langsamer. Die Teilungsrate für die aus Petalen isolierten Protoplasten des Genotyps Ca10 lag jedoch deutlich höher als die Teilungsrate der Mesophyllprotoplasten (Abb. 3.9).

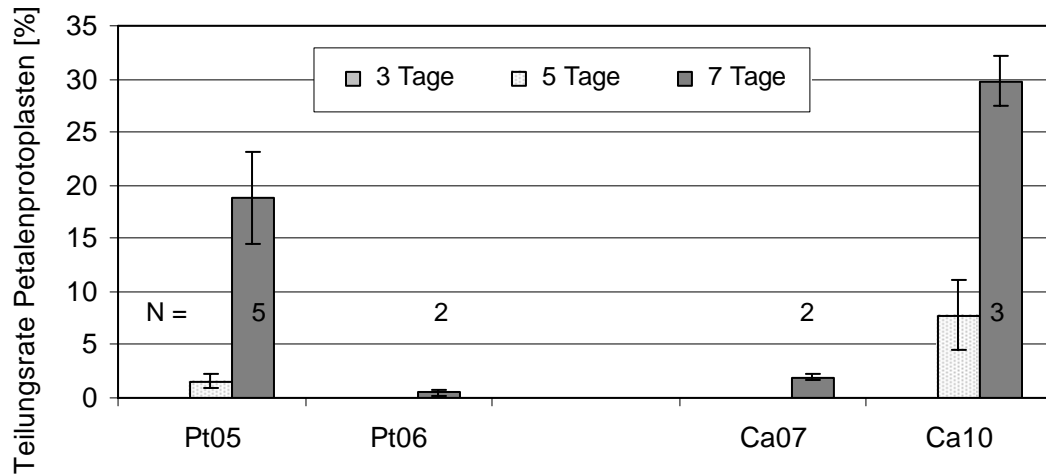


Abb. 3.9: Bestimmung der Teilungsraten für Petalenprotoplasten von zwei *Petunia*- und zwei *Calibrachoa*-Genotypen nach drei-, fünf- und siebentägiger Kultur. (Dargestellt sind die Mittelwerte aus N Wiederholungen sowie die Standardabweichungen)

3.3.2.3 Einfluss verschiedener Phytohormone auf die Regeneration von Sprossen

Anhand des *Petunia*-Genotypen Pt09 sollte zunächst der Einfluss von BAP auf das Kalluswachstum untersucht werden. Dabei konnte kein Unterschied zwischen zwei unterschiedlichen Medien, welche 2,0 mg/l IAA und 0,5 mg/l BAP bzw. 1,0 mg/l BAP enthielten, festgestellt werden. Jedoch konnte nach kurzer Zeit die Regeneration von Sprossen auf diesen Medien beobachtet werden. Auch in Bezug auf die Sprossregeneration gab es keinen Unterschied zwischen den Medien. Die Sprossregenerationsrate lag bei beiden Varianten im Bereich von 30 % nach sechs Wochen. Drei weitere *Petunia*-Genotypen sowie der bereits untersuchte Genotyp Pt09 und ein *Calibrachoa*-Genotyp wurden daraufhin untersucht. Da kein Unterschied zwischen den Medien festgestellt worden war, wurden die Kallusse dieser fünf Genotypen auf das mit 2,0 mg/l IAA und 1,0 mg/l BAP angereicherte Medium plattiert. Die Regeneration von Sprossen konnte allerdings nur bei drei der vier *Petunia*-Genotypen sowie dem *Calibrachoa*-Genotypen beobachtet werden. Zudem wurde bei Genotyp Pt01 anstelle der Regeneration von Sprossen ein starkes Wurzelwachstum (siehe Abb. 3.10) beobachtet.

Aus diesem Grund wurden weitere Phytohormonkombinationen, welche, im Gegensatz zu den zuvor getesteten Medien, jedoch Cytokinin-betont waren, an vier *Petunia*- und acht *Calibrachoa*-Genotypen getestet. Dabei stellte sich heraus, dass es sowohl zwischen den

einzelnen Genotypen als auch zwischen den Hormonkombinationen ebenfalls beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Regeneration von Sprossen gab wie aus den Abbildungen 3.11 und 3.12 hervorgeht. Nur fünf der neun untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen regenerierten Sprosse. Die höchste Sprossregenerationsrate mit über 80 % wurde dabei auf einem Medium, welches 1,0 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA enthielt, für Genotyp Ca11 erzielt. (Abb. 3.11). Die höchste Regenerationsrate für zwei der *Petunia*-Genotypen ließ sich dagegen erzielen, wenn dem Medium 1,0 mg/l TDZ und 0,1 mg/l IAA zugegeben wurde (Abb. 3.12). Allerdings wurde bei dieser Hormonkombination eine hohe Anzahl hyperhydriert Sprosse beobachtet. Wurden die Sprosse auf hormonfreies Sprosswachstumsmedium (5.0 s. Tab. 3.5) überführt, entwickelten sie sich jedoch normal weiter. Der Genotyp Pt09 zeigte in diesem Versuch kein Sprosswachstum. Demgegenüber wies Genotyp Pt03 die höchste Sprossregenerationsrate auf, wenn das Medium 1,0 mg/l Zeatin enthielt (Abb. 3.12 bzw. 3.13). Eine Übersicht über alle durchgeführten Versuche zur Sprossregeneration befindet ist im Anhang (Tab. A.6)

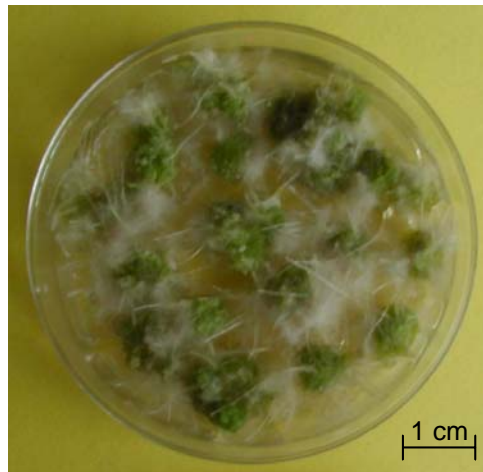


Abb. 3.10: Kallusse von Genotyp Pt01 nach achtwöchiger Kultur auf Sprossregenerationsmedium (2,0 mg/l IAA und 1,0 mg/l BAP).

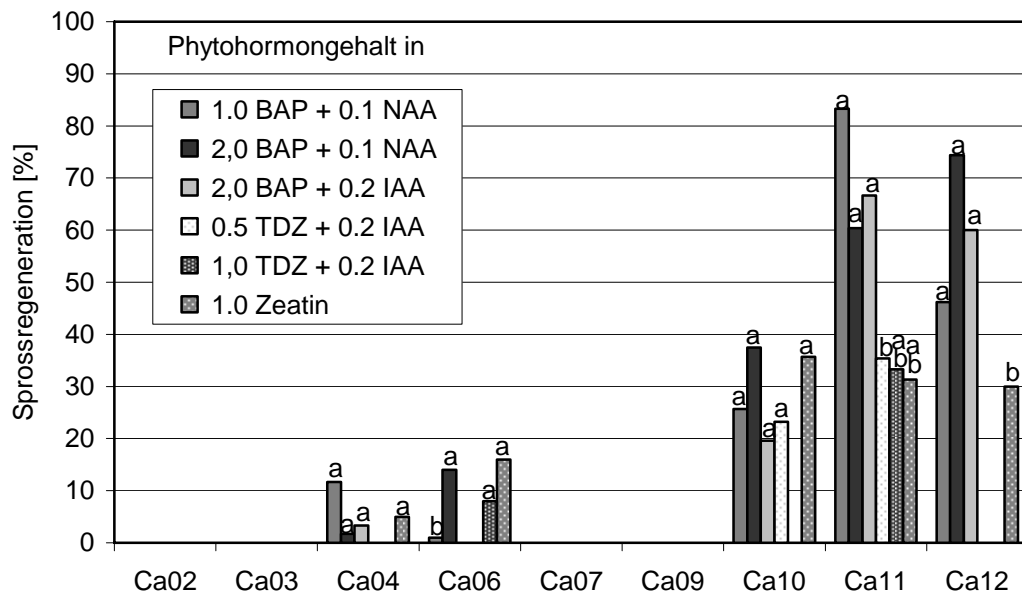


Abb. 3.11: Sprossregeneration von verschiedenen *Calibrachoa*-Genotypen auf Medien mit unterschiedlichen Phytohormongehalten nach achtwöchiger Kultur (Dargestellt sind die Mittelwerte aus N Wiederholungen, s. Tab. 3.6, Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nach dem Paarweisen t-Test bei $p = 0,05$ innerhalb eines Genotyps nicht signifikant voneinander).

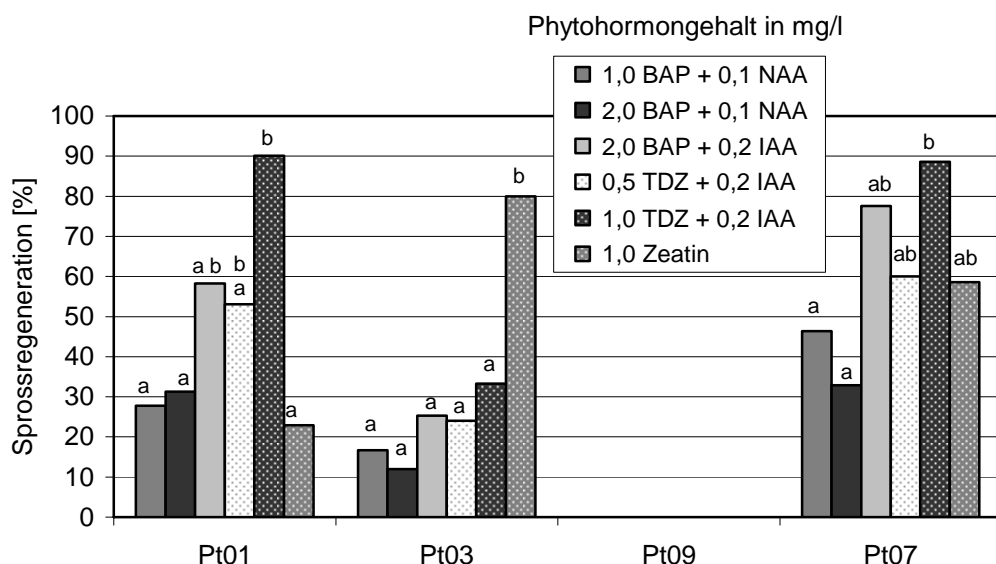


Abb. 3.12: Sprossregeneration von vier *Petunia*-Genotypen auf Medien mit unterschiedlichen Phytohormongehalten nach achtwöchiger Kultur (Dargestellt sind die Mittelwerte aus N Wiederholungen, s. Tab. 3.6, Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nach dem Paarweisen t-Test bei $p = 0,05$ innerhalb eines Genotyps nicht signifikant voneinander).

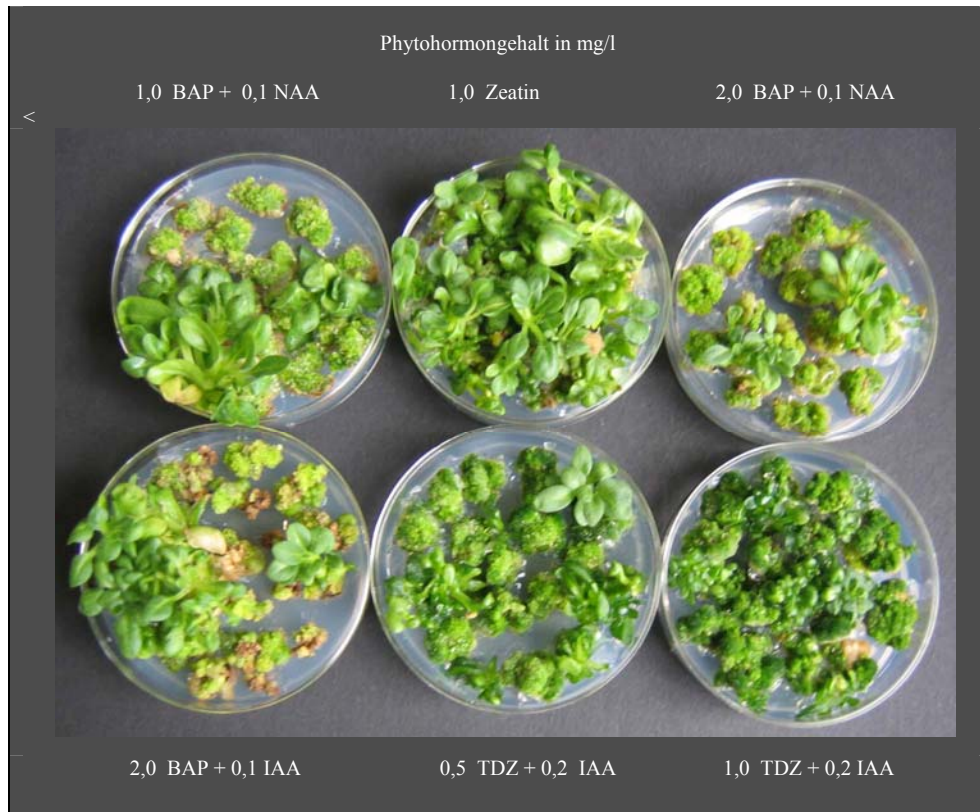


Abb. 3.13: Kallusse des *Petunia*-Genotyps Pt03 aus Protoplasten nach achtwöchiger Kultur auf Medien mit unterschiedlichen Phytohormonkombinationen.

3.3.2.4 Einfluss verschiedener Phytohormone auf die Regeneration von Sprossen an Kallussen aus Petalenprotoplasten

Ebenso wie bei den Kallussen, die aus Mesophyllprotoplasten hervorgegangen waren, wurde auch bei den aus Petalenprotoplasten gewonnenen Kallussen des Genotyps Ca07 keine Sprossregeneration beobachtet. Dagegen konnten bei den zwei untersuchten *Petunia*-Genotypen Sprosse regeneriert werden (Tab. 3.8). Hier zeigten sich starke Unterschiede in Bezug auf die Hormonkombination zwischen den beiden untersuchten Genotypen. Während in diesem Versuch bei Genotyp Pt06 die höchste Sprossregenerationsrate bei Zugabe von 1,0 mg/l TDZ + 0,2 mg/l IAA auftrat, wurde für Genotyp Pt07 die höchste Regenerationsrate auf einem Medium mit 2,0 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA erzielt. Allerdings wurden bei Pt07, wie Tabelle 3.7 zu entnehmen ist, nur die Hormonkombinationen 2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA und 2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA untersucht.

3.3.3 Charakterisierung der Regenerate aus Protoplasten

3.3.3.1 Überführung ins Gewächshaus

Insgesamt wurden 280 Pflanzen ins Gewächshaus überführt. Die in Erde zu pikierenden In-vitro-Pflanzen hatten eine Sprosslänge von ca. 5-6 cm (*Petunia*) und 8-10 cm (*Calibrachoa*). In der Regel konnten kaum Ausfälle bei der Anpassung der Pflanzen an die Gewächshausbedingungen beobachtet werden. Eine Ausnahme bildeten einige stark polyploid aussehende *Petunia*-Sprosse. In Tabelle 3.9 sind die Überföhrungsraten für die verschiedenen Genotypen dargestellt. Alle Pflanzen konnten zur Blüte gebracht werden.

Tab. 3.9: Erfolg bei der Überföhrung der aus Protoplasten regenerierten Pflanzen ins Gewächshaus

Genotyp	Anzahl pikierter Pflanzen	Anzahl erfolgreich ins Gewächshaus überföhrter Pflanzen	Überföhrungsrate [%]
Pt07	85	84	99
Pt07 (Petalen)	70	68	97
Ca10	55	53	96
Ca12	70	69	99



Abb. 3.15: Aus Protoplasten regenerierte und erfolgreich ins Gewächshaus überföhrte *Petunia*- Pflanzen (Genotyp Pt07), zehn Wochen nach der Überföhrung ins Gewächshaus.

3.3.3.2 Untersuchung der aus Protoplasten regenerierten Pflanzen auf Abweichungen vom Phänotyp der Ausgangspflanzen.

Chlorophylldefekte

2,3 % (siehe Tab. 3.10) der ins Gewächshaus überführten Pflanzen des Genotyps Pt07 wiesen Chlorophylldefekte, wie sie in Abbildung 4.2 zu sehen sind, auf. Dabei wiesen einige Blätter eine vollständige Weiß- bzw. Grünfärbung auf. Andere waren dagegen panaschiert (Abb. 3.16). Auch nach mehrmonatiger Kultur blieben diese Veränderungen stabil erhalten.

Tab. 3.10: Anteil der Pflanzen aus Protoplastenkultur mit Chlorophylldefekten

Genotyp	Anzahl erfolgreich ins Gewächshaus überführter Pflanzen	Häufigkeit der Pflanzen mit Chlorophylldefekten [%]
Pt07	84	2,3
Pt07 (Blüte)	68	0
Ca10	53	0
Ca12	69	0



Abb. 3.16: Chlorophylldefekte an Regeneraten aus Protoplastenkultur (*Petunia*-Genotyp Pt07).

Durchflusscytometrische Untersuchung der aus Protoplasten regenerierten Pflanzen mit morphologischen Veränderungen.

Auf Grund der hohen Pflanzenanzahl wurden die Pflanzen nach viermonatiger Kultur zunächst visuell bonitiert und alle Pflanzen mit morphologischen Auffälligkeiten wie verdickte Blätter, Stängel etc. durchflusscytometrisch untersucht (Abb. 3.17). Neben diesen Pflanzen wurden zur Kontrolle je Genotyp mehrere Pflanzen untersucht, die mit dem Phänotyp der Ausgangspflanzen übereinstimmten. Bei den untersuchten *Calibrachoa*-Pflanzen handelte es sich bei allen selektierten Pflanzen um polyploide Pflanzen. Der Anteil der Pflanzen mit veränderter Ploidiezahl betrug 7,5 bzw. 5,8 % (Tab. 3.11). Hier gab es eine gute Übereinstimmung zwischen den morphologischen Auffälligkeiten und der Ploidiezahl. Bei den untersuchten *Petunia*-Pflanzen war dies hingegen nicht der Fall. Da die untersuchten *Petunia*-Genotypen im Gegensatz zu diploiden *Petunia*-Pflanzen auf Grund ihres tetraploiden Chromosomensatzes dickere Blätter und Stängel aufwiesen (Abb. 3.17 a u. b), erwies sich die visuelle Selektion der Pflanzen als wesentlich schwieriger. Mehrere der als morphologisch auffällig eingestuft Pflanzen wiesen den tetraploiden Ausgangschromosomensatz auf. Die Anzahl der Pflanzen mit veränderter Ploidiezahl war jedoch mit 2,3 bzw. 0 % geringer als die der untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Anzahl polyploider Regenerate aus Protoplasten

Genotyp	Anzahl bonitierter Pflanzen	Pflanzen, die visuell morphologische Veränderungen aufwiesen	Durchflusscytometrisch untersuchte Pflanzen	Pflanzen mit veränderter Ploidiezahl	Häufigkeit der Pflanzen mit veränderter Ploidiezahl [%]
Pt07	84	5	27	2 (1 x hexaploid, 1 x diploid)	2,3
Pt07 (Blüte)	68	3	6	0	0
Ca10	53	4	5	4 (3 x tetraploid, 1 x hexaploid)	7,5
Ca12	69	4	5	4 (3 x tetraploid, 1 x hexaploid)	5,8



Abb. 3.17: Bild a, b und d sind Beispiele für morphologisch abweichende Pflanzen regeneriert aus Protoplasten, im Vergleich zum Ausgangsphänotyp, Bild c und e. (a-c: *Petunia*-Genotyp Pt07, d-e *Calibrachoa*-Genotyp Ca10)

3.4 Diskussion

Isolierung und Reinigung der Protoplasten

Protoplasten von *Petunia* wurden bereits aus einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe wie Petalen (OH UND KIM 1994), Eizellen (POTRYKUS 1971), Mesophyllgewebe (TAGUCHI ET AL. 1993) sowie Pollen (BAJAJ UND DAVEY, 1974) isoliert. Durchgesetzt hat sich die Isolierung von *Petunia*-Protoplasten aus Mesophyllgewebe. Für *Calibrachoa*-Protoplasten wurde ebenfalls die Isolierung aus Kallus (POWER ET AL. 1980) bzw. Suspensionskulturen (FORD-LOGAN UND SINK 1988) sowie Mesophyllgewebe beschrieben.

Ausgehend von bereits bestehenden Protokollen zur Isolierung von *Petunia*- (BINDING 1974, HAYWARD UND POWER 1975) und *Calibrachoa*-Protoplasten (SINK UND POWER 1977, FORD-LOGAN UND SINK 1988), wurden die Protoplasten aus Mesophyllgewebe isoliert. Im Gegensatz zu den diversen Veröffentlichungen stammten diese jedoch nicht aus im Gewächshaus kultivierten Pflanzen sondern aus der In-vitro-Kultur. Das Protokoll zur Isolierung der Protoplasten wurde weitestgehend von WINKELMANN (1994) übernommen. Das Protokoll entspricht den allgemein angewandten Verfahren zur Isolierung von Protoplasten. Für die Isolierung der Protoplasten in großen Mengen und deren Qualität ist die Verwendung einer präplasmolytischen Lösung, sowie die Inkubation des Pflanzenmaterials in Enzymlösung von entscheidender Bedeutung. Laut FREARSON ET AL. (1973) wird die Anzahl der Zellen, die mehr als einen Zellkern enthalten, durch die Inkubation des Pflanzenmaterials in einer präplasmolytischen Lösung, welche vor der Inkubation des Pflanzenmaterials in der Enzymlösung erfolgt, reduziert. COCKING (1960) gelang es erstmals, große Mengen an Protoplasten durch die Verwendung einer cellulasehaltigen Lösung zu isolieren. Die für die Isolierung von *Petunia*- und *Calibrachoa*-Protoplasten in der Literatur angegebenen Enzyme und Konzentrationen variieren jedoch stark. Neben Cellulase und Macerozyme finden auch Driselase (ein Gemisch aus Cellulase, Pektinase, Xylanase und Mannanase) sowie Meicelase und Rhozyme (POWER ET AL. 1979 und 1980) Verwendung.

Wie in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (SHILLITO ET AL. 1983, YE UND EARLE 1991) erfolgte die Reinigung bzw. Isolierung der intakten Protoplasten durch Zentrifugation auf einem Saccharose-Gradienten und erwies sich als sehr effektiv. Der Verbleib von Protoplasten im Pellet zusammen mit Zellen und Zellbruchstücken nach dem Zentrifugieren wurde nicht beobachtet.

Protoplastenausbeuten

Aus allen untersuchten *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen konnten Protoplasten aus dem Mesophyllgewebe isoliert werden. Die für die Isolierung von *Petunia*- und *Calibrachoa*-Protoplasten angegebenen Enzymkonzentrationen und -zusammensetzungen sind vielfältig (POWER ET AL. 1980, MULLER ET AL. 1983, TAGUCHI ET AL. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden die Protoplasten mit Hilfe von Cellulase und Macerozyme isoliert.

Die Inkubationszeit des Pflanzenmaterials in der Enzymlösung betrug ca. 15 Stunden und erfolgte über Nacht. Eine Inkubationszeit von vier Stunden wie bei OH UND KIM (1994) für *Petunia*-Petalenprotoplasten beschrieben, führte bei Mesophyllgewebe zu geringen Ausbeuten. Da das Schneiden der Blattstücke mit bis zu vier Stunden sehr zeitintensiv war, und eine ein- bis zweistündige Inkubation in der Präplasmolyselösung folgte, erwies sich die Inkubation über Nacht wie von HAYWARD UND POWER (1975) sowie RENAUDIN ET AL. (1990) beschrieben als am besten geeignet. Durch die Verdoppelung der Ausgangskonzentration von 0,3 % Macerozyme und 1 % Cellulase auf 0,6 % Macerozyme und 2 % Cellulase konnte die Protoplastenausbeute in den durchgeführten Isolierungen gesteigert, zum Teil sogar verfünffacht werden und damit Ausbeuten von bis zu $4,2 \times 10^6$ (*Calibrachoa*-Genotyp Ca03) bzw. $3,6 \times 10^6$ (*Petunia*-Genotyp Pt01) erzielt werden (Abb.3.2 und 3.3). Die für die Isolierung der Petalenprotoplasten zunächst verwendete Enzymkonzentration beruhte auf den Angaben von OH UND KIM (1994).

Die Ausbeuten schwankten zwischen $0,5 \times 10^6$ (Ca03) und $1,8 \times 10^6$ (Ca07) für die *Calibrachoa*-Genotypen sowie $0,6 \times 10^6$ (Pt04) und $2,0 \times 10^6$ (Pt02) für die untersuchten *Petunia*-Genotypen. Diese waren mit den in der Literatur angegebenen Ausbeuten von $2,0-3,0 \times 10^6$ für *Calibrachoa alpicola* (FORD-LOGAN UND SINK 1988) und $1,2 \times 10^6$ Protoplasten je Gramm Frischmasse für *Petunia parodii* (HAYWARD UND POWER 1975) in etwa vergleichbar. Neben den Mesophyllprotoplasten wurden auch Petalenprotoplasten sowohl aus den Petalen von *Petunia* als auch *Calibrachoa* isoliert. Die Isolierung von Petalenprotoplasten wurde bereits von OH UND KIM (1994) beschrieben. Entscheidend für die Höhe der Ausbeute war das Alter der Blüte. Wurden Blüten für die Isolierung verwendet, die bereits fünf Tage oder länger geöffnet waren, kollabierte die Mehrzahl der Protoplasten während der Inkubation in der Enzymlösung, dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Wenn Blüten verwendet wurden, die bereits erste Anzeichen von Seneszenz und die damit einhergehenden Farbveränderungen zeigten, war der Anteil intakter Protoplasten stark reduziert. Die Konzentration der Enzymlösung entsprach der für die Isolierung der Mesophyllprotoplasten

verwendeten. Die erzielten Ausbeuten schwankten zwischen $1,0 \times 10^6$ (Ca10) und $3,2 \times 10^6$ (P04) Protoplasten je Gramm Frischmasse (Abb. 3.5).

Die so erzielten Ausbeuten der Petalenprotoplasten waren ebenfalls mit denen von OH UND KIM (1994) vergleichbar. Die erzielten Ausbeuten für die *Petunia*-Protoplasten schwankten dort zwischen $5,0 \times 10^5$ und $8,0 \times 10^6$ Protoplasten je Gramm Frischmasse. Allerdings betrug die Inkubationszeit nur vier Stunden und die Enzymlösung enthielt 0,3 % Macerozyme und 1,0 % Cellulase. Ein negativer Effekt auf die Vitalität der isolierten Protoplasten durch eine erhöhte Enzymkonzentration wurde nicht beobachtet. Dieser wurde von GROSSER (1994) ebenso beschrieben wie die mögliche Schwächung des Plasmalemmas durch eine Überdosierung der Enzyme. Zwischen den verschiedenen Genotypen sowie den Experimenten traten zum Teil starke Schwankungen in Bezug auf die Protoplastenausbeute auf. Eine Erklärung dafür könnte der unterschiedliche physiologische Status der Protoplasten sein, da die Bedingungen für alle Versuche nahezu identisch waren. Wurden verschiedene Ansätze desselben Genotyps an einem Tag isoliert, gab es nur geringe Schwankungen in der Ausbeute.

Kultur der Protoplasten

Da es sich bei *Petunia hybrida* um eine wissenschaftlich gut untersuchte Modellpflanze handelt, ist die Kultur und Teilung von *Petunia*-Protoplasten

(FREARSON ET AL. 1973, BINDING ET AL. 1974, HAYWARD AND POWER 1975 und IZHAR UND POWER 1977) besser beschrieben als die der *Calibrachoa*-Protoplasten. Zudem war das *Calibrachoa*-Pflanzenmaterial weitaus heterogener als das *Petunia*-Material. Dies könnte zum einen auf die wesentlich längere züchterische Bearbeitung der Gattung *Petunia* und zum anderen auf das Vorhandensein verschiedener Herkünfte von *C. parviflora* bzw. zweier *Calibrachoa*-Genotypen mit unbekannter Herkunft zurückzuführen sein.

Für die Protoplastenkultur sind verschiedene Kultursysteme beschrieben worden, wie z.B. die Flüssigkultur (KAO ET AL. 1971), eingebettet in Agar (NAGATA UND TAKEBE 1971) bzw. in Alginatkugeln (TRICOLI ET AL. 1986). Des Weiteren können die Protoplasten in Agarose (SHILLITO ET AL. 1983) oder sogenannten „Feeder Layers“ (RAVEH ET AL. 1973) sowie „Thin Alginate Layers“ (TAL), (GOLDS ET AL. 1992) bzw. „Extra Thin Alginate Layers“, (ETFA) (PATI ET AL. 2005) kultiviert werden. Die Wahl des Kultursystems hängt zum einen von dem gewählten Pflanzenmaterial ab, so konnten z. B. SHILLITO ET AL. (1983) sowie SINHA UND

CALIGARI (2005) am Beispiel von Tabak- bzw. Lupinien-Protoplasten (*Lupinus albus*) ein besseres Wachstum zeigten, wenn sie in Agarose anstelle von Agar kultiviert wurden. Dieser Effekt war bei Tabak-Protoplasten besonders deutlich zu sehen, wenn die Protoplastendichte sehr gering war. Zum anderen bieten einige der bereits genannten Systeme, wie zum Beispiel die Kultur der Protoplasten in einem Alginatfilm oder in Alginatkugeln eingebettet, den Vorteil, dass die für die Kultur der Protoplasten notwendigen Medien vollständig und mit geringem Arbeitsaufwand ausgetauscht werden können. Bei der Flüssigkultur kann die Zuführung neuer Nährstoffe bzw. die notwendige Senkung der Osmolarität während der Kultur nur durch stetiges Verdünnen des Mediums erreicht werden. Aus diesem Grund sollten die Protoplasten in einem Alginatfilm eingebettet kultiviert werden. In der vorliegenden Arbeit war die Kultur der nicht fusionierten Protoplasten sowohl in Flüssigkultur als auch in Alginat eingebettet möglich. Allerdings waren die Teilungsraten für die untersuchten *Petunia*-Genotypen deutlich niedriger, wenn die Protoplasten in Alginat eingebettet wurden. Für die untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen traf dies nur für einige der untersuchten Genotypen zu (Abb. 3.7 und 3.8). Die unterschiedlichen Kulturformen wirkten sich auch auf die Größe der Protoplasten aus (Abb. 3.6). Bei allen untersuchten Genotypen war der Durchmesser der in Alginat eingebetteten Protoplasten größer als jener der in Flüssigkultur kultivierten Protoplasten. Besonders bei einigen der *Calibrachoa*-Genotypen (Ca10 und Ca12) wirkte sich die Einbettung der Protoplasten in Alginat negativ auf die Anzahl der intakten Protoplasten aus (Abb. A1 und A2 im Anhang).

Im Gegensatz zu den Angaben von Frau Dr. A. Schum für fusionierte Rosenprotoplasten (mündliche Mitteilung) war die Einbettung der fusionierten Protoplasten in Alginat jedoch nicht möglich. Bereits wenige Stunden bzw. Tage nach der Einbettung waren alle Protoplasten zerstört. Dies hatte die Umstellung des Kultursystems, die Protoplasten wurden fortan in flüssigem Medium kultiviert, sowie die Neubestimmung der Teilungsraten und damit verbunden einen direkten Vergleich der Kultursysteme, zur Folge.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Protoplastenkultur ist die Hormonzusammensetzung und -konzentration der Kulturmedien.

Die Wirkung von Auxin (2,4-D) und Cytokinin (BAP) auf die Zellteilung von *Petunia* wurden von BERGOUNIOUX ET AL. (1988) und TREHIN ET AL. (1998) untersucht und beschrieben. Laut ihren Angaben setzte die DNA-Synthese der untersuchten *Petunia*-Protoplasten nach 18 Stunden ein (1988b). Die Zellteilung erfolgte nach 48 Stunden, diese war sowohl von exogenem Auxin in Form von NAA bzw. 2,4-D als auch von Cytokinin (COCKING ET AL. 1977) abhängig. Weiterhin untersuchten sie die RNA-Synthese, diese war

innerhalb der ersten 18 Stunden nach der Isolierung nicht von exogenen Hormongaben abhängig. Sowohl Auxin als auch Cytokinin waren jedoch für den Übergang in die S-Phase notwendig. Die höchsten RNA-Gehalte sowie die höchste Anzahl von Zellen, die sich im G2-Stadium befanden, wurden nach 48 Stunden in Anwesenheit beider Hormonarten beobachtet.

Für die Kultur von *Petunia*- und *Calibrachoa*-Protoplasten werden in der Literatur verschiedene Medien angegeben, die sich in ihrer Hormonzusammensetzung und -konzentration teilweise deutlich voneinander unterscheiden unterscheiden.

OH UND KIM (1994) untersuchten verschiedene Medien für die Petalenprotoplastenkultur von *Petunia hybrida*, welche 2,4-D, NAA, IAA und BAP in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten. Die besten Ergebnisse bezogen auf den Beginn der ersten Teilung und die Koloniebildung wurden erzielt, wenn das Medium 0,2 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l NAA, 0,2 mg/l IAA und 0,5 mg/l BAP enthielt. Nach sechs Tagen wurden die ersten Zellteilungen beobachtet, die Teilungsrate lag bei 15 % nach siebentägiger Kultur, wenn die Petalen für die Protoplastenisolation ein bzw. zwei Tage nach der Anthese geerntet wurden. Die Kultur der isolierten Protoplasten in dem Protoplastenmedium 8pm7, welches von WINKELMANN (1994) weitestgehend, sowohl für die Kultur der Mesophyll- als auch für die Kultur der Petalenprotoplasten, übernommen wurde (ebenso wie die Zusammensetzungen des KF1- und KF2-Mediums) und welches 1,0 mg/l BAP und 1,0 mg/l NAA enthielt, führte zu einer schnellen Teilung der Protoplasten. Nach zwei- bis dreitägiger Kultur konnten die ersten Zellteilungen bei den aus Mesophyllgewebe isolierten Protoplasten beobachtet werden, was den Beobachtungen von FREARSON ET AL. (1973) entsprach. Die Teilung der Petalenprotoplasten, welche ebenfalls in diesem Medium (8pm7) kultiviert wurden, setzte im Vergleich zu den Mesophyllprotoplasten erst nach vier- bis fünftägiger bzw. bei einigen Genotypen Ca07 und Pt06 nach sieben Tagen ein, was in etwa dem von OH UND KIM (1994) beschriebenen Zeitraum entsprach. Das heißt, dass sich die Genotypen in Bezug auf den Beginn der Teilung unterschieden. Zwischen den verschiedenen *Calibrachoa*-Genotypen traten diese Unterschiede jedoch wesentlich deutlicher zu Tage, besonders im Hinblick auf den Beginn der Teilung zeigten sich große Unterschiede zwischen den Genotypen. Während der Isolation, sowie zu Beginn der Protoplastenkultur benötigen die Protoplasten, bis sie eine neue Zellwand aufgebaut haben, einen besonderen osmotischen Schutz (BHOJWANI UND RADZAN 1996). Aus diesem Grund wurden die Protoplasten bei einer Osmolarität von etwa 550-560 mOsmol/kg H₂O (bei 8pm7) kultiviert. Im weiteren Verlauf wurde die Osmolarität auf 400 mOsmol/kg H₂O (bei KF1) und anschließend auf 300 mOsmol/kg H₂O (bei KF2))

reduziert, um einer möglichen Plasmolyse bzw. Deplasmolyse der Zellen vorzubeugen. Ebenso wurden die Phytohormonkonzentrationen von 1,0 mg/l (8pm7) auf 0,5 mg/l BAP (KF1 und KF2) sowie 1,0 mg/l (8pm7) auf 0,5 mg/l (KF1 und KF2) NAA reduziert. Des Weiteren diente die Reduzierung der Osmolarität der Anpassung der Kallusse bzw. Sprosse an die Sprossregenerations- und Wachstumsmedien, da diese zumeist Osmolaritäten von ca. 300 mOsmol/kg H₂O aufweisen.

Kalluskultur und Sprossregeneration

Die für die Kalluskultur und Sprossregeneration verwendeten Basismedien basieren zumeist auf MS- (MURASHIGE UND SKOOG 1962) bzw. 8KM- Medium (KAO UND MYCHAYLUK 1975), denen verschiedene Hormone zugesetzt werden.

Zunächst wurde die Sprossregeneration des *Petunia*-Genotyps Pt09 getestet. Es konnte kein Unterschied zwischen den zwei verwendeten Hormonkombinationen 2,0 mg/l IAA und 0,5 mg/l BAP und 2,0 mg/l IAA und 1,0 mg/l BAP festgestellt werden. Daraufhin wurden vier verschiedene *Petunia*- (einschließlich Pt09) und zwei *Calibrachoa*-Genotypen getestet, wobei das Medium 2,0 mg/l IAA und 1,0 mg/l BAP enthielt. Diese Hormonkombinationen führten bei drei der vier untersuchten *Petunia*-Genotypen zur Sprossregeneration. Dagegen wurde bei den zwei getesteten *Calibrachoa*-Genotypen nur bei einem die Regeneration von Sprossen beobachtet. Die Frequenz war jedoch sehr gering, hierbei handelte es sich um *C. parviflora* (Ca06, Ergebnisse nicht dargestellt). Daraufhin wurden weitere Hormonkombinationen und -konzentrationen an verschiedenen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen getestet. Trotz unterschiedlicher getesteter Hormonkombinationen und -konzentrationen war es bei einigen der untersuchten Genotypen (Ca02, Ca03, Ca07, Ca09 und Pt09) nicht möglich, die Regeneration von Sprossen zu erzielen (Abb. 3.11 und 3.12). Die Genotypen Pt01, Pt03, Pt07, Ca10, Ca11 und Ca12 regenerierten dagegen auf fast allen untersuchten Medien Sprosse. Während für die Genotypen Ca04 und Ca06 maximale Sprossregenerationsraten von 11,7 % (1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA) bzw. 16 % (1,0 mg/l Zeatin) beobachtet wurden, wurden für die Genotypen Ca11 und Ca12 dagegen Sprossregenerationsraten von bis zu 83,3 % (1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA) und 74,4 % (2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA) erzielt. Mit Ausnahme des Genotyps Pt09, hier betrug die maximale Sprossregenerationsrate 30 % (Daten nicht dargestellt), wurden für die untersuchten *Petunia*-Genotypen maximale Sprossregenerationsraten zwischen 80 und 90 % erzielt. Ebenso wurde bei den untersuchten

Calibrachoa-Genotypen die höchste Sprossregenerationsrate abhängig vom Genotyp auf unterschiedlichen Medien erzielt, wobei deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen beobachtet wurden. Während bei zwei der untersuchten *Petunia*-Genotypen TDZ in einer Konzentration von 2,0 mg/l zu maximalen Sprossregenerationsraten führte, war die Sprossregeneration auf diesen Medien bei der Mehrheit der untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen im Vergleich zu 2,0 mg/l BAP deutlich verringert (Abb. 3.11 und 3.12). Die Abhängigkeit der Sprossregeneration vom Genotyp innerhalb einer Spezies bzw. zwischen verschiedenen Sorten wurde bereits mehrfach, so z. B. von NAKANO UND MII (1992) für verschiedene *Dianthus* Spezies, beschrieben.

SKVIRSKY ET AL. (1984) untersuchten den genotypischen Einfluss auf die Cytokinin kontrollierte Sprossregeneration an Blattexplantaten am Beispiel von zwei verschiedenen *Petunia hybrida*-Sorten. Diese reagierten stark unterschiedlich. Während die eine Sorte die höchste Sprossregenerationsrate bereits bei einer NAA-Konzentration von 0,1 mg/l und einer BAP-Konzentration von 0,2 mg/l aufwies, regenerierte die andere Sorte bei diesen Konzentrationen keine Sprosse. Die maximale Sprossregenerationsrate dieser Sorte wurde bei 5,0 mg/l BAP erzielt. Wurde Zeatin anstelle von BAP als Cytokinin verwendet, konnte das genaue Gegenteil beobachtet werden. Die Regeneration von Sprossen stellte bei einigen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genotypen ein Problem dar. In vielen Fällen scheint die Protoplastenregeneration abhängig vom Genotyp zu sein (BHOJWANI UND RADZAN 1996). In der Literatur findet man verschiedene Angaben die Hormonkombinationen und -konzentrationen betreffend. Die Mehrheit, der in der Literatur angegebenen Medien für die *Petunia*- und *Calibrachoa*- Kalluskultur und Sprossregeneration sind meist Auxin betont (POWER ET AL. 1980, SINK UND POWER 1977). Neben Auxin, in Form von IAA oder NAA, enthalten sie auch Cytokinin, meist BAP oder Zeatin. RENAUDIN ET AL. (1990) beschreiben die Anwesenheit von Cytokinin als essenziell für die Sprossregeneration von *Petunia hybrida*. Im Fall von *C. parviflora* konnte die Sprossregeneration auch durch die alleinige Anwesenheit von Zeatin induziert werden (SINK UND POWER 1977). Das von POWER ET AL. (1979) für die Kultur von Mesophyllprotoplasten aus *P. inflata* und *P. parodii* verwendete Medium 2,0 mg/l NAA und 0,5 mg/l BAP. Für die Sprossregeneration wurden die Kallusse auf 1,0 mg/l Zeatin bzw. 2,0 mg/l IAA und 1,0 mg/l BAP transferiert. Im Gegensatz zu *P. inflata* entwickelte sich *P. parodii* auf diesem Medium nicht weiter. OH UND KIM (1994) beschrieben dagegen ein Medium welches 0,2 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l IAA, 1,0 mg/l NAA und 0,5 mg/l BAP enthielt, und sowohl für die Kultur von Petalenprotoplasten als auch für die Mesophyllprotoplastenkultur von *P. hybrida* am Besten geeignet war. Ebenso unterschiedlich

sind die für die Protoplastenkultur und Sprossregeneration der *Calibrachoa*-Protoplasten angegebenen Medien. So beschreiben FORD-LOGAN UND SINK (1988) das Vorhandensein von 2,4-D im Medium als unverzichtbar für die Teilung der Protoplasten von *C. alpicola*. Enthielt das Medium kein 2,4-D oder Kokosnusswasser bzw. waren ihm nur die Hormone NAA 0,5 mg/l und BAP 0,5 mg/l zugesetzt, so wurde keine Zellteilung beobachtet. Bei der Kultur von *Calibrachoa parviflora* erzielten IZAHR UND POWER (1977) gute Resultate mit Teilungsraten von bis zu 70 % nach 14tägiger Kultur, wenn das Medium 2,0 mg/l NAA und 0,5 mg/l BAP enthielt. Zur Sprossregeneration wurden die Kallusse auf ein mit 2,0 mg/l IAA und 1,0 mg/l BAP bzw. mit 1,0 mg/l Zeatin angereichertes Medium überführt. Wobei sich Letzteres mit einer Sprossregeneration von bis zu 95 % als am Geeignetsten erwies. Die Sprossregeneration möglicher Fusionsprodukte aus der Fusionskombination *C. parviflora* fusioniert mit *P. parodii* (*P. parodii* regeneriert auf diesem Medium nicht) erfolgte bei POWER ET AL. (1980) auf Medium, in dem 2,0 mg/l IAA und 0,5 mg/l BAP enthalten waren. TAGUCHI ET AL. (1993) verwendeten dagegen für die Kultur der fusionierten Protoplasten ein Medium, welches 2,0 mg/l NAA und 1,0 mg/l BAP enthielt. Das Medium für die Sprossregeneration enthielt dagegen 0,1 mg/l NAA und 1,0 mg/l BAP.

Charakterisierung der Regenerate aus Protoplasten

Bei den ins Gewächshaus überführten *Calibrachoa*- und *Petunia*-Pflanzen konnten nur geringe Ausfälle bei der Akklimatisierung beobachtet werden (Tab. 3.10). Die wenigen Sprosse, die extreme morphologische Veränderungen, wie sehr kleine, stark verdickte Blätter und kümmerwuchs aufwiesen, überlebten die Akklimatisierung in den meisten Fällen nicht. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Regeneraten aus Mesophyllprotoplasten und den Regeneraten aus Petalenprotoplasten des *Petunia*-Genotyps Pt07 festgestellt werden. Im Gegensatz zu Pflanzen aus In vivo- und In-vitro-Vermehrung über Sprossspitzen bzw. Kopfstecklinge, wiesen zwei der aus Protoplasten regenerierten Pflanzen von *Petunia*-Genotypes Pt07 Chlorophylldefekte auf (Tab. 3.10). Nach Gottschalk (1994), wird die Chlorophyllausstattung höherer Pflanzen durch eine Vielzahl von Genen kontrolliert. Chlorophylldefekte werden durch Mutation dieser Gene verursacht. Diese Mutationen welche z. B. zu morphologisch abweichenden Plastiden führen, können z. B. durch Röntgenstrahlung induziert werden. DUTTA ET AL. (1990) beschrieben das Auftreten von

Chromosomenmutationen in der in vitro-Kultur als nicht ungewöhnlich und führten das Auftreten von Albino-Pflanzen auf eine Mutation der Chloroplasten DNA zurück. Das Auftreten von Albinismus kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren ausgelöst werden. So ist das Auftreten von Albinismus während der in vitro-Kultur von Gräsern ein großes Problem (VAN DER VALK ET AL. 1988) und wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren wie z. B. der Temperatur während der Kultur (OUYANG ET AL. 1983), der KNO₃-Konzentration des Mediums während der Kalluskultur (FENG UND OUYANG 1988) sowie der 2,4-D Konzentration des Kallusinduktionsmediums (CREEMERS-MOLENAAR ET AL. 1988) beeinflusst.

Die Durchfluscytometrie zur Bestimmung der Ploidie ist heute für viele Pflanzenarten etabliert (DE LAAT ET AL. 1987, ULRICH UND ULRICH 1991), da sie im Vergleich mit den aufwändigeren Chromosomenzählungen weniger arbeits- und zeitintensiv ist. In jeder Messung wurde eine Mischprobe bestehend aus der zu untersuchenden Probe sowie eines diploiden Standards (*Calibrachoa*-Genotyp Ca10, wurde ebenfalls bei den Messungen zuvor verwendet) gemessen. Auf Grund von fehlendem Material, wurden die Proben nicht zusammen mit einer Probe des jeweiligen für die Isolierung der Protoplasten verwendeten Genotyps gemessen. Dies wäre normalerweise vorzuziehen. Anhand der Lage des Peaks konnte der Ploidiegrad der untersuchten Proben eindeutig bestimmt werden.

Der Anteil der polyploiden Pflanzen war bei allen untersuchten Genotypen gering (Tab. 3.11). Allerdings war der Anteil polyploider Pflanzen der untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen mehr als doppelt so hoch als der der untersuchten *Petunia*-Genotypen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es sich bei dem untersuchten *Petunia*-Genotyp Pt07 um einen tetraploiden Genotyp handelte und diese den Untersuchungen von OH ET AL. (1995a) zufolge genetisch stabiler sind als diploide. So wurde die cytologische Stabilität an Regeneraten aus diploiden *Petunia hybrida*-Protoplasten untersucht. 85 % der Regenerate waren tetraploid bzw. 1995a). Die Untersuchung von Regeneraten aus tetraploiden *Petunia*-Protoplasten, zeigte dagegen keine Änderung der Ploidie. Alle Regenerate waren tetraploid (OH ET AL. 1995a).

Die Ursachen für eine Polyploidisierung sind vielfältig.

Eine mögliche Ursache könnte die Regeneration von Sprossen aus mehrkernigen Protoplasten sein. Für *Petunia* wurde die chromosomale und morphologische Variation in Protoplastenkulturen ausgehend von diploidem und tetraploidem Pflanzenmaterial von OH ET AL. (1995b) untersucht. Während alle Protoplasten direkt nach der Isolierung (500 wurden untersucht) nur einen Kern aufwiesen, konnte bereits nach 48 Stunden, also noch vor der ersten Zellteilung, ein vermehrter Anstieg von zwei und mehrkernigen Zellen bei den auf das

diploide Ausgangsmaterial zurückgehenden *Petunia*-Protoplasten beobachtet werden. Viele dieser Zellen wiesen auch nach erfolgter Zellteilung mehrere Kerne auf. Weiterhin konnte bei diesen Mehrkernigen Zellen in unterschiedlichem Ausmaß eine asynchrone Kernteilung beobachtet werden. Die normalerweise im Anschluss an die Mitose folgende Bildung der Zellwänden und -membranen unterblieb in vielen Fällen. Im Gegensatz dazu betrug der Anteil mehrkerniger Zellen, vor und nach erfolgter Zellteilung, wurden die Protoplasten aus tetraploidem Ausgangsmaterial isoliert, nur 0,1- 2,3 %. Es wird davon ausgegangen, dass neben dem Ausgangsmaterial auch die Hormonkombinationen und -konzentrationen einen Einfluss auf den Anteil der mehrkernigen Protoplasten haben (OH ET AL. 1995b).

BERGOUNIOUX ET AL. (1988) zeigten, dass *Petunia*-Mesophyllprotoplasten mit einem 2C DNA-Gehalt nach Zugabe von Auxin und Cytokinin die Kernteilung wieder aufnahmen. Sie konnten zeigen, dass sowohl Auxin (2,4-D) als auch Cytokinin (BAP) für den Eintritt in die S- Phase notwendig waren. Nur bei Anwesenheit beider Hormone konnten maximale RNA-Syntheseraten sowie eine maximale Anzahl von Zellkernen im G2- Stadium (kurz vor Beginn der Mitose) nach 48 Stunden nachgewiesen werden. TREHIN ET AL. (1998) untersuchten ebenfalls den Einfluss von Auxin und Cytokinin auf die Zellteilung. Sie konnten nachweisen, dass sowohl 2,4-D und BAP für die Aktivierung einer cyclinabhängigen Kinase, welche bei *Petunia hybrida* für die Vollendung der G1- und G2-Phase verantwortlich ist, notwendig sind.

RAMULU ET AL. (1985) nennen Unregelmäßigkeiten während der Mitose (Endomitose) und der DNA- und Chromatin-Replikation und die daraus resultierenden Vorgänge wie z. B. Endomitose und Endoreduplikation als verantwortliche Faktoren, die zur Polyploidisierung von Zellen führen können. Dabei können diese Veränderungen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt, zu Beginn der Protoplastenentwicklung und Kallusinduktion auftreten, was am Beispiel von *Solanum tuberosum* gezeigt werden konnte (RAMULU ET AL. 1984). Mit zunehmendem Kalluswachstum nahm die Anzahl polyploider und aneuploider Zellen darüberhinaus noch zu (RAMULU ET AL. 1985). Eine weitere Erklärung für das Auftreten polyploider aus Protoplasten regenerierter Pflanzen könnten ebenso spontane Fusionen während der Inkubation in der Enzymlösung bzw. während der Isolierung sein (YE UND EARLE 1991). In der Literatur konnten keine Untersuchungen zur genetischen Stabilität von *Calibrachoa*-Protoplastenregeneraten gefunden werden. Somit gab es auch keine Vergleichsmöglichkeit zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen.

4 Somatische Hybridisierung

4.1 Einleitung

Für die Züchtung vieler wichtiger Kulturpflanzen, wie z. B. Kartoffel und Kohl, aber auch Zierpflanzen hat die somatische Hybridisierung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Besonders interessant erscheint diese Methode, wenn das zu bearbeitende Material nicht auf herkömmlichem Wege gekreuzt werden kann. Dies kann z. B. bei Kreuzungen über die Gattungs-, bzw. Artgrenzen hinweg, sowie bei sterilen Pflanzen der Fall sein. Bei der somatischen Hybridisierung kommt es entweder zur Verschmelzung ganzer Protoplasten (symmetrische Fusion) oder aber einzelner Bestandteile (asymmetrische Fusion), nachdem Teile des Genoms z. B. durch Gamma-Bestrahlung zerstört wurden und so nicht mehr zu den Eigenschaften der Hybride beitragen. Es werden zwei Methoden, die chemische und die elektrische Fusion unterschieden. KELLER UND MELCHERS (1973) beschrieben die Fusion von Tabakmesophyllprotoplasten nach Behandlung der Protoplasten mit einer Lösung, welche einen hohen pH-Wert und eine erhöhte Calciumkonzentration (100-300 mM) aufwies. GRIMES UND BOSS (1985) zeigten, dass sowohl Calcium als auch Calmodulin eine Rolle bei der Fusion von Protoplasten spielen. Die Verringerung des intrazellulären Calciums führte zu einer Verschlechterung der Fusionsrate, während eine Erhöhung zu einer Steigerung führte. Ebenso zeigten sie, dass der Einsatz von Calmodulin-Hemmern ebenfalls zu einer Verringerung der Fusion führte.

Heute wird die von KELLER UND MELCHERS (1973) beschriebene Methode mit PEG kombiniert angewandt. Durch die Zugabe von PEG kommt es zur Agglutination, der Zusammenlagerung der Protoplasten. Durch eine anschließende Erhöhung des pH-Wertes und Applikation einer erhöhten Calciumkonzentration kommt es dann zur Fusion der Protoplasten (KAO UND MICHAYLUK 1974).

Eine weitere Methode ist die Elektrofusion, wie von ZIMMERMANN UND SCHEURICH (1981) beschrieben. Durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes mit wechselnden Spannungen kommt es zur Agglutination der Protoplasten. Anschließend erfolgt eine kurzzeitige Ladungsumkehr der Membran und dadurch bedingt die Fusion der Protoplasten. Eine weitere Variante ist die Kombination aus der chemischen Fusion (mittels PEG) und der elektrischen Fusion, welche von OLIVARES-FUSTER ET AL. (2005) am Beispiel von *Citrus* beschrieben wurde. Durch PEG wurde die Agglutination der Protoplasten induziert, die eigentliche Fusion der Protoplasten erfolgte dann durch kurze Stromstöße.

Petunia-Protoplasten (*Petunia parodii*) wurden 1980 erstmals mit *Calibrachoa*-Protoplasten (*Petunia parviflora*) nach der von KELLER UND MELCHERS (1973) beschriebenen Ca / pH-Methode von POWER ET AL. (1980) fusioniert. Auch TAGUCHI ET AL. (1993) fusionierten *Petunia*-Protoplasten (*Petunia hybrida*) mit *Calibrachoa*-Protoplasten (*Petunia variabilis*), allerdings wurden in diesem Fall die entstandenen Hybriden durch Elektrofusion erzeugt.

Bei der Erzeugung somatischer Hybriden kommt der Selektion eine besondere Bedeutung zu. In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Selektion beschrieben. Mitte der 70er, bzw. Anfang der 80er Jahre wurden häufig Mutationen, die im Hinblick auf Morphologie oder Physiologie Defizite aufwiesen, bzw. durch Gamma-Bestrahlung verändert wurden, eingesetzt. POWER ET AL. (1980) fusionierten die Protoplasten einer Albino-Mutante von *Petunia parviflora* mit Mesophyllprotoplasten von *Petunia parodii*, welche sich nicht über das Mikrokallusstadium hinaus entwickeln konnten. Die Fusionskallusse ließen sich auf Grund ihres Chlorophyllgehaltes und eines starken Wachstums selektieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Selektion bietet der Einsatz so genannter Zellzyklus-Hemmstoffe. Durch den Einsatz dieser Hemmstoffe soll die Selektion der nach der Fusion entstandenen Hybriden vereinfacht werden. Dabei wird jeder der Fusionspartner vor der Fusion mit einem Hemmstoff behandelt, welcher die Zellteilung der Protoplasten verhindert. Häufig werden Jodacetat oder Jodacetamid, bzw. Rhodamin 6G verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Hemmstoffen Rhodamin 6G und Jodacetamid gearbeitet. Rhodamin 6G (R6G) hemmt die mitochondriale Phosphorylierung tierischer Zellen (GEAR 1974), wohingegen Jodacetamid (JAA) Enzyme mit Schwefelgruppen hemmt. Da diese Hemmstoffe an unterschiedlichen Orten des Zellstoffwechsels eingreifen, sollte bei einer Fusion beider Partner miteinander in den Hybriden der negative Effekt der Hemmstoffe auf die Zellteilung aufgehoben werden, so dass diese im Gegensatz zu den nicht fusionierten, bzw. den Homofusionsprodukten in der Lage sind, sich zu teilen. Eine weitere Möglichkeit zur Erkennung der heterologen Fusionsprodukte bietet die Verwendung von Petalenprotoplasten als einen der Fusionspartner. Die Petalenprotoplasten einiger *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen, insbesondere die der dunkelfarbigen Blüten (blau, lila), zeichnen sich durch eine intensive Färbung aus. Diese ermöglicht es, sie von den Mesophyllprotoplasten mit ihren grünen Chloroplasten zu unterscheiden, und somit die Fusion der Protoplasten, bzw. die heterologen Fusionsprodukte von den nicht fusionierten bzw. Homofusionsprodukten zu unterscheiden. Die heterologen Fusionsprodukte wiesen sowohl den Farbstoffes der Petalenprotoplasten als auch die grünen Chloroplasten der Mesophyllprotoplasten auf. Allerdings nimmt die Färbung mit zunehmender Anzahl der

Zellteilungen ab. Bereits OH UND KIM (1994) beschrieben die Regeneration von Pflanzen aus Petalenprotoplasten, die von einem tetraploiden *Petunia hybrida*-Genotypen stammten. Ebenso beobachteten sie die Abnahme der Farbintensität der Petalenprotoplasten mit zunehmender Teilung.

So genannte "Cell Finder"-Objektträger (POG Präzisionsoptik Gera GmbH) ermöglichen eine genaue Lokalisierung und somit Selektion der mutmaßlich heterologen Fusionsprodukte. Mittels Agarose wurden die Protoplasten nach der Fusionsbehandlung auf dem "Cell Finder"-Objektträger fixiert, auf dem sich ein Raster befindet, durch welches sich die genaue Lage der einzelnen Protoplasten bestimmen ließ. Auf diese Weise konnte die Entwicklung der heterologen Fusionsprodukte verfolgt werden.

Ziele dieses Abschnittes waren die Entwicklung und Optimierung eines Protokolls zur Protoplastenfusion, die Untersuchung möglicher Strategien zur Selektion der heterologen Fusionsprodukte sowie die molekulargenetische Untersuchung der aus den Fusionsexperimenten gewonnenen Sprosse bzw. Kallusse.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Pflanzenmaterial

Für die durchgeführten Fusionsexperimente wurden zunächst Mesophyllprotoplasten verschiedener *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen eingesetzt. Die Anzucht der Sprosse, die als Ausgangsmaterial dienten, erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. Neben den Mesophyllprotoplasten wurden im zweiten Teil dieses Kapitels Petalenprotoplasten sowohl aus *Petunia*- als auch aus *Calibrachoa*-Blütenblättern isoliert und als Fusionspartner eingesetzt. Das für die Isolierung der Protoplasten notwendige Blütenmaterial stammte von im Gewächshaus angezogenen und wie unter 3.2.6.1 beschrieben kultivierten Pflanzen. Die Sterilisation der Blüten erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben.

4.2.2 Einfluss von R6G und JAA auf die Entwicklung von *Petunia*- und *Calibrachoa*-Protoplasten

Die Inaktivierung der Protoplasten erfolgte durch die Stoffwechsellinhibitoren Rhodamin 6G (R6G, Sigma) und Jodacetamid (JAA, Fluka). Dabei wurden jeweils hochkonzentrierte Stammlösungen verwendet. Hierzu wurden 150 mg R6G (Sigma) in 3 ml reinem Ethanol (unvergällt) gelöst, filtersterilisiert und in kleine Portionen abgefüllt. Von dem Enzyminhibitor JAA wurden 185 mg in 10 ml H₂O bidest. gelöst und ebenfalls in kleine Portionen aufgeteilt. Die Protoplasten wurden wie unter 3.2.3 beschrieben isoliert. Die Hemmstoffbehandlung erfolgte jeweils während der Isolation nach dem ersten Waschschrift. Dabei wurde die Wirkung beider Hemmstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen (R6G: 0; 0,25; 0,5; 1,0 und 1,5 mM sowie JAA: 0; 0,5; 0,75; 1,0 und 2,0 mM bzw. 0,1-0,7 mM) und in verschiedenen Versuchen sowohl an *Petunia*-Protoplasten als auch an *Calibrachoa*-Protoplasten getestet. Die Inkubation erfolgte für 15 min. Im Anschluss an die Hemmung wurden die Protoplasten nach einem zusätzlichen Waschschrift wie unter 3.2.4.1 beschrieben kultiviert. Nach 3, 5 und 7 Tagen wurden die Teilungsfrequenzen nach der folgenden Formel bestimmt:

Anzahl der geteilten Protoplasten / Anzahl der Protoplasten gesamt * 100.

Des Weiteren wurde der Einfluss von R6G (0,55 mM) auf die Protoplastendurchmesser des *Petunia*-Genotyps Pt09 sowie von JAA (0,55 mM) auf den *Calibrachoa*-Genotyp Ca07 untersucht. Die Protoplastendurchmesser wurden wie unter 3.2.6 beschrieben bestimmt. Der Versuch wurde einmal wiederholt. Außerdem wurde der Einfluss der Hemmstoffbehandlung auf die Protoplasten bestimmt, indem der Anteil intakter Protoplasten nach der Hemmstoffbehandlung für die verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen wie unter 3.2.7 beschrieben bestimmt wurde.

4.2.3 Fusionsexperimente mit ungehemmten und gehemmtten Mesophyllprotoplasten

Die Protoplasten wurden nach dem Protokoll von Frau Dr. A. Schum (schriftliche Mitteilung) fusioniert, welches teilweise verändert wurde (s. 4.2.3, Fusionsprotokoll 1).

Fusionsprotokoll 1 (Variante 5 s. Tab. 4.1)

Für die Fusionen wurden zunächst ungehemmte Mesophyllprotoplasten verwendet. Diese wurden in Pufferlösung (Tab. 3.3) mit einer Dichte von 1×10^6 aufgenommen und im Verhältnis 1:1 gemischt. Je Fusionsansatz wurden 225 μl PEG-Lösung (30 % PEG (MW 6000, Roth), 2,36 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 10,93 g Mannitol und 2,6 g HEPES-Puffer in 100 ml A. bidest, pH-Wert 9,6, bzw. 10,2), aufgeteilt auf drei Tropfen, in eine Plastikpetrischale (3,5 cm) pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 μl der Protoplastensuspension in die Mitte der Tropfen, welche dann langsam mit der PEG-Lösung vermischt wurden. Nach der Zugabe von weiteren 225 μl PEG-Lösung und einer Inkubationszeit von 20 min erfolgte die Zugabe von 500 μl einer 0,275 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung. Nach 20-30 Minuten wurde der Fusionsansatz in Glaszentrifugenröhrchen überführt, vorsichtig geschwenkt und bei 65 x g für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protoplastenpellet in 5 ml Pufferlösung gewaschen, erneut zentrifugiert (65 x g / 6 min) und anschließend in 8pm7-Kulturmedium resuspendiert und in Petrischalen (3,5 cm Durchmesser) zur Weiterkultur überführt. Da die Protoplastendichte in den einzelnen Fusionsansätzen nach der Fusion sehr gering waren, wurden mehrere Ansätze zusammengefasst. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Protoplasten mit den Hemmstoffen JAA und R6G behandelt, welche die Zellteilung der Protoplasten hemmen sollten, bevor diese nach der oben beschriebenen Methode fusioniert wurden. Die Hemmung der *Petunia*-Protoplasten erfolgte durch unterschiedliche R6G-Konzentrationen, während die Hemmung der *Calibrachoa*-Protoplasten durch JAA ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte. Die fusionierten Protoplasten wurden wie unter 3.2.4.1 beschrieben kultiviert.

4.2.4 Fusionsexperimente mit Petalenprotoplasten

Zunächst wurden die Fusionen wie unter 4.2.3., Fusionsprotokoll 1, beschrieben durchgeführt. Durch die Verwendung der Petalenprotoplasten war es möglich, die Fusion der Protoplasten unter dem Mikroskop zu beobachten bzw. mögliche Heterofusionsprodukte nach der Fusion zu identifizieren. Da nach erfolgter Fusion kaum heterologe Fusionsprodukte beobachtet wurden bzw. nach der Zugabe der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung, die Trennung der scheinbar fusionierten Protoplasten beobachtet werden konnte, wurde abweichend von dem unter 4.2.3. beschriebenen Fusionsprotokoll 1 in verschiedenen Experimenten die $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung in

mehrere kleine Portionen aufgeteilt, das heißt 500 µl wurden auf 100, 100 und 300 µl aufgeteilt und nach 20, 25 und 30 min, zugegeben. Des Weiteren wurde die $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung durch eine 20 %ige Saccharoselösung bzw. Pufferlösung ersetzt, was jedoch zu keiner Verbesserung führte.

Fusionsprotokoll 2 (Variante 2, s. Tab. 4.1)

Die Fusionsmethode wurde verändert und die Protoplasten in einer 5 M Mannitollösung (anstelle von Pufferlösung) mit einer Dichte von 1×10^6 Protoplasten/ml suspendiert, ebenfalls im Verhältnis 1:1 gemischt und je Fusionsansatz 50 µl in eine Plastikpetrischale (3,5 cm Durchmesser) pipettiert, je Petrischale 3-4 Fusionsansätze. 10-15 Minuten nachdem sich die Protoplasten abgesetzt hatten, wurden je Ansatz 100 µl PEG-Lösung (30 % PEG (MW 6000, Roth), 1 % Saccharose und 0,05 M CaCl_2 , pH-Wert 9.5, filtersterilisiert), aufgeteilt auf zwei Tropfen, an den gegenüberliegenden Seiten langsam hinzupipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 30-40 min wurde die PEG-Lösung abgesaugt und 1 ml Pufferlösung hinzupipettiert und wieder abgesaugt und anschließend in 1 ml 8pm7-Medium kultiviert.

4.2.4.1 Ermittlung der Heterofusionsrate für verschiedene Fusionskombinationen

Die Heterofusionsfrequenz konnte nur bei Fusionsexperimenten bestimmt werden, bei denen Petalenprotoplasten als ein Fusionspartner beteiligt waren. Bei allen übrigen Fusionsexperimenten war eine Bestimmung von Fusionsraten nicht möglich, da es weder mit Ethidiumbromid nach YE UND EARLE (1991) noch mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) gelang, die Zellkerne der intakten Protoplasten anzufärben.

Für die Ermittlung der Heterofusionsfrequenz wurden mindestens 4-5 Gesichtsfelder je Fusionsansatz unter dem Mikroskop (Zeiss Inversmikroskop IM35) bei 320facher Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurde eine Summe von mindestens 100 Protoplasten je Ansatz erreicht. Es wurden nur die intakten Protoplasten gezählt, da in vielen Fällen die zerstörten Protoplasten nicht mehr zu erkennen waren, bzw. die Bruchstücke nicht mehr einzelnen Protoplasten zugeordnet werden konnten. Die Heterofusionsfrequenz wurde nach der folgenden Formel berechnet:

Anzahl der heterologen Fusionsprodukte / Anzahl der intakten Protoplasten *100

Die Heterofusionsraten wurden für verschiedene Fusionskombinationen zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* bestimmt.

4.2.4.2 Selektion der heterologen Fusionsprodukte mittels Cell Finder Objektträger

Um die heterologen Fusionsprodukte später sicher lokalisieren zu können, wurden diese mittels 3 %iger LM-Agarose (Low Melting Point Agarose, Biozym), 1 VT Agarose und 5 VT 8pm7-Medium, welches die Protoplasten enthielt, auf einen speziellen Objektträger ("Cell Finder", POG Präzisionsoptik Gera GmbH), welcher mit einem Raster versehen war, fixiert. Die einzelnen Quadrate des Rasters waren mit einer Kombination aus Buchstaben und Zahlen versehen. Der autoklavierte "Cell Finder" wurde zuvor mit einem Tropfen 3%iger Agarose in einer sterilen Plastikpetrischale (9 cm Durchmesser) fixiert. Nach dem Aushärten des Agarosefilms wurde der Objektträger durch Zugabe eines Agarosetropfens an den Längsseiten zusätzlich mit dem Boden der Petrischale fixiert. Die Zugabe von flüssigem 8pm7-Medium erfolgte langsam, bis der Agarosefilm vom Medium bedeckt war.

4.2.4.3 Vergleich verschiedener Fusionslösungen und -methoden

Auf Grund der durch die Verwendung von Petalenprotoplasten möglichen Bestimmung der Heterofusionsraten wurden verschiedene Fusionsvarianten miteinander verglichen, um das bisher vorhandene Fusionsprotokoll (Tabelle 4.1, Variante 5) im Hinblick auf die Fusionsraten zu verbessern. Die Lösungen unterschieden sich zum einen in der Art der Sterilisation (filtersterilisiert bzw. autoklaviert) sowie in der Zusammensetzung der PEG-Lösung und dem Fusionsablauf. Die Genotypen Pt06 und Ca10 wurden miteinander fusioniert.

Tab. 4.1: Zusammensetzung der verwendeten Fusionslösungen

Variante	Zusammensetzung der Fusionslösung	Methode
Variante 1 autoklaviert	PEG 1: 30 % PEG (MW 6000), 1 % Saccharose, 0,05 mM CaCl ₂ , pH-Wert 9,5	Suspendieren der Protoplasten in Mannitol, Absetzen der Protoplasten am Boden der Petrischale, Zugabe von PEG, nach 30-40 min Absaugen des PEGs. Zugabe von 8pm7-Medium.
Variante 2 filtersterilisiert (Fusionsprotokoll 2)		
Variante 3 autoklaviert	PEG 2: 30 % PEG (MW6000), 2,36 g Ca(NO ₃) ₂ , 10,93 g Mannitol und 2,6 g HEPES-Puffer je 100 ml A. bidest, pH-Wert 9,5	
Variante 4 filtersterilisiert		
Variante 5 autoklaviert (Fusionsprotokoll 1)	PEG 2: 30 % PEG (MW6000), 2,36 g Ca(NO ₃) ₂ , 10,93 g Mannitol und 2,6 g HEPES-Puffer je 100 ml A. bidest, pH-Wert 9,5	Suspendieren der Protoplasten in Pufferlösung, Zugabe von PEG, Zugabe der Protoplasten, nach 20 min Zugabe von 500 µl einer 0,275 M Ca(NO ₃) ₂ -Lösung. Überführen in Zentrifugenröhrchen und Zentrifugieren. Das Pellet anschließend in 5 ml Pufferlösung suspendieren und erneut zentrifugieren. Suspendieren des Pellets in 8pm7-Medium.

4.2.5 Kultur der fusionierten Protoplasten

Im Anschluss an die Fusion sollten die Protoplasten zunächst in Alginat eingebettet und kultiviert werden. Dies war jedoch nicht möglich, da bereits direkt nach dem Einbetten keine intakten Protoplasten in dem Alginatfilm mehr vorhanden waren, bzw. nur wenige, und diese nach 1-2 Tagen abstarben. Demzufolge wurden die Protoplasten der weiteren Fusionsansätze in flüssigem 8pm7-Medium kultiviert.

Die fusionierten Mesophyllprotoplasten wurden wie unter 3.2.4.1 beschrieben kultiviert.

Die in den Petrischalen fusionierten Protoplasten wurden ebenfalls wie unter 3.2.4.1 beschrieben kultiviert. Da sich jedoch die Mehrheit der Protoplasten am Boden der Petrischale befanden, wurden diese nach ca. 2-3 Tagen vorsichtig mit einer Glaspipette durch mehrfaches Absaugen und wieder Hinzupipettieren des Mediums vom Boden der Schale gelöst.

Die auf den "Cell-finder"-Objektträgern plattierten Protoplasten wurden in 9 cm Petrischalen in flüssigem 8pm7-Medium kultiviert. Nachdem sie das Mikrokallusstadium erreicht hatten, wurden sie auf ein mit 3 %iger LM-Agarose verfestigtes 8pm7-Medium (2,5 VT Medium + 1 VT Agarose) überführt. Die Kallusse wurden nach ca. ein bis zwei Wochen, bzw. wenn sie eine Größe von 0,5-1 mm erreicht hatten, auf KF1-Medium, welches ebenfalls mit LM-Agarose verfestigt war, transferiert. Zur Sprossregeneration wurden die Kallusse auf Pet I (0,2 mg/l IAA + 2,0 mg/l BAP, s. Tab. 3.5) bzw. Pet K (0,2 mg/l IAA + 1,0 mg/l TDZ, s. Tab. 3.5) überführt.

4.2.6 Durchflusscytometrische Untersuchung der aus Fusionsexperimenten gewonnenen Sprosse

Die durchflusscytometrische Untersuchung der Fusionssprosse erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Die Aufarbeitung der zu untersuchenden Proben erfolgte ebenfalls wie unter 2.2.2 beschrieben. Je Kallus wurde ein Spross untersucht. Untersucht wurden die Sprosse aus zwei Fusionsexperimenten. Es wurden die DNA-Gehalte von 86 Sprossen, welche aus der Fusion von gehemmten Protoplasten von *Petunia*-Genotyp Pt09 und *Calibrachoa*-Genotyp Ca07 regeneriert wurden, bestimmt. Zum einen sollte der Ploidiegrad der einzelnen Sprosse ermittelt werden. Sprosse, deren DNA-Gehalt von der Norm abwichen, d. h. die keiner genauen Ploidiestufe zugeordnet werden konnten, wurden im Anschluss molekulargenetisch mittels RAPD-Primern untersucht.

Zur Bestimmung der Ploidie wurden zudem 20 Sprosse, welche aus der Fusionskombination Ca07 fusioniert mit Pt06 gewonnen wurden, durchflusscytometrisch untersucht.

4.2.7 Molekulargenetische Untersuchungen

4.2.7.1 Untersuchung der aus Fusionsexperimenten gewonnenen Sprosse bzw. Kallusse mittels RAPD-Analyse

Die untersuchten Sprosse bzw. Kallusse stammten aus Fusionsexperimenten mit ungehemmten sowie gehemmten Protoplasten.

Die DNA-Isolierung der Proben erfolgte wie unter 2.2.3.1 beschrieben mit dem DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen. Auf Grund der hohen Anzahl zu untersuchender Sprosse und Kallusse, welche aus den Fusionsexperimenten mit Petalenprotoplasten stammten, wurden diese mit der (im Vergleich zum Qiagen Kit kostengünstigeren) DNA-Schnellisolierungsmethode nach DOROKOV UND KLOCKE (1997), der das Protokoll von EDWARDS ET AL. (1991) zugrunde liegt, isoliert. Bei dieser Methode der DNA-Extraktion wurden ca. 40-100 mg frisches Blatt- bzw. Kallusmaterial in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen und mit 400 µl Extraktionspuffer (s. Tab. 4.2) sowie 20 µl RNase A (10 mg/ml, AppliChem) mittels eines sterilen Pistills (Eppendorf), das in einer Bohrmaschine eingespannt war, homogenisiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Proben für 15 min im Wasserbad bei 65 °C (unter gelegentlichem Invertieren), bzw. im Hybridisierungsöfen, wobei die Proben dauerhaft in Bewegung gehalten wurden. Der Inkubation folgte die Zugabe von 200 µl eiskaltem 5 M Kaliumacetat, wobei die Probe leicht geschwenkt wurde, um das Gewebepellet aufzulösen sowie eine zehnmünütige Inkubation in Eiswasser. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert (Tischzentrifuge von Eppendorf), der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und der Vorgang wiederholt. Dem Überstand wurden 500 µl eiskaltes Isopropanol zugegeben, das DNA-Isopropanol-Gemisch wurde gut gemischt, bei Raumtemperatur für 8 min inkubiert und im Anschluss 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 65 %igem, eiskaltem Ethanol ca. 2-5 min gewaschen. In einem weiteren Schritt wurde erneut für 10 min. bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in der Werkbank getrocknet und im Anschluss daran die DNA in 50 bzw. 100 µl (abhängig von der zu erwartenden DNA-Menge) A. bidest gelöst.

Die aus den Fusionsversuchen gewonnenen Sprosse bzw. Kallusse wurden mit RAPD-Primern untersucht (s. Kapitel 2). Auf Grund der vorherigen Untersuchungen des

Pflanzenmaterials standen für die meisten Genotypen, bzw. Fusionsvarianten geeignete Primer zur Verfügung. War dies nicht der Fall, wurden weitere Primer auf ihre Eignung geprüft.

Es wurden Primer herangezogen, mit denen sich die Eltern in Vorversuchen unterscheiden ließen. Die PCR-Reaktionen wurden wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Sprosse wurden mit mindestens zwei Primern untersucht.

Tab. 4.2: Zusammensetzung des DNA-Extraktionspuffers nach DOROKOV UND KOCKE (1997)

Substanz	Konzentration
Tris HCL (pH 7,5)	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 %

4.2.7.2 Untersuchung der aus Fusionsexperimenten gewonnenen Sprosse bzw. Kallusse mittels AFLP-Analyse

Auf Grund der zum Teil unbefriedigenden Ergebnisse der RAPD-Analysen wurde ein Teil der Fusionskallusse, insbesondere jene, welche ein auffälliges Bandenmuster aufwiesen, sowie die dazugehörigen Eltern mittels AFLP-Analyse (VOS ET AL. 1995) untersucht. Diese Arbeiten wurden im Labor des Instituts für Pflanzengenetik, AG Molekulare Pflanzenzüchtung der Leibniz Universität Hannover mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. T. Debener und Dr. M. Linde durchgeführt.

Für die Erzeugung der AFLPs wurde das HindIII / MseI Enzymsystem gewählt. Die Detektion der Proben wurde mittels Fluoreszenz-Farbstoffen durchgeführt. Vor der Ligation der DNA wurde ein Kontrollverdau (100 ng DNA) mit HindIII durchgeführt, um zu prüfen, ob die Qualität der isolierten DNA ausreichte, da die zu untersuchenden DNA-Proben nach dem Isolierungsprotokoll von DOROKOV UND KLOCKE (1997), welches als DNA-Schnellisolationsmethode keine hochreine DNA-Qualität ergibt, isoliert wurden. Je Ansatz wurden 200 ng der zu untersuchenden DNA (insgesamt 24 Proben = 24 Ansätze) durch die Restriktionsenzyme HindIII und MseI in Fragmente unterschiedlicher Länge geschnitten

(Restriktion). Die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes zeigt Tabelle 4.3. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Im Anschluss daran erfolgte die Ligation der Oligonukleotidadapter. Diese dienen als Erkennungsstellen für die Primer. Zu den 25 µl des Restriktionsansatzes wurden 5 µl des Ligationsansatzes (siehe Tab. 4.5) hinzupipettiert und das Gemisch für 3,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im ersten Amplifikationsschritt (Präamplifizierung) wurde dann ein Teil der Fragmente mit Primern, die beide über die Adaptersequenz hinaus um ein Adenin-Nukleotid verlängert waren, selektiv vermehrt (Tab. 4.6 und 4.7). 20 µl eines jeden Präamplifikationsansatzes wurden zur Kontrolle im Agarosegel (1 %, siehe 2.2.3.2) aufgetrennt. Für den zweiten Amplifikationsschritt (finale Reaktion) wurde von jedem der 24 Präamplifikationsansätze ein Teil mit TE-Puffer im Verhältnis 1:20 verdünnt (5 µl des Reaktionsmixes + 95 µl TE-Puffer). Die unverdünnten Präamplifikationsansätze wurden bei -20 °C gelagert. Bei den verwendeten Primern handelte es sich um fluoreszenzmarkierte (IRD) Primer, die mit je drei zusätzlichen selektiven Nukleotiden am 3' Ende versehen waren. In zwei verschiedenen Ansätzen wurden die zu untersuchenden Proben (24) mit insgesamt vier HindIII-Primern und zwei MseI-Primern untersucht. Je Mastermix/Ansatz wurden zwei verschiedene, fluoreszenzmarkierte (700 nm und 800 nm Wellenlänge) HindIII-Primer eingesetzt (4.8). So konnten die Reaktionen pro Probe verdoppelt werden. Die Amplifikationsbedingungen sind Tabelle 4.9 zu entnehmen. Die Sequenzen für die Primer sind Tabelle 4.11 zu entnehmen. Die Primer wurden von der MWG Biotech AG, Ebersberg bezogen.

Tab. 4.3: Zusammensetzung des Restriktionsmixes

Substanz	Menge
DNA	200 ng
10 x RL Puffer s. Tab. 4.4 (-20 °C)	2,0 µl
HindIII (-20 °C)	0,4 µl (10 U/µl)
MseI (-20 °C)	49,6 µl (4 U/µl)
H ₂ O	Auffüllen auf 25µl

Tab. 4.4: Zusammensetzung 10 x RL-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris-HCL	100 mM
MgAc	100 mM
KAc	500 mM
DTT	50 mM (77 mg/10 ml)
pH	7,5 (Filtersterilisation)

Tab. 4.5: Zusammensetzung des Ligationsansatzes

Substanz	Menge
HindIII-Adapter (HindIII O + U, -20 °C)	0,5 µl (5 pMol/µl)
MseI-Adapter (MseI O + U, -20 °C)	0,5 µl (50 pMol/µl)
10 mM ATP (-20 °C)	0,6 µl
10 x RL-Puffer s. Tab. (-20 °C)	0,5 µl
T4-DNA-Ligase (-20 °C, Fermentas)	0,05 µl (5 U/µl)
H ₂ O	2,85 µl

Tab. 4.6: Zusammensetzung des Präamplifikationsmixes

Substanz	Menge
Geschnittene und ligierte DNA	5 µl
Primer HindIII + A (-20 °C)	1,5 µl (50 ng/µl)
Primer MseI + A (-20 °C)	1,5 µl (50 ng/µl)
dNTPs (-20 °C)	5 µl (2 mM)
10 x Williams-Puffer (-20 °C) *	5 µl
Taq Polymerase, Axon (-20 °C)	1 µl (5 U/µl)
H ₂ O	31 µl

*Zusammensetzung siehe Tab. 2.9

Tab. 4.7: PCR-Bedingungen für die Präamplifikation

Schritt	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 20 Zyklen
Annealing	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	60 s	

Thermocycler : T3 Biometra

Tab. 4.8: Reaktionsmix für die Hauptreaktion (Endvolumen 10µl)

Substanz	Menge
Mit TE-Puffer (1:20) verdünnte DNA (Präamplifikationsmix)	2,5 µl
<u>Mastermix 1:</u> HindIII-IRD-ATT (800 nm) und -AAC (700 nm) <u>Mastermix 2:</u> HindIII -ACG (800 nm) und -AAT (700 nm) (-20 °C)	Je 1,5 µl (2 ng/µl)
Mastermix 1: Mse-Primer -ACT Mastermix 2: Mse-Primer -ACG (-20 °C)	0,3 µl (50 ng/µl)
dNTPs (-20 °C)	1,0 µl (2 mM)
Taq-Polymerase (-20 °C)	0,05 µl (5 U/µl)
10 x Williams-Puffer *(-20 °C)	1,0 µl
H ₂ O	2,15 µl

*Zusammensetzung siehe Tab. 2.9

Tab. 4.9: PCR-Bedingungen für die Hauptreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 s	} 1
Annealing	65 °C	30 s	
Elongation	72 °C	60 s	
11 weitere Zyklen, bei jedem Zyklus wurde die Temperatur um ca. 0,7 °C reduziert bis die Annealing Temperatur von 56 °C erreicht wurde.			
Denaturierung	94 °C	30 sec	} 24
Annealing	56 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	60 sec	

Tab. 4.10: Zusammensetzung des TE-Puffers 10 / 0,1

Substanz	Menge
Tris	10 mM
EDTA	0,1 mM
pH-Wert	8,0 (autoklaviert)

Tab. 4.11: Verwendete Primer für die AFLP-Reaktion

MseI-Adapter o	GACGATGAGTCCTGAG
MseI-Adapter u	TACTCAGGACTCAT
HindIII-Adapter o	CTCGTAGACTGCGTACC
HindIII-Adapter u	AGCTGGTACGCAGTCTAC
MseI + A	GACGATGAGTCCTGAGTAAA
HindIII + A	AGACTGCGTACCAGCTTA
MseI (ohne Angabe der drei selektiven Basen, für die Hauptreaktion, s. Tab. 4.8)	GATGAGTCCTGAGTAA
HindIII (ohne Angabe der drei selektiven Basen, für die Hauptreaktion, s. Tab. 4.8)	GACTGCGTACCAGCTT

Auftrennung der Proben im Polyacrylamidgel

Die Auftrennung der Proben erfolgte im Polyacrylamidgel. Die Zugabe der einzelnen Bestandteile erfolgt in der in Tabelle 4.12 angegebenen Reihenfolge. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die dafür vorgesehene Vorrichtung des Sequencers (Gene ReadIR 4200 Li-COR) senkrecht eingehängt und der Probenaschenkamm eingesteckt. Nach der finalen PCR wurden zu jeder Probe 20 µl Ladepuffer (Tab. 4.13) hinzupipettiert und 0,7 µl des Reaktionsmixes nach einer Vorlaufzeit des Gels von ca. 20 min aufgetragen. Die Elektrophoreseparameter waren wie folgt: 1500 V, 35 mA, 35 W, Temperatur 45-50 °C, Frames 10-12.

Tab. 4.12: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels (8 %)

Substanz	Menge
Urea	8,4 g (7,5 M)
H ₂ O	10,6 ml
Rotiphorese [®] NF Acrylamid / Bisacrylamid 20:1 (4 °C, Carl Roth)	4,05 ml (8 %)
Longrun TBE-Puffer s. Tab. 4.14 (4 °C)	1,6 ml 0,8 x TBE
TEMED (4 °C, Sigma Aldrich)	20 µl
Ammoniumpersulfat 10 % (-20 °C)	140 µl

Tab. 4.13: Zusammensetzung des Ladepuffers

Substanz	Menge
Formamid	98 %
EDTA	10 mM
Bromphenolblau	0,025 %
Xylencyanol	0,025 %

Tab. 4.14: Zusammensetzung des Longrun TBE-Puffers

Substanz	Menge
Tris	162 g /l
Borsäure	27,5 g/l
Na ₂ EDTA (pH 8.0)	9,3 g

4.2.8 Statistische Verrechnungen

Die statistische Verrechnung der Daten für Versuch 4.2.4.3 (Vergleich verschiedener Fusionslösungen und -methoden) wurde mit der unter <http://cran.at.r-project.org/> frei erhältlichen Statistik-Programm R durchgeführt. Es handelte sich um einen Paarweisen t-Test mit $p = 0,05$. Die übrigen Versuche ließen auf Grund der Datenlage keine statistische Analyse zu.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Einfluss von R6G und JAA auf die Entwicklung von *Petunia*-Protoplasten

Im Hinblick auf die späteren Fusionen und die damit verbundene notwendige Selektion der Heterofusionsprodukte sollten die Jodacetamid- (JAA) und Rhodamin-Konzentrationen (R6G), bei denen sich die Protoplasten nicht mehr teilen, ermittelt werden (Abb. 4.1, 4.2 und 4.3). In Vorversuchen, in denen die Protoplasten den Hemmstoffen für 15, bzw. 30 min ausgesetzt waren, konnte kein Unterschied hinsichtlich der Einwirkzeit auf die Teilung der Protoplasten beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Aus diesem Grund betrug die Inkubationszeit in allen weiteren Versuchen 15 min.

Die Wirkung von R6G und JAA auf die Entwicklung der *Petunia*-Protoplasten war sehr verschieden. Während bei den untersuchten *Petunia*-Genotypen Pt01 und Pt09 bereits eine R6G-Konzentration von 0,5 mM zu einer starken Reduzierung der Zellteilung nach sieben Tagen auf unter 10 % führte (Abb. 4.2), konnte bei den mit JAA behandelten Protoplasten keine Reduktion der Zellteilung innerhalb dieses Zeitraumes beobachtet werden (Abb. 4.1). Weiter wurde festgestellt, dass die verschiedenen Genotypen unterschiedlich sensitiv auf die Hemmstoffbehandlung reagierten, wie in Abbildung 4.2 nach dreitägiger Kultur zu sehen ist. Während bei Genotyp Pt01 noch Teilung einiger Zellen bei einer R6G-Konzentration von 1,5 mM stattfand, konnte bei Genotyp Pt09 bereits bei einer Konzentration von 1,0 mM keine Teilung mehr beobachtet werden. Besonders nach der Behandlung mit R6G wurde eine Verringerung der Anzahl intakter Protoplasten beobachtet. Dieser negative Effekt von R6G auf die Protoplasten ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Mit steigender Hemmstoffkonzentration nahm der Anteil der intakten Protoplasten kontinuierlich ab. Bei einer Konzentration von 1,0 mM lag der Anteil der intakten Protoplasten bereits unter 10 %. Wurden die Protoplasten mit JAA behandelt, verringerte sich der Anteil der intakten Protoplasten einschließlich der Kontrolle nur um etwa 10 %.

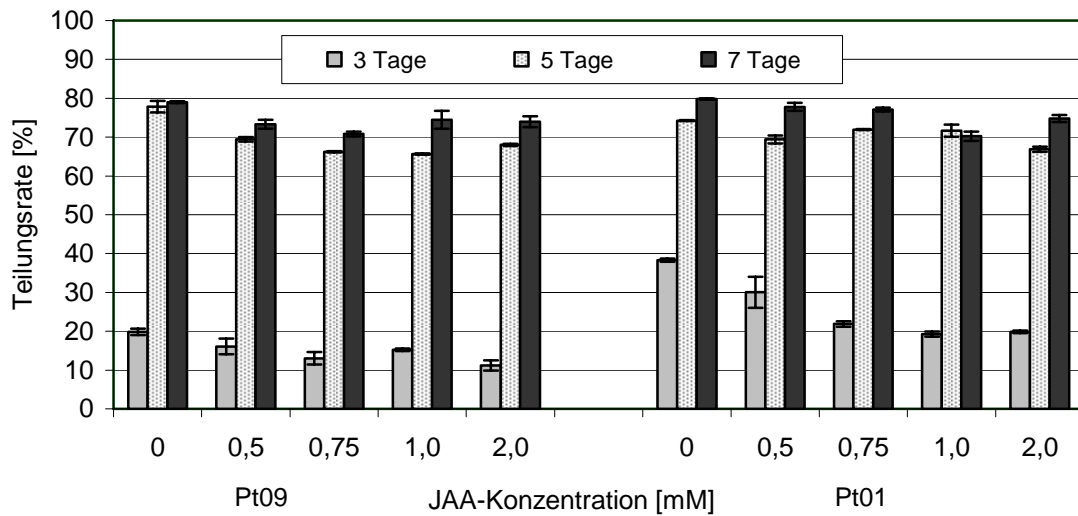


Abb. 4.1: Einfluss steigender Jodacetamid-Konzentrationen auf die Teilung von *Petunia*-Protoplasten nach 3, 5 und 7 Tagen. (Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Wiederholungen)

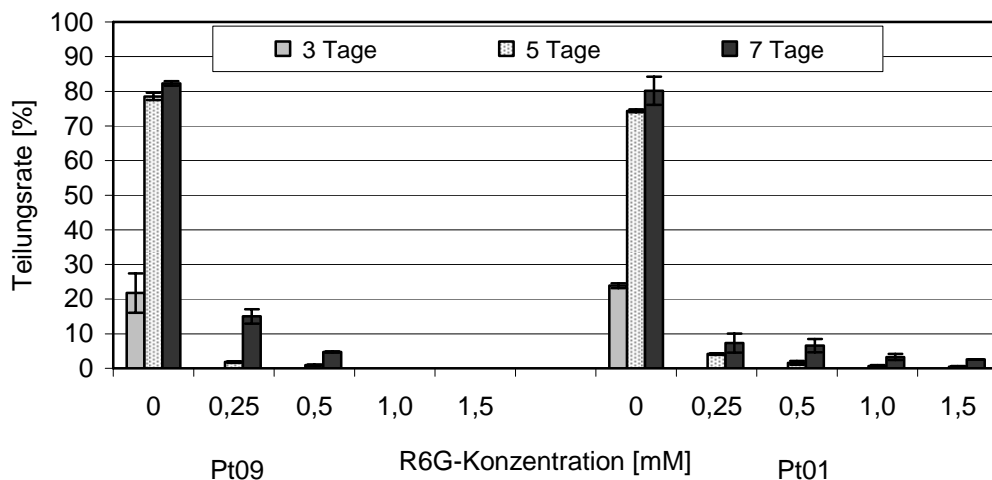


Abb. 4.2: Einfluss steigender Rhodamin 6G-Konzentrationen auf die Teilung von *Petunia*-Protoplasten nach 3, 5 und 7 Tagen. (Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Wiederholungen)

Neben den Unterschieden zwischen den Genotypen wurden z. T. auch starke Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten beobachtet. Aus Abbildung 4.3 geht deutlich hervor, dass bereits in den Kontrollen deutliche Unterschiede in der Höhe der Teilungsraten zwischen den Versuchen vorhanden waren. In diesem Beispiel ist allerdings eine deutliche Tendenz zur Abnahme der Teilung mit steigender Hemmstoffkonzentration festzustellen. In einigen Fällen

wurde aber auch eine höhere Teilungsrate in den mit höheren Konzentrationen behandelten Varianten gefunden als in der Kontrolle, bzw. den mit niedrigen Konzentrationen behandelten Varianten (Ergebnisse nicht dargestellt).

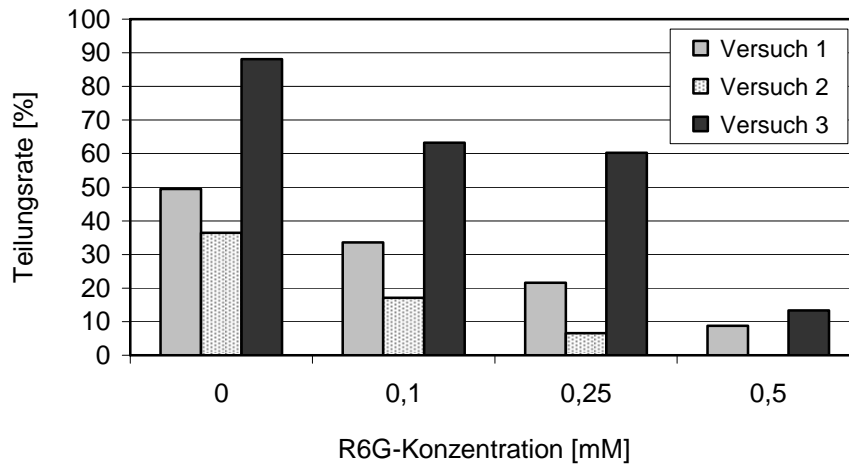


Abb. 4.3: Darstellung der Variation in der Hemmstoffwirkung von Rhodamin 6G auf die Teilung von *Petunia*-Genotyp Pt07 zwischen drei durchgeführten Experimenten nach siebentägiger Kultur.

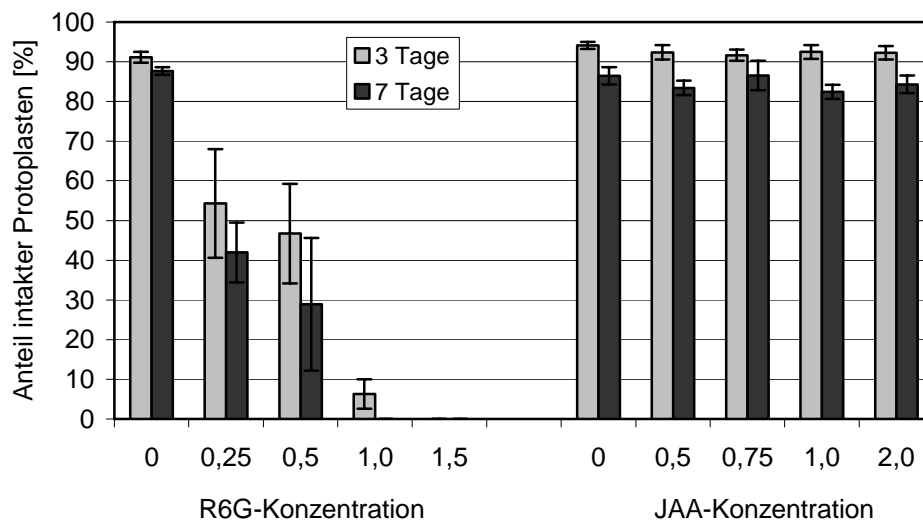


Abb. 4.4: Einfluss der Hemmstoffe R6G und JAA auf den Anteil intakter *Petunia*-Protoplasten (Genotyp Pt09) nach der Behandlung. (Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Wiederholungen)

4.3.2 Einfluss von R6G und JAA auf die Entwicklung von *Calibrachoa*-Protoplasten

Im Gegensatz zu den *Petunia*-Protoplasten konnte bei den mit JAA behandelten *Calibrachoa*-Protoplasten eine Reduktion der Zellteilung bei einigen Genotypen beobachtet werden, wie aus Abbildung 4.5 am Beispiel des Genotyps Ca10 hervorgeht. Allerdings reagierten auch hier die *Calibrachoa*-Genotypen unterschiedlich auf die Hemmstoffbehandlungen. So führte eine JAA Konzentration von 0,4 mM bzw. 0,5 mM bei den Genotypen Ca07 und Ca06 nach neuntägiger Kultur zu einer vollständigen Hemmung der Zellteilung, bzw. zu einer starken Zerstörung der Protoplasten zu diesem Zeitpunkt, während diese Konzentration bei Ca02 und Ca10 kaum negative Auswirkungen hatte. Insgesamt waren die Teilungsraten der untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen Ca02 und Ca10 im Gegensatz zu den untersuchten *Petunia*-Genotypen deutlich niedriger. Dies traf ebenfalls auf die Kontrollen zu.

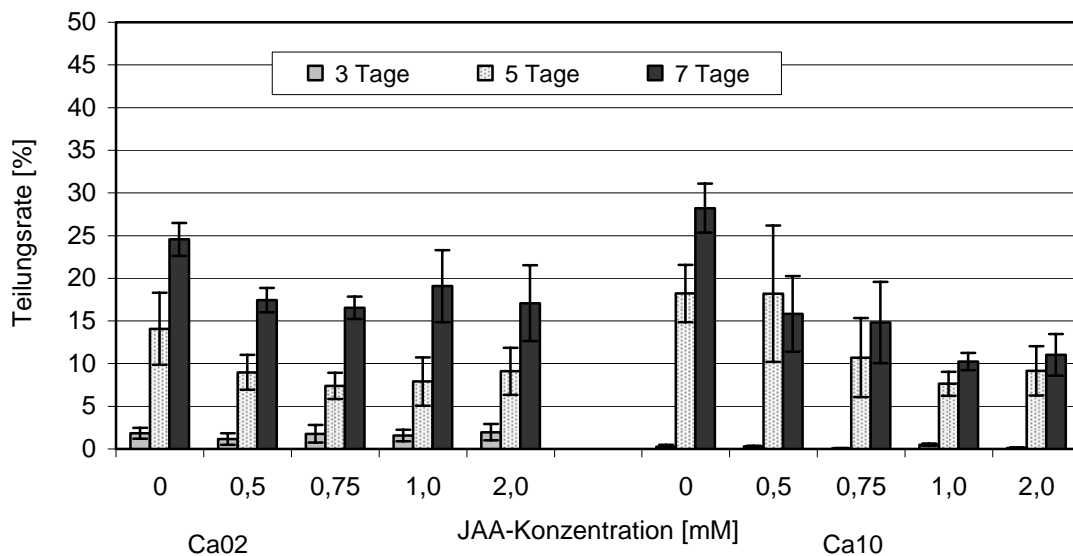


Abb. 4.5: Einfluss steigender Jodacetamid-Konzentrationen auf die Zellteilung in *Calibrachoa*-Protoplastenkulturen nach 3, 5 und 7 Tagen. (Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen)

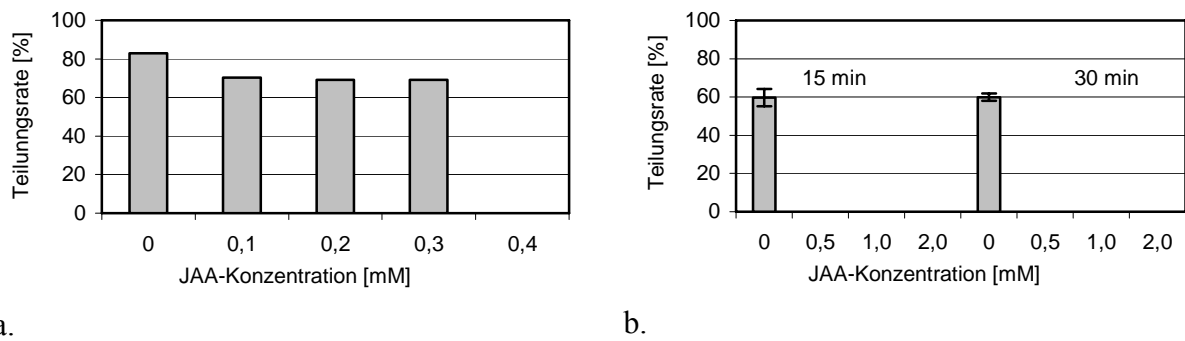


Abb. 4.6: Einfluss steigender JAA-Konzentrationen auf die Zellteilung in *Calibrachoa*-Protoplastenkulturen am Beispiel der Genotypen Ca07 (a) und Ca06 (b) nach neuntägiger Kultur.

Neben den Unterschieden zwischen den Genotypen konnten auch bei den *Calibrachoa*-Protoplasten Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten beobachtet werden, wie aus Abbildung 4.7 am Beispiel des Genotyps Ca08 nach JAA-Behandlung hervorgeht. Besonders in den dargestellten Versuchen zwei und drei konnte keine eindeutige Reduktion der Zellteilung mit steigender JAA-Konzentration festgestellt werden. In Versuch zwei war die Zellteilung in der Variante mit der stärksten Hemmstoffkonzentration höher als in den übrigen Varianten.

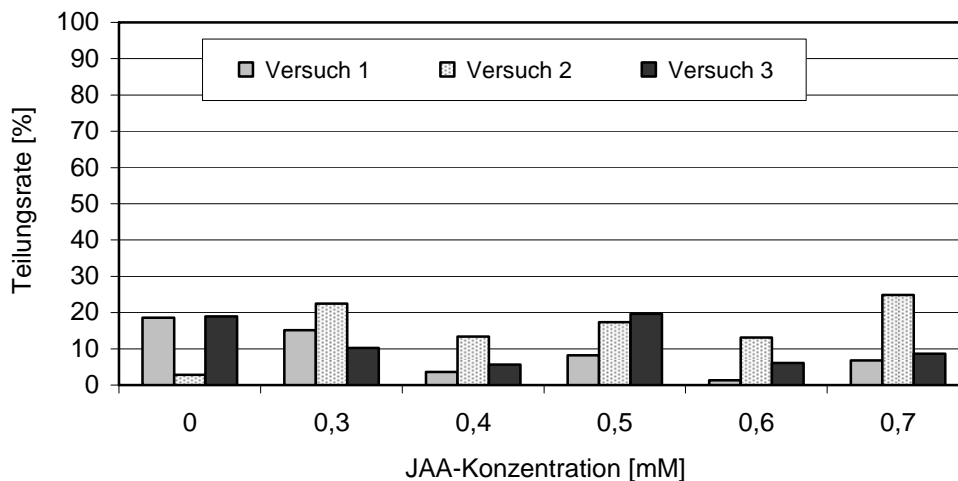


Abb. 4.7: Darstellung der Variation in der Hemmstoffwirkung von Jodacetamid auf die Zellteilung von *Calibrachoa*-Genotyp Ca08 zwischen drei durchgeführten Experimenten nach siebentägiger Kultur.

Die Behandlung der *Calibrachoa*-Protoplasten mit R6G führte bei vielen der *Calibrachoa*-Genotypen bereits bei niedrigen Konzentrationen zu einer vollständigen Zerstörung der Protoplasten wie im Falle der Genotypen Ca02 und Ca10 (Abb. 4.8).

Es zeigte sich, dass die Wirkung der Hemmstoffe sowohl bei den *Petunia*- als auch bei den *Calibrachoa*-Protoplasten zwischen den Genotypen und Versuchen stark variierte, so dass es nicht möglich war, eine generell wirksame R6G- und JAA-Konzentration, bei der sich reproduzierbar keine Protoplasten mehr teilten, zu ermitteln. Vor allem bei dem Hemmstoff Rhodamin 6G hatten hohe Konzentrationen das Absterben, bzw. die Zerstörung der Protoplasten zur Folge. Die *Calibrachoa*-Protoplasten reagierten deutlich stärker auf die R6G- Behandlung als die *Petunia*-Protoplasten. Aus diesem Grunde erfolgte die Hemmung der *Petunia*-Protoplasten in den folgenden Fusionsexperimenten mit R6G. Die *Calibrachoa*-Protoplasten wurden mit JAA behandelt, wobei unterschiedliche Konzentrationen gewählt wurden (siehe Tab. 4.15).

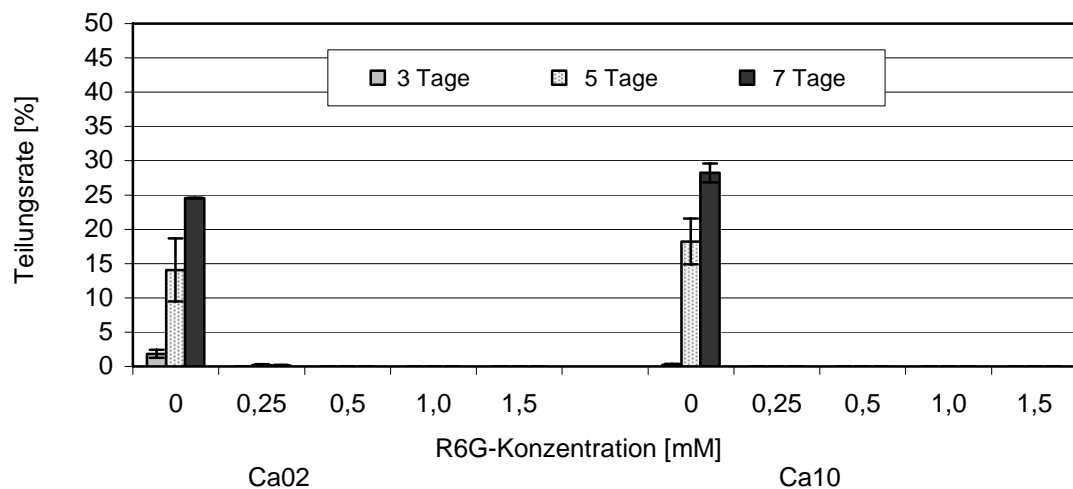


Abb. 4.8: Einfluss steigender Rhodamine-Konzentrationen auf die Teilung von *Calibrachoa*-Protoplastenkulturen nach 3, 5 und 7 Tagen. (Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen)

Am Beispiel der Genotypen Pt09 und Ca07 wurde der Einfluss von R6G bzw. JAA auf den Protoplastendurchmesser untersucht. Die JAA-Behandlung hatte keinen Effekt auf den Protoplastendurchmesser des *Calibrachoa*-Genotypen Ca07, da dieser mit den in der

Kontrolle ermittelten Werten nahezu übereinstimmte. Im Gegensatz dazu führte die R6G-Behandlung bei dem *Petunia*-Genotyp Pt02 zu einer Verringerung des Durchmessers im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Einfluss von R6G auf die Protoplasten konnte in nahezu allen Versuchen beobachtet werden. Nach der R6G-Behandlung konnte eine Volumenabnahme der Protoplasten, sowie eine Reduzierung der intakten Protoplasten beobachtet werden. Bereits ab einer R6G-Konzentration von 0,5 mM waren nach dreitägiger Kultur nur nach ca. 40 % intakter Protoplasten vorhanden. Ab einer Konzentration von 1,0 mM R6G konnten nach dreitägiger Kultur keine intakten Protoplasten beobachtet werden. Die Behandlung der Protoplasten mit JAA führte dagegen in allen Varianten nur zu einer geringen Abnahme der intakten Protoplasten. Diese entsprach in etwa der Abnahme in der Kontrollvariante (Abb. 4.9).

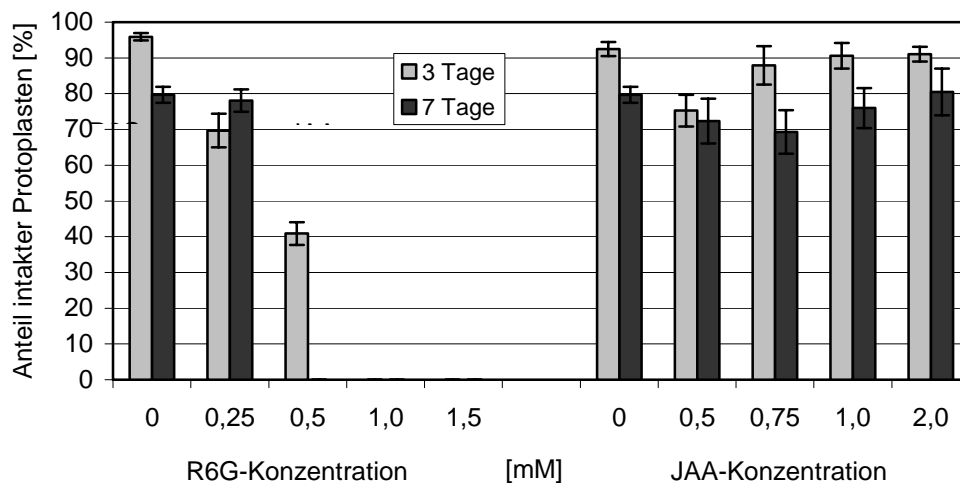


Abb. 4.9: Einfluss der Hemmstoffe R6G und JAA auf den Anteil intakter *Calibrachoa*-Protoplasten, Genotyp Ca02 nach der Behandlung. (Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen)

4.3.3 Fusionsexperimente mit ungehemmten sowie gehemmten Mesophyllprotoplasten

Zunächst wurden die ungehemmten Protoplasten, wie unter 4.2.3 Fusionsprotokoll 1 beschrieben, fusioniert. Unter dem Mikroskop (Zeiss Inversmikroskop IM35) konnten die Aggregation, sowie die beginnende Fusion der Protoplasten verfolgt werden (Abb. 4.11, a und

b). Nach der Zugabe der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung konnte man beobachten, dass sich die Mehrheit der Protoplasten, auch die bereits stark aggregierten, wieder voneinander trennten. Versuchsweise wurden weitere Lösungen (Saccharose 20 %, Pufferlösung oder 8pm7-Medium) hinzupipettiert. In allen Fällen kam es zu einem Anschwellen der Protoplasten und der damit verbundenen Trennung selbiger. Auch eine Aufteilung der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Gaben in kleinere Portionen (100, 100 und 300 μl), bzw. in Zeitintervallen von 5 min brachten keine Änderung. Die Bestimmung der Fusionsfrequenz nach der Fusion konnte nicht durchgeführt werden, da die Zellkerne weder mit Ethidiumbromid nach YE UND EARLE (1991), dies führte zur vollständigen Zerstörung der Protoplasten, noch mit DAPI zufriedenstellend angefärbt werden konnten. Wie aus Abb. 4.10 ersichtlich ist, war es grundsätzlich möglich, auch die Zellkerne fusionierter Protoplasten anzufärben, allerdings wurden, wie ebenfalls aus Abb. 4.10 hervorgeht, nicht alle Zellkerne angefärbt. So wurde beobachtet, dass häufig die Kerne der intakten Protoplasten nicht angefärbt wurden. Freiliegende Kerne bzw. die Kerne der nicht mehr vollständig intakten Protoplasten (s. Abb. 4.10 rechts oben) konnten dagegen problemlos angefärbt werden. Zwar wurde versucht, durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an Triton X 100 (Roth) die Zellen für das DAPI durchlässiger zu machen, doch führte die Zugabe von Triton X 100 gleichzeitig zur Auflösung der Zellen. Zunächst begannen sich die Zellen zu verformen, bis sie schließlich an einer Seite aufsprangen und den Zellinhalt, die Chloroplasten und Zellkerne ins Medium abgaben.

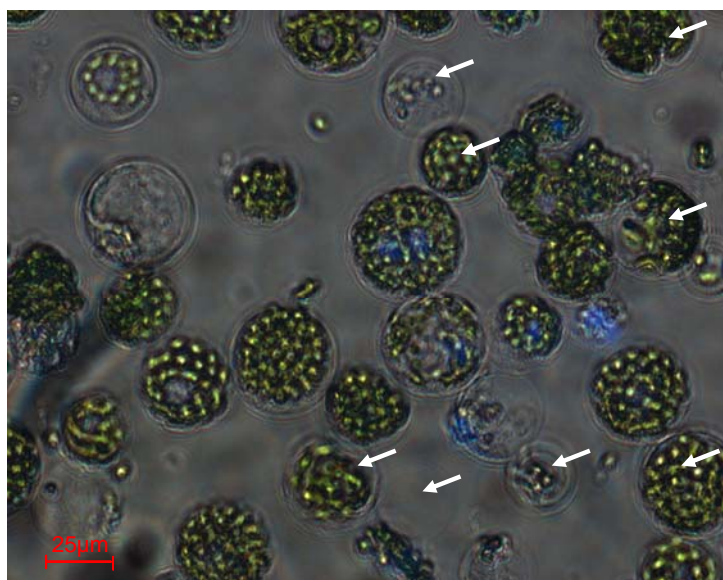


Abb. 4.10: Mit DAPI angefärbte Zellkerne von Protoplasten (Zellkerne blau) unter Fluoreszenzlicht. Weiße Pfeile: Protoplasten, bei denen die Zellkerne nicht angefärbt sind.

Nach der Fusion war der Anteil intakter Protoplasten zum Teil stark verringert, so dass die Dichte der Protoplasten nach erfolgter Fusion neu eingestellt werden musste. Aus den ungehemmten Fusionsansätzen konnte eine hohe Anzahl an Kallussen regeneriert werden. Aus einem der Fusionsexperimente (Fusionskombination Ca03 + Pt02) wurde ein Teil der Kallusse (ca. 300) bis zur Sprossregeneration weiterkultiviert und die regenerierten Sprosse vermehrt. Ein Teil dieser Sprosse wurde zur Begutachtung ins Gewächshaus überführt, der andere Teil wurde molekulargenetisch untersucht (s. Tab. 4.17). Alle weiteren Experimente wurden nach dem Mikrokallusstadium (soweit dieses erreicht wurde), nachdem deutlich wurde, dass sich aus den verschiedenen Fusionskombinationen eine hohe Anzahl an Kallussen entwickeln würde, abgebrochen. Aus diesem Grund wurden die Protoplasten in den folgenden Versuchen mit Rhodamin 6G und Jodacetamid behandelt.

Zu Beginn der Fusionsexperimente wurden die *Petunia*-Protoplasten mit einer R6G-Konzentration von 0,65 mM und die *Calibrachoa*-Protoplasten mit einer JAA-Konzentration von 0,55 mM behandelt. Die Hemmstoffkonzentrationen wurden zunächst niedriger als die in den Vorversuchen ermittelten gewählt, da die Wirkung des Hemmstoffes auf die Protoplasten in Verbindung mit der Fusionsbehandlung, welche ebenfalls eine starke Belastung für die Protoplasten darstellt, noch nicht untersucht worden war, und die Akkumulation möglicher negativer Effekte nicht ausgeschlossen werden konnte.

Nach einigen Fusionsexperimenten stellte sich jedoch heraus, dass diese Konzentrationen bei den besonders toleranten Genotypen zu niedrig gewählt waren, so dass sich die Protoplasten in den mit R6G-, bzw. JAA- behandelten Kontrollen teilten. In den Fusionsvarianten war es aber zum Teil so, dass nach der Behandlung der Protoplasten mit niedrigen Hemmstoffgehalten und anschließender Fusion bereits direkt nach der Fusion, bzw. innerhalb kurzer Zeit alle Protoplasten zerstört waren bzw. nur wenige intakte Protoplasten beobachtet wurden. Es gab aber auch Versuche, in denen eine Vielzahl an Kallussen regeneriert wurde, sowie ein Versuch der zu einer hohen Anzahl an regenerierten Sprossen führte. In fast allen Kontrollen ohne Hemmstoff-Behandlung teilten sich die Protoplasten und entwickelten sich zu Kallussen. In neun Experimenten kam es nach der Fusion zur Teilung der Protoplasten und zur Kallusbildung. Sprossregeneration wurde nur in drei Experimenten beobachtet, wobei die Sprossregeneration in zwei Fällen sehr gering war. Nur aus einem Versuch konnte eine Vielzahl an Sprossen regeneriert werden, allerdings teilten sich in diesem Versuch auch die mit Hemmstoffen behandelten Kontrollen. In Tabelle 4.16 ist ein Teil der durchgeführten Fusionsexperimente, sowie die Anzahl der regenerierten Sprosse aufgeführt. Durch die Behandlung der Protoplasten mit Rhodamin 6G, diese hatte teilweise eine Veränderung der

Chloroplastenfärbung zur Folge, war es in einigen Fusionsexperimenten möglich die Fusion von heterologen Protoplasten zu verfolgen (Abb. 4.11 c).

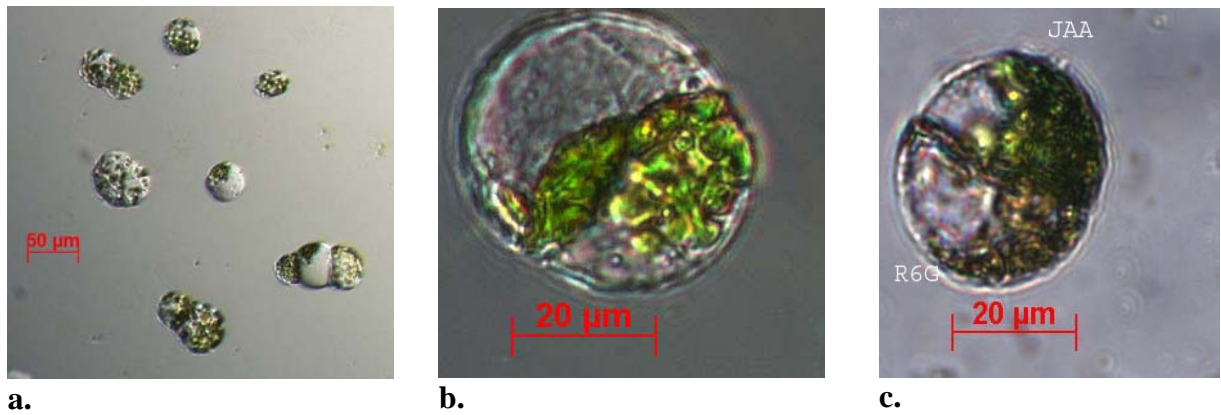


Abb. 4.11: a: Aggregation der Protoplasten in der PEG-Lösung, b: Protoplastenfusion zwischen ungehemmten *Calibrachoa*- und *Petunia* Mesophyllprotoplasten, c: Protoplastenfusion zwischen mit R6G behandelten *Petunia*- (Pt09) und mit JAA behandelten *Calibrachoa*-Mesophyllprotoplasten (Ca03).

Tab. 4.15: Liste der durchgeführten Fusionsexperimente, bei denen die Protoplasten mit Hemmstoffen behandelt wurden.

Experiment Nr.	Fusionspartner	Fusionsmethode	Konzentration R6G [mM] für <i>Petunia</i>	Konzentration JAA [mM] für <i>Calibrachoa</i>	Entwicklung der Protoplasten nach der Fusion	Geteilte Protoplasten in den Hemmstoffkontrollen	Kallusbildung in den Fusionsvarianten	Sprossregeneration und Anzahl regenerierter Sprosse
B1	Ca07+Pt09	1	0,55	0,55	Intakte, aber nach 26 Tagen abgestorben.	nein	nein	nein
B2	Ca07+Pt09	1	0,55	0,55	Viele Intakte und sich teilende Protoplasten	JAA viele Geteilte, R6G wenige Geteilte	ja	Sehr viele Sprosse, während der Kultur wurden ca. 100 Sprosse selektiert.
B3	Ca07+ Pt09	1	0,55	0,55	Zu Beginn einige Intakte, später alle zerstört.	R6G, keine Geteilten, fast alle zerstört. JAA Geteilte	nein	nein
B4	Ca07+Pt09	1	0,55 0,65	0,55 0,65	Zu Anfang viele Intakte, einige Geteilte, später alle zerstört, abgestorben	JAA und R6G keine Geteilten, fast alle zerstört	nein	nein
B5	Ca07+Pt09	1	0,7	0,7	Viele Intakte, aber keine Geteilten, sind später abgestorben	JAAGgeteilte, R6G keine Geteilten	nein	nein
B6	Ca07+Pt09	1	1,1	-	Viele Intakte, Geteilte	R6G, keine Geteilten	ja	nein
B7	Ca07+Pt02	1	0,9	0,8	Einige Intakte, aber nach 6 Tagen alle kaputt	JAA und R6G, nach 6 Tagen alle zerstört	nein	nein
B8	Ca07+Pt02	1	1,1	-	Viele Intakte, Geteilte	R6G, keine Geteilten	ja	nein

Experiment Nr.	Fusionspartner	Fusionsmethode	Konzentration R6G [mM] für <i>Petunia</i>	Konzentration JAA [mM] für <i>Calibrachoa</i>	Entwicklung der Protoplasten nach der Fusion	Geteilte Protoplasten in den Hemmstoffkontrollen	Kallusbildung In den Fusionsvarianten	Sprossregeneration und Anzahl regenerierter Sprosse
B9	Ca07+Pt03	1	0,65	0,65	Intakte und Geteilte Protoplasten	JAA und R6G keine Geteilten	ja	nein
B10	Ca07+Pt03	1	0,8	-	Viele Intakte und Geteilte	R6G alle zerstört	ja	4 Sprosse
B11	Ca03+Pt02	1	0,65	0,65	Einige wenige Intakte, später abgestorben	JAA, keine Geteilten, R6G viele Geteilte	nein	nein
B12	Ca03+Pt02	1	1	3,75	Nach der Fusion viele intakte Protoplasten. Nach 8 Tagen waren alle zerstört.	Bis zum achten Tag keine Geteilten. Danach wurde nicht weiter beobachtet	nein	nein
B13	Ca03+Pt02	1	1,1	-	Viele Intakte, einige Geteilte	R6G fast alle zerstört nach einigen Tagen	ja	nein
B14	Ca03+Pt01	1	0,65	0,65	Einige Geteilte, später abgestorben	JAA und R6G Geteilte	nein	nein
B15	Ca03+Pt09	1	1,1	-	Viele Intakte, Geteilte	R6G, keine Geteilten	ja	2 Sprosse
B16	Ca03+Pt10	1	1,1	-	Nach 7 Tagen alle abgestorben	R6G keine Geteilten	ja	nein
B17	Ca02+Pt09	1	0,7	0,7	Mehrheit der Protoplasten intakt.	JAA, Geteilte R6G keine Geteilten	ja	nein
B18	Ca02+Pt09	1	1,5	2,5 und 5	Viele Intakte, aber nach 5 Tagen fast alle kaputt	JAA 2,5mM einige Geteilte, JAA 5mM alle zerstört. R6G keine Geteilten	nein	nein

Experiment Nr.	Fusionspartner	Fusionsmethode	Konzentration R6G [mM] für <i>Petunia</i>	Konzentration JAA [mM] für <i>Calibrachoa</i>	Entwicklung der Protoplasten nach der Fusion	Geteilte Protoplasten in den Hemmstoffkontrollen	Kallusbildung In den Fusionsvarianten	Sprossregeneration und Anzahl regenerierter Sprosse
B19	Ca02+Pt09	1	1,25	-	Nach wenigen Tagen alle zerstört	R6G alle zerstört	ja	nein
B20	Ca02+Pt09	1	1,1	-	Sehr viele Intakte, Mehrheit aber nach 6 Tagen abgestorben	R6G, keine Geteilten	ja	nein
B23	Ca12+Pt08	1	0,55	0,6	Wenige Intakte, aber nach 15 Tagen alle kaputt.	R6G keine Geteilten, JAA Geteilte	nein	nein
B24	Ca12+Pt02	1	0,65	0,65	Alle Protoplasten zerstört	JAA, Mehrheit geteilt, R6G fast alle zerstört, keine Geteilten	nein	nein
B25	Ca08+Pt03 Ca10+Pt02	1	0,65	0,55	Intakte, aber nach 16 Tagen waren alle abgestorben.	nein	nein	nein

1 = 30 % PEG und pH Wert 8,6

4.3.4 Fusionsexperimente mit Petalenprotoplasten

Zunächst wurden die Protoplasten wie unter 4.2.3 (Fusionsprotokoll 1) beschrieben fusioniert. Nach der Zugabe der Ca/pH-Lösung wechselte die Farbe der Petalenprotoplasten von violett bzw. magenta zu blau. Nach Zugabe der Pufferlösung nahmen die Protoplasten wieder ihre ursprüngliche Farbe an. Durch die Verwendung von Blütenprotoplasten als Fusionspartner war es nun möglich, Heterofusionsraten nach der Fusion zu bestimmen (Abb. 4.13 a und b). Die Fusionsraten in diesen Versuchen lagen allerdings bei der Mehrzahl der Experimente um 1 %, bzw. noch darunter. Dies zeigte, dass die bisher gewählte Fusionsmethode nicht effektiv genug war.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Protoplasten wie unter 4.2.3 (Fusionsprotokoll 2) beschriebenen fusioniert. Während der Fusion konnte beobachtet werden, dass sich die Petalenprotoplasten wesentlich schneller am Boden der Petrischale absetzten als die Mesophyllprotoplasten. Auch bei dieser Fusionsmethode konnte eine Verringerung der Anzahl der intakten Protoplasten beobachtet werden. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Fusionsmethode änderten die Petalenprotoplasten ihre Farbe nach der Zugabe der Pufferlösung bzw. des 8pm7-Mediums nicht. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Protoplasten, die dicht gedrängt am Boden der Petrischale hafteten, nach Zugabe dieser Lösungen an Volumen zunahmten und es dadurch zum Zerplatzen einiger dieser Protoplasten kam. Als besonders schwierig erwies sich, ebenso wie bei der normalen Protoplastenkultur, die Sprossregeneration. Eine hohe Sprossregeneration wurde nur beobachtet, wenn beide der an der Fusion beteiligten Eltern Sprosse regenerierten. Im Gegensatz zur normalen Protoplastenkultur konnte nach erfolgter Fusion die Regeneration von Sprossen bei Genotypen beobachtet werden, die in den vorangegangenen Untersuchungen (z. B. Genotyp Ca07, Fusionsexperiment C6, Tab. 4.17) zur Sprossregeneration keine Sprosse regenerierten.

4.3.4.1 Ermittlung der Heterofusionsraten für verschiedene Fusionskombinationen

Durch die Veränderung der Fusionsmethode konnten mit dem unter 4.2.4 beschriebenen Fusionsprotokoll 2, deutlich höhere Fusionsraten erzielt werden. In Abbildung 4.12 sind die Heterofusionsraten für verschiedene Fusionskombinationen dargestellt, sie lagen zwischen 3,8 % und 8,9 %. In einzelnen Versuchen konnten Fusionsraten bis zu 17 % erzielt werden. Wie

aus Abbildung 4.12 zu entnehmen ist, schwankten die Heterofusionsraten innerhalb der Fusionskombinationen zwischen einzelnen Experimenten. Diese Unterschiede waren jedoch für alle Fusionskombinationen ähnlich, was anhand der in Abb. 4.12 dargestellten Standardabweichungen deutlich wird. Einige Fusionskombinationen wie die Kombinationen Ca10 + Pt03, Ca10 + Pt07 oder Ca07 + Pt06 weisen im Durchschnitt höhere Fusionsraten als z. B. die Kombinationen Ca10 + Pt06 oder Ca05 + Pt06 auf (Abb. 4.12). Es ist jedoch schwierig auf Grund dieser Ergebnisse Aussagen darüber zu treffen, ob ein Partner besonders gut geeignet ist. Wurde *Petunia*-Genotyp Pt07 z. B. mit *Calibrachoa*-Genotyp Ca10 fusioniert betrug die Heterofusionsrate 8 %. Wurde er stattdessen mit Ca03 fusioniert betrug die Heterofusionsrate nur noch 5,5 %.

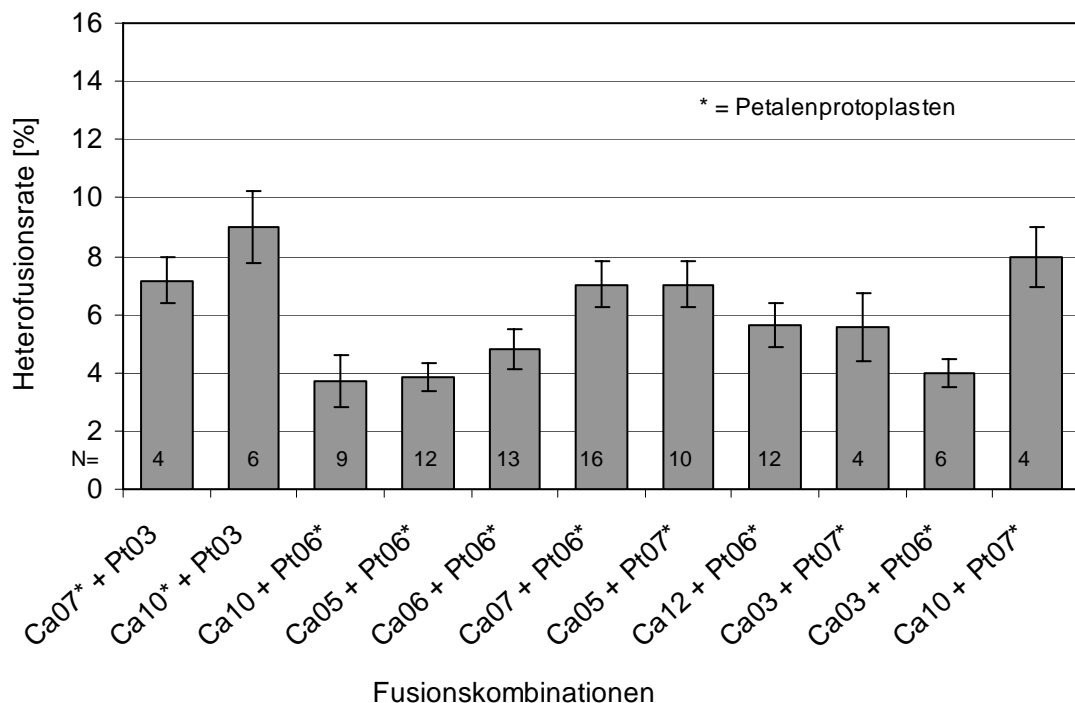


Abb. 4.12: Ermittlung der Heterofusionsraten für verschiedene Fusionskombinationen. (Dargestellt sind Mittelwerte aus N Wiederholungen sowie die Standardabweichungen)

Zunächst wurden die Protoplasten nur fusioniert und weiterkultiviert, um zu sehen ob die heterologen Fusionsprodukte teilungsfähig waren. Nach vier bis fünf Tagen konnten die ersten Teilungen beobachtet werden, allerdings nahm die durch die Petalenprotoplasten verursachte Färbung mit jeder weiteren Teilung ab. Dadurch bedingt war eine weitere Beobachtung, bzw. anschließende Selektion der heterologen Fusionsprodukte über das Mikrokallusstadium hinaus nicht mehr möglich. Die Mikrokallusse eines Fusionsansatzes (Ca12 + P04), bei dem die Heterofusionsrate 13 % betrug, wurden weiterkultiviert und zur

Sprossregeneration auf Sprossregenerationsmedium (Pet H, s. Tab. 3.5) überführt. Insgesamt wurden ca. 350 Kallusse plattiert. Ein Teil dieser Kallusse wurde molekulargenetisch wie in Abschnitt 4.3.6.2 beschrieben mittels RAPD-Primern untersucht. Nur acht davon regenerierten nach ca. acht bis zehn Wochen Sprosse. Morphologisch sahen diese wie der *Calibrachoa*-Elter aus.

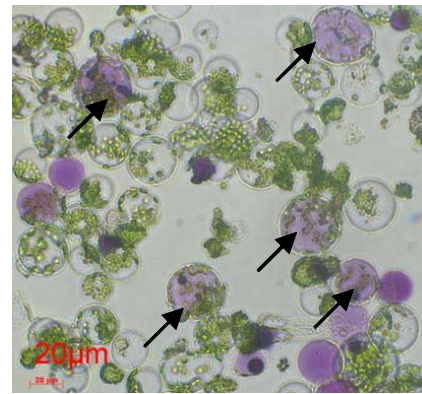
4.3.4.2 Selektion der heterologen Fusionsprodukte mittels Cell Finder Objektträger

Mit Hilfe der "Cell Finder"-Objektträger war es möglich, die nach der Fusion (Fusionsprotokoll 2) als heterologe Fusionsprodukte identifizierten Protoplasten im Mikrokallusstadium anhand ihrer Koordinaten auf dem Träger mit einer Präpariernadel unter dem Stereomikroskop (Zeiss) zu selektieren und zu isolieren (Abb. 4.13 a-d). Allerdings bereitete die Fixierung der Agarosefilme auf dem Träger teilweise Probleme. In einigen Fällen kam es beim Transport der Petrischalen, welcher sich nicht vermeiden ließ, zum Verrutschen des Filmes. Aus diesem Grund wurden auch die Kallusse der benachbarten Quadrate isoliert. Die selektierten Mikrokallusse wurden wie unter 4.2.3 beschrieben weiterkultiviert. Die Überführung der Kallusse auf die mit Agarose verfestigten Medien führte zu einem schnellen Wachstum der Kallusse.

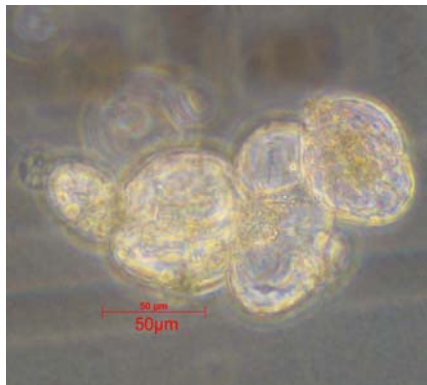
Ca. 80-90 % der überführten Kallusse entwickelten sich nach der Überführung weiter



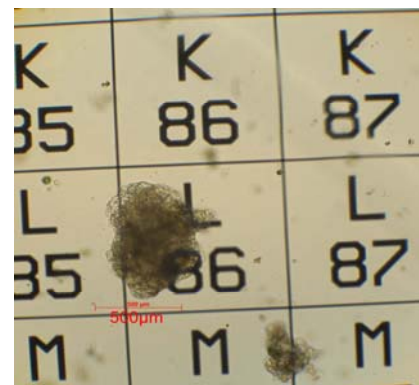
a.



b.



c.



d.

Abb. 4.13: a: Protoplastenfusion zwischen *Calibrachoa*-Mesophyllprotoplast (Ca02) und *Petunia*-Petalenprotoplast (P04); b: Überblick der Fusion von Protoplasten der Genotypen Pt06 und Ca07, heterologe Fusionsprodukte sind durch Pfeile gekennzeichnet; c: als Mikrokallus (Pt06 und Ca07); d: auf Cell-Finder-Objektträgern herangewachsene Kallusse (Pt06 und Ca07).

4.3.4.3 Vergleich verschiedener Fusionslösungen und -methoden

Nachdem es durch die Verwendung der Petalenprotoplasten möglich war, die Heterofusionsraten zu bestimmen und die mutmaßlich heterologen Fusionsprodukte mit Hilfe der "Cell finder"-Objekträger zu selektieren, wurden in einem weiteren Versuch verschiedene PEG-Lösungen, bzw. Fusionsmethoden miteinander verglichen (Abb. 4.14). Wie der Vergleich zeigte, wurden keine Heterofusionen in Variante 5 (Abb. 4.1), der zu Beginn der Arbeit gewählten Fusionsmethode (Fusionsprotokoll 1) gezählt. In dieser Variante wurden die Protoplasten mit einer $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung anstelle von 8pm7-Medium behandelt. Zudem wurden in dieser Variante im Vergleich zu den übrigen Varianten eine höhere Anzahl nicht intakter Protoplasten beobachtet. Die höchsten Fusionsraten ließen sich dagegen erzielen, wenn die PEG-Lösung 30 % PEG (MW6000), 2,36 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 10,93 g Mannitol und 2,6 g HEPES-Puffer je 100 ml A. bidest (pH-Wert von 9,5), Varianten 3 und 4, enthielt (Abb. 4.1). Wurde die PEG-Lösung wie in Variante 1 (Abb. 4.1) filtersterilisiert, waren die Heterofusionsraten im Gegensatz zu der autoklavierten Variante 2 (Abb. 4.1) etwas höher. In den Varianten 3 und 4 schien die Art der Sterilisation der PEG-Lösung dagegen keinen Effekt auf die Heterofusionsraten zu haben.

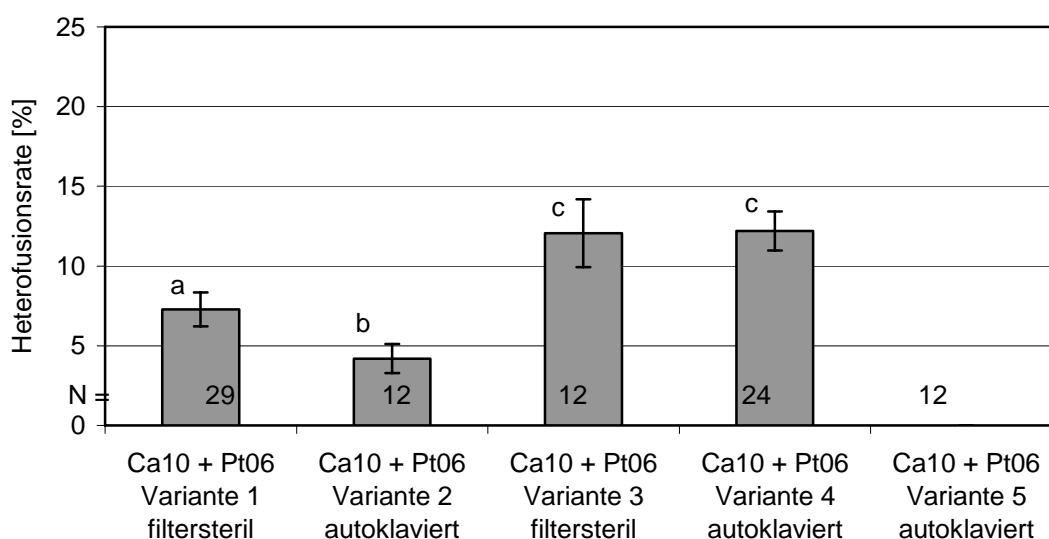


Abb. 4.14: Vergleich verschiedener Fusionsmethoden und PEG-Lösungen im Hinblick auf die erzielten Heterofusionsraten. Variantenbeschreibung siehe Tab. 5.1 (dargestellt sind die Mittelwerte aus N Wiederholungen sowie die Standardabweichungen, Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nach dem paarweisen t-Test bei $p = 0,05$ nicht signifikant voneinander).

4.3.5 Kultur der fusionierter Protoplasten

Die Protoplasten sollten zunächst wie unter 3.2.4.2 beschrieben in Alginat kultiviert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Einbettung der Protoplasten in Alginat zur Zerstörung der Protoplasten führte. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Protoplasten direkt nach der Fusion oder nach einer Wartezeit von zwei Tagen eingebettet wurden. Da eine Flüssigkultur der Protoplasten ebenfalls möglich war, wurden die fusionierten Protoplasten daraufhin in flüssigem Medium wie unter 3.2.4.1 beschrieben kultiviert. Bereits nach drei Tagen setzten die ersten Zellteilungen bei den Mesophyllprotoplasten ein. Etwa zeitgleich begannen sich auch die Protoplasten zu teilen, welche auf eine Fusion zwischen Petalenprotoplasten und Mesophyllprotoplasten zurückgingen. Die Teilung der Petalenprotoplasten setzte dagegen erst ca. zwei Tage später ein. Es konnte eine zügige Kallusbildung beobachtet werden. Diese wurde ebenso bei den in Agarose eingebetteten und auf "Cell Finder"-Objektträger kultivierten Protoplasten beobachtet. Die Einbettung in Agarose nach zwei- bis dreitägiger Kultur in flüssigem Medium wirkte sich im Gegensatz zu der Einbettung in Alginat nicht negativ auf die Protoplasten aus. Die Protoplasten schienen sich ebenso gut in Agarose wie in Flüssigkultur zu entwickeln. Der Transfer der Mikrokalluse auf das mit Agarose verfestigte 8pm7-Medium bereitete ebenso wie das Wachstum der sehr kleinen Kalluse, die trotz ihrer geringen Größe in 80-90 % der Fälle weiter wuchsen, keine Probleme.

Als besonders schwierig erwies sich, ebenso wie bei der normalen Protoplastenkultur, die Sprossregeneration. Eine hohe Sprossregeneration wurde nur beobachtet, wenn beide der an der Fusion beteiligten Eltern Sprosse regenerierten. Im Gegensatz zur normalen Protoplastenkultur konnte nach erfolgter Fusion die Regeneration von Sprossen bei Genotypen beobachtet werden, die in den vorangegangenen Untersuchungen zur Sprossregeneration keine Sprosse regenerierten (Ca07).

4.3.6 Durchflusscytometrische Untersuchung der Fusionssprosse aus Fusionen mit gehemmten Protoplasten

Aus Fusionsexperiment B2 (Pt09 + Ca07, s.Tab. 4.15) regenerierte eine große Anzahl an Sprossen. Diese wiesen morphologisch eine große Ähnlichkeit zu dem *Petunia* Elter auf. Allerdings zeigten einige dieser Sprosse deutliche Anzeichen einer Polyploidisierung. Dies äußerte sich in einem langsameren Wuchs dieser Sprosse sowohl in vitro als auch ex vitro und kleineren, deformierten Blättern, bzw. besonders großen und dicken Blättern einhergehend mit einer vergrößerten, z. T. deformierten Blüte wie in Abbildung 4.16 dargestellt. Die aus diesem Experiment regenerierten Sprosse wurden durchflusscytometrisch untersucht. Bei der Mehrzahl der untersuchten Pflanzen handelte es sich um Diploide (57). Allerdings konnten auch andere Ploidiestufen wie z. B. tetraploide (22) und hexaploide (3) *Petunia*-Pflanzen nachgewiesen werden wie Abbildung 4.15 zeigt.

Bei den aus Fusionsexperiment C6 (Ca07 + Pt06, s. Tab. 4.17) regenerierten Sprossen handelte es sich bei den mittels Durchflusscytometrie untersuchten 25 Sprossen um tetraploide Sprosse. Die Sprosse zeigten eine morphologisch weitestgehende Übereinstimmung mit dem *Calibrachoa*-Elter.

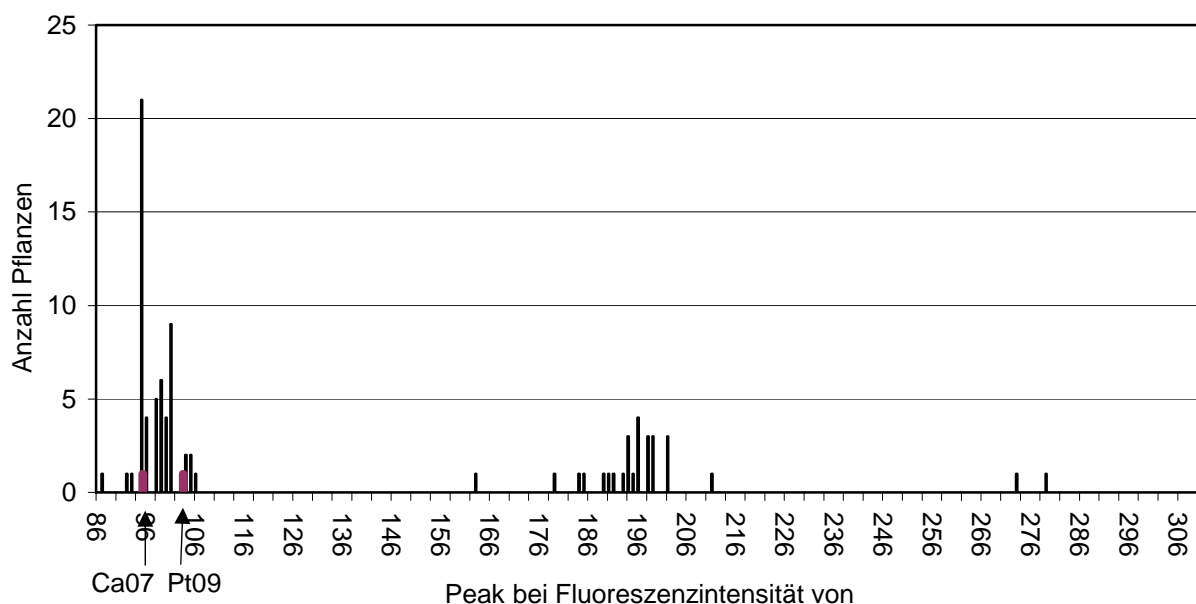


Abb. 4.15: Durchflusscytometrische Untersuchung der regenerierten Sprosse aus der Fusion zwischen dem *Calibrachoa*-Genotyp Ca07 und dem *Petunia*-Genotypen Pt09.



Abb. 4.16: Abweichung der Regenerate aus Protoplastenfusion vom Ausgangsphänotyp Pt09 (links im Bild).



Abb. 4.17: Abweichung der Regenerate aus Protoplastenfusion vom Ausgangsphänotyp Pt09 (links im Bild).

4.3.7 Molekulargenetische Untersuchungen

4.3.7.1 Molekulargenetische Untersuchung der aus Fusionsexperimenten mit ungehemmten und gehemmt Mesophyllprotoplasten regenerierten Sprosse mittels RAPD-Analyse

Die Fusion der Protoplasten erfolgte nach dem zuerst gewählten und unter 4.2.3 beschriebenen Fusionsprotokoll 1. Die aus den Fusionsexperimenten regenerierten Sprosse wurden mit RAPD-Markern untersucht und anschließend ins Gewächshaus zur visuellen Betrachtung überführt. Keiner der Sprosse konnte mittels RAPD-PCR als Hybridspross identifiziert werden. Bei den regenerierten Sprossen handelte es sich um Sprosse eines Elters (Tab. 4.16). Einige der regenerierten Pflanzen wiesen Merkmale einer Polyploidisierung wie z. B. stärker gefüllte Blüten, dicke, fleischige und größere Blätter auf. Auf den Ergebnissen der Durchflusscytometrie basierend (siehe 4.3.6), wurden diejenigen Sprosse, welche auffällige DNA-Gehalte zeigten, ebenfalls mit RAPD-Primern untersucht. Alle untersuchten Sprosse konnten eindeutig dem *Petunia*-Elter zugeordnet werden (B2, s. Tab. 4.16). In einem Fall war das Bandenmuster nicht völlig identisch, hier fehlte eine Bande (Daten nicht dargestellt).

Tab. 4.16: Mittels RAPD-Analyse untersuchte Fusionsprosse

Nr.	Fusions-Kombinationen	Anzahl untersuchte Kallusse / Sprosse	Anzahl der Banden-Muster, die dem <i>Petunia</i> -Elter entsprachen	Anzahl der Bandenmuster, die dem <i>Calibrachoa</i> -Elter entsprachen	Mögliche Hybriden bzw. Bandenmuster, die keinem der Eltern zugeordnet werden konnten
A1	Pt02 + Ca03 ungehemmt	10 Sprosse	0	10	0
B2	Pt09 + Ca07 gehemmt s. Tab. 4.15	8 Sprosse	8	0	0
B10	Pt03 + Ca07 gehemmt s. Tab. 4.15	4 Sprosse	4	0	0
B15	Pt09 + Ca03 gehemmt s. Tab. 4.15	2 Sprosse	2	0	0

4.3.7.2 Molekulargenetische Untersuchung der aus Fusionsexperimenten mit Petalenprotoplasten regenerierten Sprosse mittels RAPD-Analyse

Tab. 4.17: Molekulargenetisch untersuchte Fusionskombinationen

Fusions-experiment Nr.	Fusionskombination	Fusionskallus Nr.
C1	P04* + Ca12 (ungehemmt)	235, 223, 230, z, 256, 254, d, 12, 6, 4, 243, 245, 249, 246, 242, 241, 247, 240
C2	Pt07* + Ca10 (ungehemmt)	1a, 4a, 5a
C3	Pt07* + Ca10 (ungehemmt, "Cell- Finder"* ¹)	12F, 28F, 1F, 2F, 3F, 4F, 8F, 22F, 8c, 4j, 1j, 8j, 5j, 9j, 4ab
C4	Pt07* + Ca10 (ungehemmt, "Cell- Finder"* ¹)	17F, 12h, 1h, 5h, 3a, 1g, 16g, 9i, 2i, 10i, 6i, 3o, 8g
C5	Pt01* + Ca10 (ungehemmt, "Cell- Finder"* ¹)	F10
C6	Pt06* + Ca07 (ungehemmt, "Cell- Finder"* ¹)	55, 46, 97, 58, 51, 32, 33, 23, 24, 16, 35, 25, 20
C7	Pt06* + Ca07 (ungehemmt, ("Cell Finder"* ¹)	26,42, 24

* Petalenprotoplasten-Elter

*¹ Kallusse wurden wie unter 4.2.4.2 bzw. 4.3.4.2 beschrieben mittels "Cell Finder"-Objektträgern selektiert

Den aus den Fusionsexperimenten (Fusionsprotokoll 2, s. 4.2.4) regenerierten Kallussen wurden Nummern bzw. Buchstaben oder eine Kombination aus beidem zugeordnet. Für einen besseren Überblick über die im folgenden beschriebenen Fusionsexperimente sind in Tabelle 4.17 die Fusionsexperimente, -kombinationen sowie Fusionskallusse mit Bezeichnung aufgelistet.

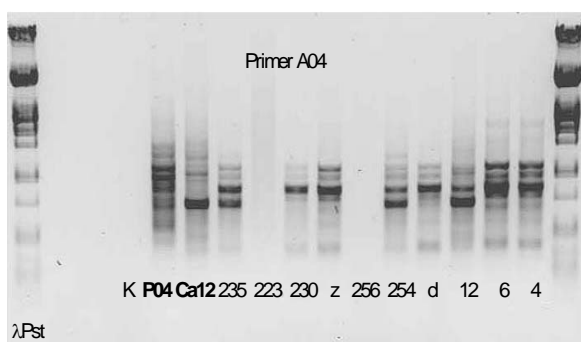
Mit Ausnahme der aus Fusionsexperiment C1 (P04 + Ca12) stammenden tiefgefrorenen Kallusse konnte aus fast allen Kallussen erfolgreich DNA mit dem Quiagen Kit bzw. der Methode nach DOROKOV UND KLOCKE (1997) isoliert werden. Bei diesen handelte es sich um Material, das vor der Isolierung bei -80 gelagert wurde. Teilweise wiesen die Kallusse zum

Zeitpunkt des Einfrierens bereits deutliche Verbräunungen auf, was ein Hinweis auf abgestorbenes Gewebe war.

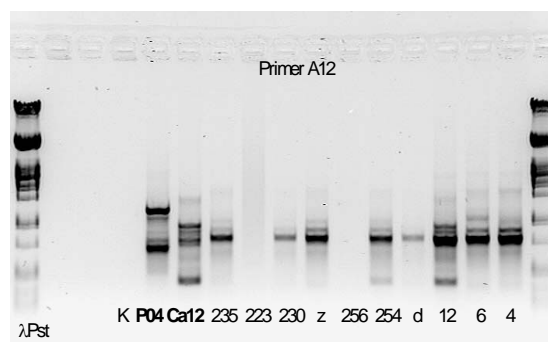
Die DNA-Ausbeute der aus Fusionsexperiment C1 (P04 + Ca12) stammenden Kallusse war im Vergleich zu den übrigen Isolierungen deutlich geringer. Bei einer hohen Anzahl der untersuchten Kallusse wurde keine DNA bei der Konzentrationsbestimmung nachgewiesen.

Insgesamt wurden 29 der aus dieser Fusionskombination regenerierten Kallusse mittels RAPD-Primern (A04, A09 und A12, Primersequenzen siehe Kapitel 2, Tab. 2.3) untersucht.

Wurden die Primer A04 und A12 für die PCR-Reaktion eingesetzt, so konnten bei einem Großteil der untersuchten Kallusse, die dem Fusionsexperiment C1 (P04 + Ca12) entstammten, die amplifizierten Bandenmuster keinem der Eltern zugeordnet werden (Abb. 4.18 a und b). In Abbildung 4.18a weisen nur die Bandenmuster der Kallusse Nr. 6 und 4 ein mit dem *Petunia*-Elter P04 übereinstimmendes Bandenmuster auf. In Abbildung 4.18b weist dagegen nur das Bandenmuster von Kallus Nr. 12 ein mit dem Elter Ca12 übereinstimmendes Bandenmuster auf. Die übrigen Bandenmuster konnten keinem der Eltern eindeutig zugeordnet werden. Wurde die DNA der Kallusse (Fusionsexperiment C1) dagegen mit Primer A09 untersucht, so wiesen einige der untersuchten Kallusse ein Bandenmuster auf, welches spezifische Banden beider Eltern aufwies (Abb. 4.19).



a.



b.

Abb. 4.18: Untersuchung der aus Protoplastenfusionsexperiment C1 (Ca12+P04) entstandenen Kallusse mittels RAPD-Analyse (a. Primer A04, b. Primer A12).

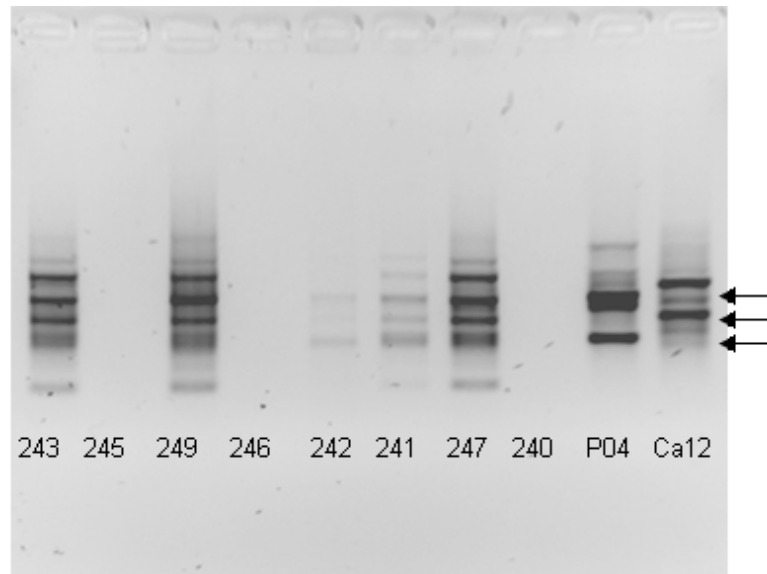


Abb. 4.19: Untersuchung der aus Protoplastenfusionsexperiment C1 (Ca12+P04) entstandenen Kallusse mittels RAPD-Analyse (Primer A09).

Bei den Fusionskombinationen C3 bis C7 (s. Tabelle 4.16), die mit Primer A09 untersucht wurden, zeigten die Bandenmuster eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit den amplifizierten Bandenmustern eines Elters, bzw. waren teilweise kombinierte Bandenmuster bzw. Banden beider Eltern wie z. B. bei 1F (Abb. 4.20), 3a, 1g, 16g, 9i, 2i und 10i (Abb. 4.21) sowie 1h, 12h und 5h (Abb. 4.22) zu sehen.

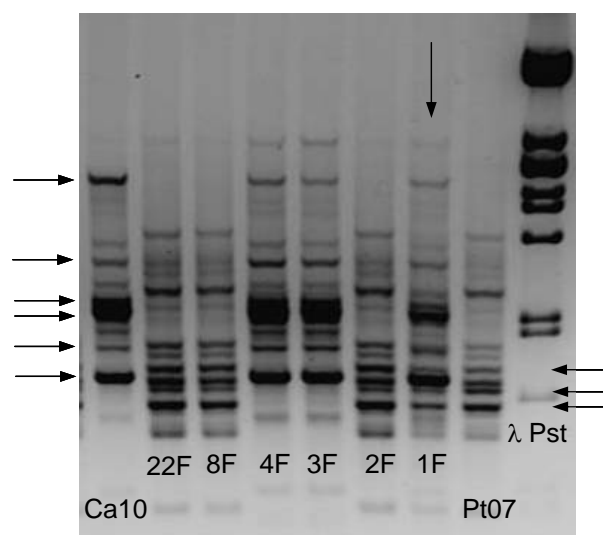


Abb. 4.20: Auftrennung der mit Primer A09 erhaltenen Amplifikationsprodukte (Fusionsexperiment C3, s. Tab. 4.18). Von links nach rechts: *Calibrachoa*-Genotyp Ca10, Fusionskallusse 22F-1F, *Petunia*-Genotyp Pt07 und Größenstandard λ Pst (Hybriden durch Pfeile gekennzeichnet).

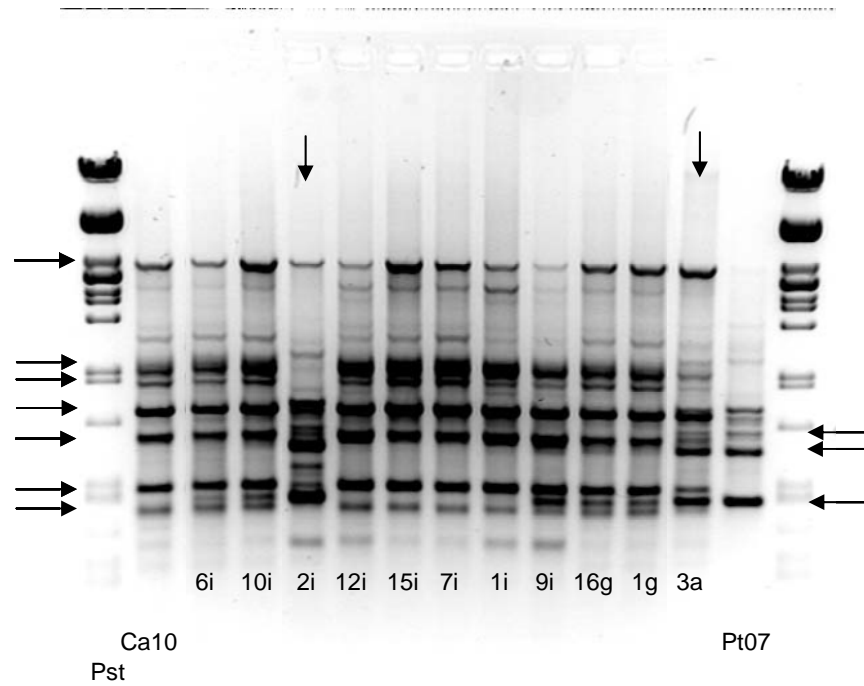


Abb. 4.21: Auftrennung der mit Primer A09 erhaltenen Amplifikationsprodukte (Fusionsexperiment C4, s. Tab 4.17). Von links nach rechts: *Calibrachoa*-Genotyp Ca10, Fusionskallusse 6i-2i und *Petunia*-Genotyp Pt07 und Größenstandard λ Pst (Hybriden durch Pfeile gekennzeichnet).

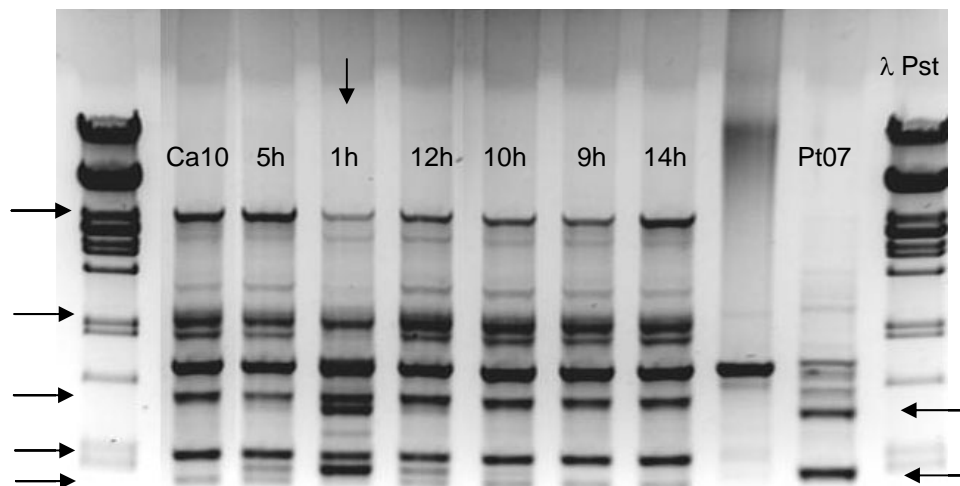


Abb. 4.22: Auftrennung der mit Primer A09 erhaltenen Amplifikationsprodukte (Fusionsexperiment C4, s. Tab 4.17). Von links nach rechts: *Calibrachoa*-Genotyp Ca10, Fusionskallusse 5h-14h und *Petunia*-Genotyp Pt07 und Größenstandard λ Pst (Hybriden gekennzeichnet durch Pfeile).

Tab. 4.18: Auswertung der mit Primer A09 amplifizierten Bandenmuster für verschiedene Fusionskombinationen.

Fusions-experiment Nr.	Fusions-kombinationen	Anzahl untersuchter Kallusse / Sprosse	Anzahl der Banden-muster, die dem <i>Petunia</i> -Elter entsprachen	Anzahl der Banden-muster, die dem <i>Calibrachoa</i> -Elter entsprachen	Mögliche Hybriden bzw.- Kallusse, deren Bandenmuster keinem der Eltern zugeordnet werden konnte
C3	Pt07* + Ca10	29	11	10	<u>8</u> * ¹ (1F, 8c, 4j, 1j, 8j, 5j, 9j, 4ab)
C4	Pt07* + Ca10	42	15	14	<u>13</u> (17F, 12h, 1h, 5h, 3a, 1g, 16g, 9i, 2i, 10i, 6i, 3o, 8g)
C5	Pt01 + Ca10*	17	6	10	<u>1</u> (F10)
C6	Pt06* + Ca07	40	0	6	<u>13</u> (55, 46, 97, 58, 51, 32, 33, 23, 24, 16, 35, 25, 20)
C7	Pt06* + Ca07	8	0	6	<u>2</u> (26,28)

*Petalenprotoplasten

*¹ Nummer der untersuchten Kallusse

Ein Teil dieser Proben wurde mit einem weiteren Primer (A15) untersucht (Abb. 4.23 und 4.24), wobei sich dieser Primer für diese Fusionskombination als am besten geeignet erwies. In den amplifizierten Bandenmustern der Kallusse 8j, 2i und 3a wurden nach der Analyse der Proben mit zwei Primern (A09 und A15) die Banden beider Eltern nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen drei Proben um die DNA von Hybridkallussen handelt. Des Weiteren wurden bei den Kallussen 1h, 8c, 5j und 9j ebenfalls Banden beider

Eltern in den untersuchten Proben nachgewiesen. Allerdings war die für den *Calibrachoa*-Genotyp Ca10 spezifische Bande sehr schwach in ihrer Intensität (Abb. 4.24). Bei diesen Proben könnte es sich ebenfalls um Hybriden handeln.

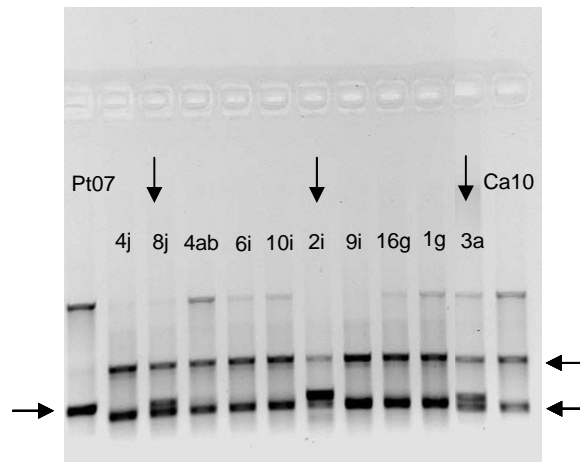


Abb. 4.23: Auftrennung der mit Primer A15 erhaltenen Amplifikationsprodukte (Fusionsexperiment C3 und C4, s. Tab. 4.17). Von links nach rechts: *Petunia*-Genotyp Pt07, Fusionskalluse 4j-3a und *Calibrachoa*-Genotyp Ca10 (Hybriden durch Pfeile gekennzeichnet).

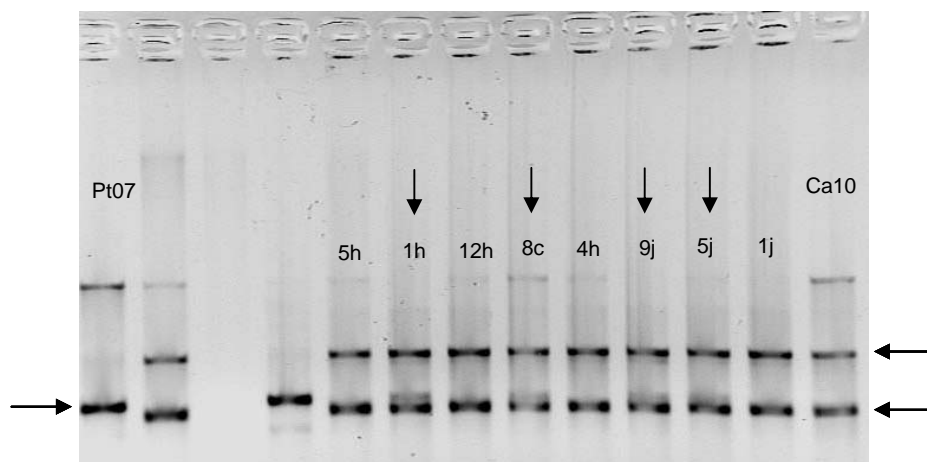


Abb. 4.24: Auftrennung der mit Primer A15 erhaltenen Amplifikationsprodukte (Fusionsexperiment C3 und C4, s. Tab. 4.17). Von links nach rechts: *Petunia*-Genotyp Pt07, Fusionskalluse und *Calibrachoa*-Genotyp Ca10 (Hybriden durch Pfeile gekennzeichnet).

Bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit standen nur Sprosse, die an den Kallussen 1h und 3a regeneriert waren, für eine DNA-Isolation und die Untersuchung mit RAPD-Markern zur Verfügung. Die übrigen Kallusse zeigten entweder keine Sprossregeneration oder es standen die vorhandenen Sprosse für eine DNA-Isolation auf Grund ihrer Größe noch nicht zur Verfügung (3a, 2i und 8j). Die für den Fusionsprozess 1h mit den Primern A09 und A15 amplifizierten Bandenmuster waren mit dem Bandenmuster des *Calibrachoa*-Elters identisch. Morphologisch wies der untersuchte Spross ebenfalls eine Übereinstimmung mit dem *Calibrachoa*-Elter auf. Dagegen zeigte das amplifizierte Bandenmuster des Fusionsprozesses 3a eine Übereinstimmung mit dem *Petunia* Elter Pt07.

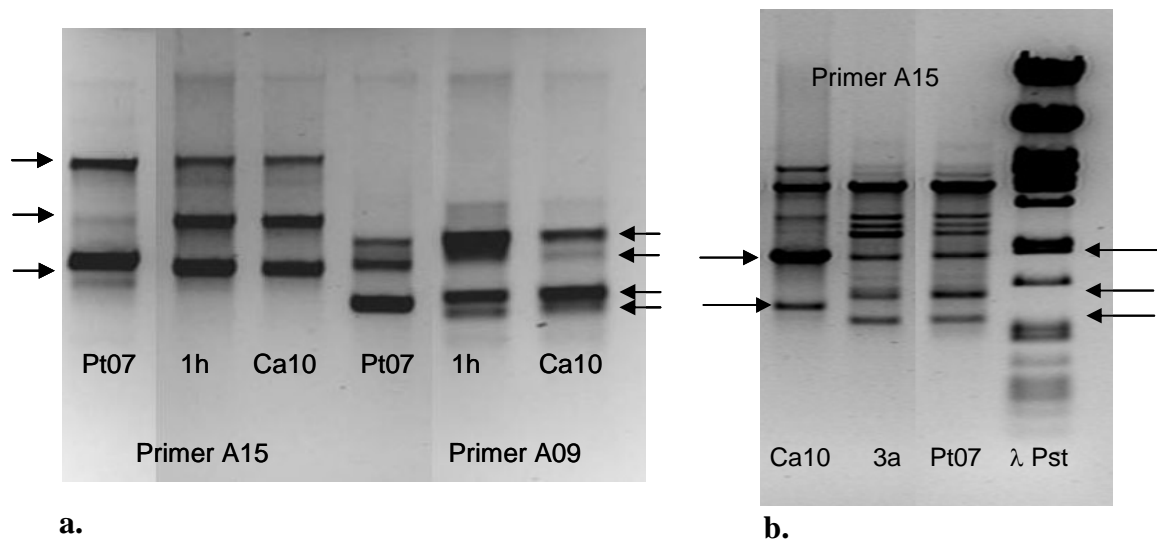


Abb. 4.25: Auftrennung der mit Primer A15 und A09 erhaltenen Amplifikationsprodukte (Fusionsexperiment C4, s. Tab. 4.17). a: von links nach rechts: *Petunia*-Genotyp Pt07, Fusionsprozess 1h und *Calibrachoa*-Genotyp Ca10. b: von links nach rechts: *Calibrachoa*-Genotyp Ca10, Fusionsprozess 3a und *Petunia*-Genotyp Pt07.

4.3.7.3 Untersuchung der Fusionskallusse mittels AFLP-Analyse

17 DNA-Proben aus sechs verschiedenen Fusionsexperimenten (C1, 2, 3, 5, 6, 7, s. Tab. 4.16) wurden mittels AFLP-Analyse untersucht. Bei dem untersuchten Material handelte es sich ausschließlich um Kallusse. Die untersuchten Kallusse der Fusionskombination P04 fusioniert mit Ca12 (Versuch C1, Tab. 4.17) wiesen in der AFLP-Analyse ein Bandenmuster auf, das sowohl Banden des *Calibrachoa*-Elters als auch des *Petunia*-Elters aufwies (Abb. 4.26 b). Bei

den Proben 1a (Fusionskombination Pt07 + Ca10) und F10 (Pt01 + Ca10) wiesen die amplifizierten Bandenmuster ebenfalls spezifische Banden beider Eltern auf (Abb. 4.26 und 4.27). Bei den untersuchten Proben der Fusionskallusse der Fusionskombination aus Pt06 fusioniert mit Ca07 zeigten die amplifizierten Banden, mit einer Ausnahme (bei der es sich um eine Verwechslung handelte), eine hohe Übereinstimmung mit dem *Calibrachoa*-Elter Ca07 (Abb. 4.27).

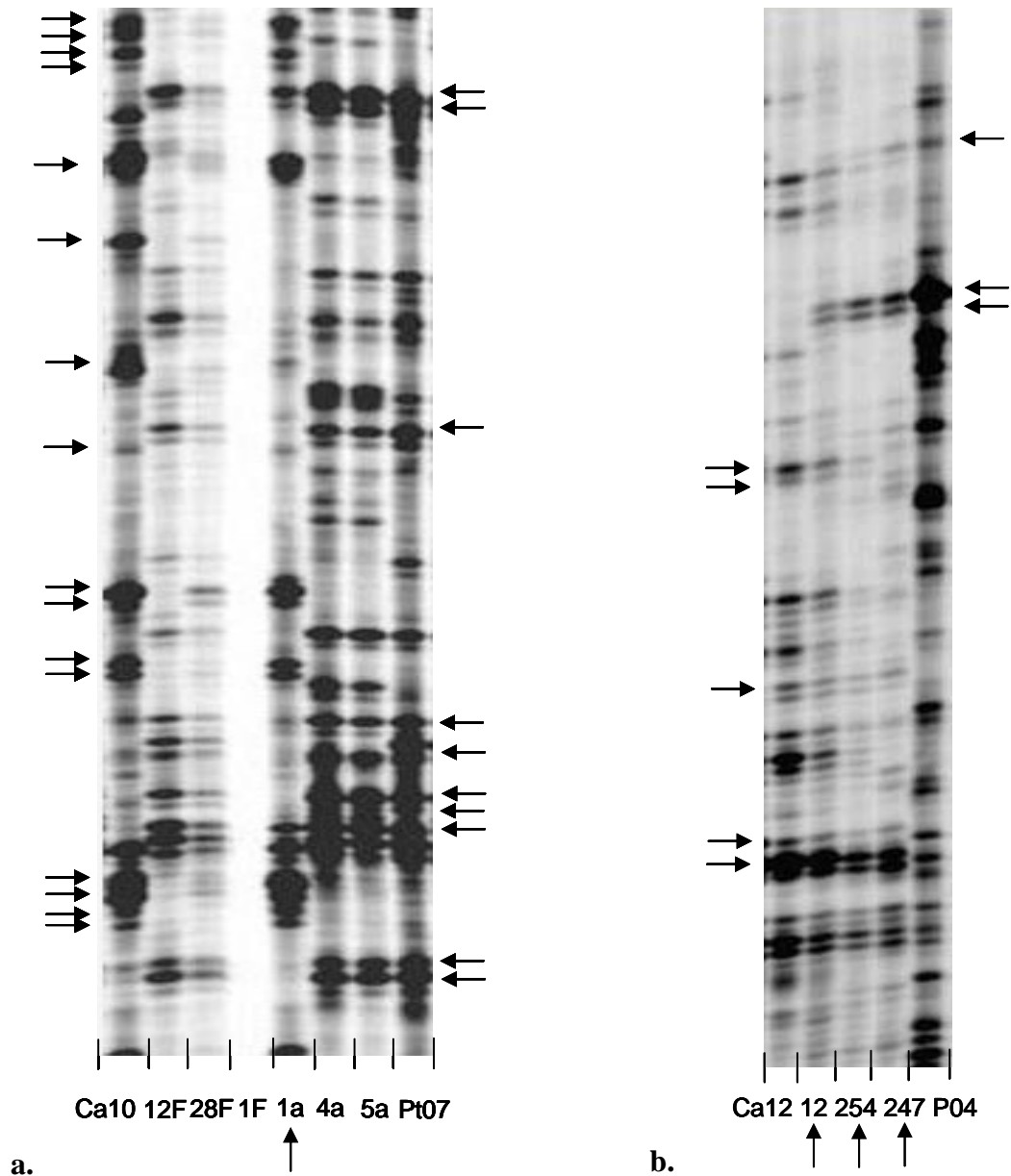


Abb. 4.26: AFLP-Muster von Kallussen aus Protoplastenfusion und ihrer Eltern für die Fusionskombinationen: a: Ca10 + Pt07 (Primerkombination HindIII + AAT / MseI + ACG, Fusionsexperiment C3 und C2, s. Tab. 4.17) sowie b: Ca12 + P04 (Primerkombination HindIII + AAC / MseI + ACT, Fusionsexperiment C1, s. Tab. 4.17). Hybriden durch Pfeile gekennzeichnet.

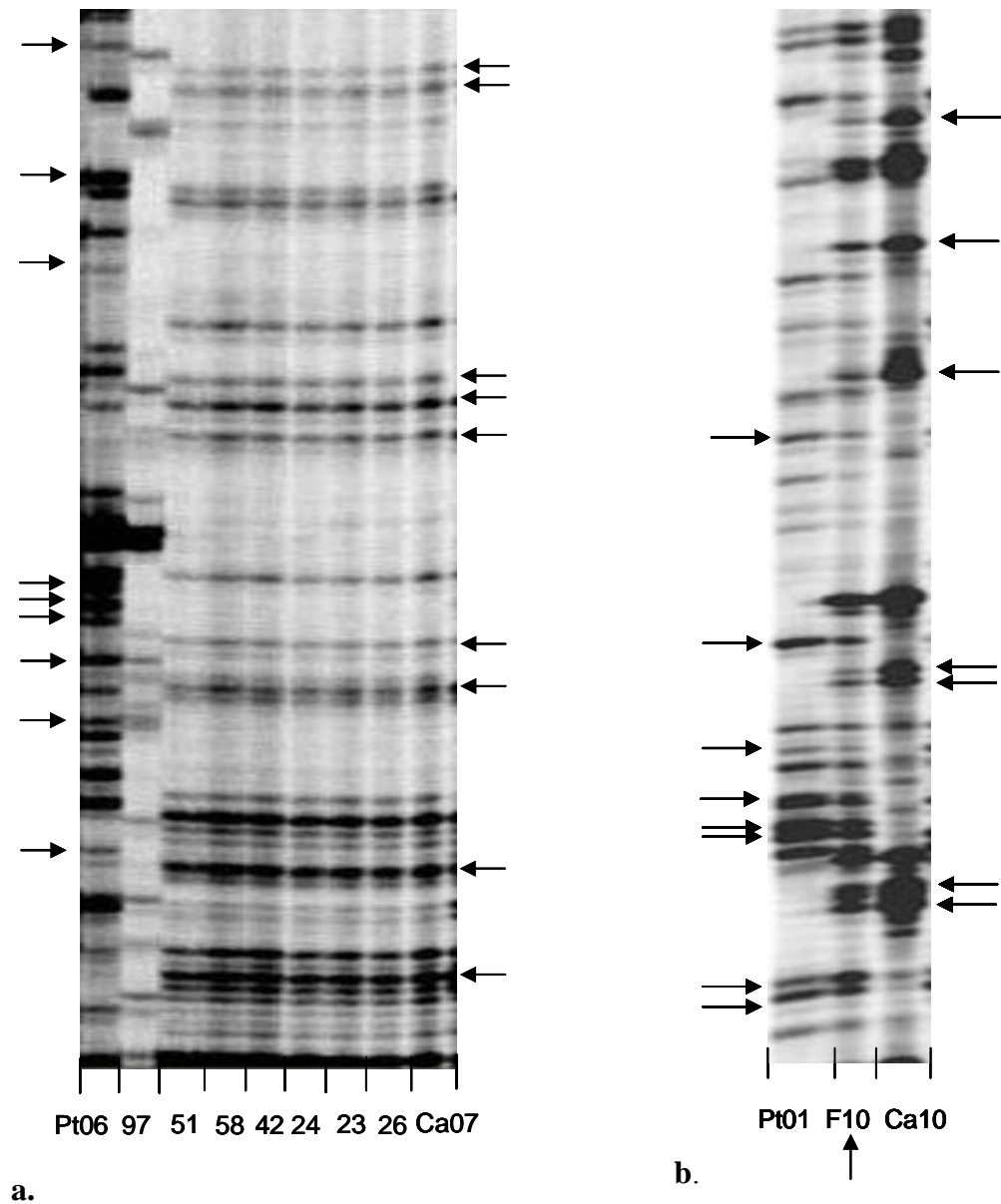


Abb 4.27: AFLP-Muster von Kallussen aus Protoplastenfusion und ihrer Eltern für die Fusionskombinationen: a: Pt06 + Ca07 (Primerkombination HindIII + AAC / MseI + ACT, Fusionsexperiment C6 und C7, s. Tab. 4.17) sowie b: Pt01 + Ca10 (Primerkombination HindIII + AAT / MseI + ACG, Fusionsexperiment C5, s. 4.17). Hybriden durch Pfeile gekennzeichnet.

Insgesamt wurden neun Kallusse aus unterschiedlichen Fusionsexperimenten mittels RAPD-Analyse (1F, 2i, 3a, 1h, 8j, s. Tab. 4.18, Primer A09 und A15) bzw. AFLP-Analyse (12, 254, 247 und F10, s. Tab. 4.17) als Hybridkallusse identifiziert. Die amplifizierten Bandenmuster dieser Kallusse wiesen spezifische Banden beider Fusionseltern auf. Bei drei weiteren Kallussen (9j, 5j, 8c, Primer A09 und A15, Tab. 4.17.) wurden ebenfalls spezifische Banden

beider Eltern mittels RAPD-Analyse nachgewiesen. Allerdings war die für den *Petunia*-Elter Pt07 spezifische Bande sehr schwach in ihrer Intensität. Bei Kallus 1a, mittels AFLP-Analyse untersucht (Abb. 4.26 a), könnte es sich ebenfalls um einen Hybridkallus handeln. Die Mehrheit der amplifizierten Banden entsprach dem *Calibrachoa*-Elter Ca10 wohingegen nur zwei Banden dem *Petunia*-Elter Pt07 zugeordnet werden konnten. Hier wäre eine erneute Analyse notwendig um eine eindeutige Aussagen treffen zu können.

4.4 Diskussion

Einfluss von R6G und JAA auf die Entwicklung von *Petunia*-Protoplasten

Da keine Informationen über wirksame Konzentrationen der Stoffwechsellinhibitoren zur Hemmung von *Petunia*- und *Calibrachoa*-Protoplasten vorlagen, wurden für die Versuche zur Bestimmung der Hemmstoffkonzentrationen R6G-Konzentrationen zwischen 0,25 und 1,5 mM sowie JAA-Konzentrationen zwischen 0,5 und 2,0 mM gewählt. Die in der Literatur angegebenen Hemmstoffkonzentrationen für die Hemmung von Protoplasten variieren mit Angaben für Jodacetamid (JAA) zwischen 1,5 und 10 mM abhängig von der verwendeten Pflanzenart zum Teil beträchtlich. So geben NAKANO UND MII (1993) für die vollständige Hemmung von *Dianthus* Protoplasten eine JAA-Konzentration von 10 mM bei einer Inkubationszeit von 15 min an. BUIVEVELD ET AL. (1998) geben für die vollständige Hemmung der Protoplasten von *Allium ampeloprasum* L. eine Konzentration von 4 mM und für *Allium cepa* L. JAA-Konzentrationen zwischen 4 und 7 mM bei einer Inkubationszeit von 15 min an, da hier bei 4 mM teilweise die Bildung von Mikrokolonien beobachtet wurde. Bei *A. thaliana* konnte die Kallusbildung bei einer JAA-Konzentration von 1,5 mM für 15 min auf unter 10 % gesenkt werden (YAMAGISHI ET AL. 2002).

Die R6G-Konzentrationen wurden bewusst etwas niedriger gewählt, da aus verschiedenen Untersuchungen bekannt war, dass R6G in einem niedrigeren Konzentrationsbereich wirkt als JAA. SCHUM ET AL. (2002) erreichten eine vollständige Hemmung von Rosen-Protoplasten bei einer R6G-Konzentration von 0,1 mM. BÖTTCHER ET AL. (1989) verwendeten für die Hemmung von *Nicotiana tabacum* Albinoprotoplasten R6G-Konzentrationen von 1,0 mM sowie 2,5 mM für die Hemmung von *N. sylvestris*, wobei die Inkubation über Nacht in der Enzymlyösung erfolgte.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Inkubation der Protoplasten nach der Isolierung. Die Zugabe der Hemmstoffe über Nacht während der Inkubation des Pflanzenmaterials in der Enzymlyse wie von BÖTTCHER ET AL. (1989) sowie AVIV ET AL. (1986) beschrieben, wurde verworfen. Sämtliche Isolierungsschritte hätten sonst in Anwesenheit der z. T. giftigen Hemmstoffe durchgeführt werden müssen.

Nach der Behandlung der Protoplasten mit R6G, wurde die Abnahme des Protoplastendurchmessers beobachtet (Daten wurden nicht dargestellt). DOHM (1993) führte die Abnahme der mittleren Protoplastendurchmesser von *Brassica oleracea*-Hypokotylprotoplasten auf das Fehlen der großen und stark vakuolisierten Protoplasten zurück. Dies scheint jedoch keine Erklärung für die eigenen Beobachtungen zu sein, da die Durchmesser der kleinsten Protoplasten, anders als bei DOHM (1993) beschrieben, nicht mit denen der Kontrollen übereinstimmten. Während in der Kontrolle Protoplasten mit einem Durchmesser von 16,4 µm gefunden wurden, wurden in der mit R6G behandelten Variante Protoplasten mit einem Durchmesser von 11,7 µm gefunden.

Neben der Verringerung des Protoplastendurchmessers führte die Behandlung der Protoplasten mit steigenden R6G-Konzentrationen zu einer kontinuierlichen Abnahme der intakten Protoplasten (Abb. 4.4 und 4.9). Bereits ab einer R6G-Konzentration von 0,5 mM waren nach dreitägiger Kultur bei beiden *Petunia*-Genotypen nur noch ca. 40-50 % intakte Protoplasten vorhanden. Ab einer Konzentration von 1,0 mM R6G konnten nach dreitägiger Kultur keine, bzw. im Fall des untersuchten *Petunia*-Genotyp, nur sehr wenige intakte Protoplasten beobachtet werden (Abb. 4.4 und 4.9). Da das Rhodamin 6G in Ethanol gelöst wurde, wurde in Vorversuchen der Einfluss von Ethanol auf die Vitalität und die Entwicklung der Protoplasten untersucht. Es konnten keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von DOHM (1993).

Es stellt sich die Frage, wie stark die Protoplasten direkt nach der R6G-Behandlung bzw. zum Zeitpunkt der Fusion durch eine Konzentration von 1,0 mM, bei der nach sieben Tagen keine intakten Protoplasten mehr beobachtet wurden, geschädigt sind, oder ob nach der Fusion der mit JAA behandelten Protoplasten die heterologen Fusionsprodukte noch lebensfähig sind. Den Angaben von ZIEGLER UND DAVIDSON (1981) zufolge, welche die Wirkung von R6G auf die Mitochondrien von Hamster- und Mäusezellen untersuchten, können Zellen, die einer tödlichen Dosis R6G ausgesetzt wurden, durch die Fusion mit dem Cytoplasma unbehandelter Zellen überleben.

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Protoplasten mit JAA zu keiner Veränderung des Protoplastendurchmessers. Wurden die Protoplasten mit JAA behandelt, verringerte sich der Anteil der intakten Protoplasten bei den untersuchten Genotypen einschließlich der Kontrolle nur um etwa 10-15 %, so dass noch 70-80 % der Protoplasten intakt waren.

Die Behandlung der Protoplasten mit R6G führte bereits bei einer Konzentration von 0,25 mM sowohl bei den untersuchten *Petunia*- als auch *Calibrachoa*-Genotypen zu einer starken Reduzierung der Teilungsraten wie aus den Abbildungen 4.2 und 4.8 ersichtlich wird. Allerdings gab es sowohl zwischen den verschiedenen untersuchten Genotypen (Abb. 4.2) als auch zwischen den Experimenten (Abb. 4.3) eine starke Variation in Bezug auf die Hemmstoffwirkung, so dass keine optimale Hemmstoffkonzentration, bei der sich reproduzierbar keine bzw. nur wenige Protoplasten teilten, ermittelt werden konnte. Die Behandlung der Protoplasten mit JAA-Konzentrationen im Bereich von 0,5 bis 2,0 mM hatte bei den zwei untersuchten *Petunia*-Genotypen nach siebentägiger Kultur keinen Einfluss auf die Teilung. Im Gegensatz dazu konnte bei den untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen abhängig vom Genotyp die Verringerung der Zellteilungsrate durch steigende JAA-Konzentrationen beobachtet werden. Besonders deutlich war die JAA-Wirkung am Beispiel der Genotypen Ca06 und Ca07 zu sehen (Abb. 4.6 a und b). Neben dem genotypischen Einfluss wurden auch hier deutliche Unterschiede in Bezug auf die Hemmstoffwirkung zwischen den Experimenten beobachtet. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Hemmstoffkonzentration ermittelt werden, bei der sich effektiv keine Protoplasten mehr teilten. Vielmehr zeigte sich, dass die Notwendigkeit bestand, die Hemmstoffkonzentrationen für jeden Genotyp einzeln zu ermitteln. Die wäre mit einem erheblichen Arbeitsaufwand verbunden. Außerdem bliebe immer noch das Problem der unterschiedlichen Hemmstoffwirkung zwischen den einzelnen Experimenten.

Protoplastenfusion

Für die Protoplastenfusion sind bereits eine Vielzahl an Protokollen etabliert worden, die sich mehr oder weniger voneinander unterscheiden. Bei der Mehrzahl der heute angewendeten Protokolle, die auf der chemischen Fusionsmethode basieren, erfolgt die Aggregation und die Fusion in einem Schritt. Hauptbestandteile der meisten Fusionslösungen sind PEG (Polyethylenglycol) und Kalzium. Die adhäsive Wirkung von PEG beschrieben KAO UND MICHAYLUK (1974). Laut CONSTABEL UND KAO (1974) ist die Agglutination der Protoplasten eine Voraussetzung für die Fusion der Protoplasten bzw. die Effizienz der Fusion. Für die

Fusion der Protoplasten wurde in dieser Arbeit zunächst auf ein bereits existierendes Protokoll für Rosen (Dr. A. Schum, schriftliche Mitteilung) zurückgegriffen, welches jedoch teilweise modifiziert wurde. Nach der Fusion der ungehemmten Mesophyllprotoplasten war der Anteil intakter Protoplasten merklich verringert. Aus der Mehrheit der Experimente entwickelten sich Mikrokallusse. Auf Grund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes wurden zunächst nur die Kallusse aus einem der Fusionsexperimente weiterkultiviert. Durch die molekulargenetische Untersuchung mittels RAPD-Markern ließen sich die regenerierten Sprosse eindeutig dem *Calibrachoa*-Elter zuordnen. Nachdem sich gezeigt hatte, dass sich die fusionierten Protoplasten gut weiterentwickelten, wurden die Protoplasten in den folgenden Fusionsexperimenten mit den Stoffwechsellinhibitoren Rhodamin 6G und Jodacetamid behandelt. Die *Calibrachoa*- Protoplasten wurden mit JAA behandelt, da diese sensitiver auf die JAA-Behandlung reagierten, während die *Petunia*-Protoplasten mit R6G behandelt wurden. Da aus den vorangegangenen Untersuchungen zum Einfluss von R6G und JAA auf die Entwicklung der Protoplasten deutlich wurde, dass in Bezug auf die Hemmstoffkonzentration sowohl zwischen den Genotypen als auch den Versuchen starke Unterschiede vorhanden waren und da nicht bekannt war, wie die Wirkung sich in Verbindung mit der Fusion verändert, wurden die Protoplasten zunächst mit jeweils 0,55 mM gehemmt. Die aus diesen Fusionsexperimenten regenerierten Sprosse (Tab. 4.15) konnten mittels RAPD-Analyse immer einem an der Fusion beteiligten Elter zugeordnet werden.

Eine Bestimmung der Fusionsraten in diesen Experimenten und somit die Beurteilung der Fusionsmethode (Fusionsprotokoll 1, s. 4.2.3) war nicht möglich, da die Kerne der fusionierten Protoplasten weder mit Ethidiumbromid nach der auf YE UND EARLE (1991) basierenden Methode, noch mit DAPI, entgegen den Angaben von OH UND KIM (1994) und OH UND CLOUSE (1998), angefärbt werden konnten.

Die Inkubation der Protoplasten in der Ethidiumbromid-Färbelösung führte zum Zerplatzen der Protoplasten. Die Behandlung der Protoplasten mit der DAPI- Färbelösung führte dagegen nur bei einem Teil der Protoplasten zur Kernfärbung. Besonders die Kerne der intakten, vital aussehenden Protoplasten ließen sich nicht mit dieser Methode anfärben.

Erst die Verwendung von Petalenprotoplasten machte die Ermittlung von Heterofusionsraten und somit auch eine Beurteilung der Effizienz der gewählten Methode möglich. Es zeigte sich, dass die gewählte Methode nur zu geringen Heterofusionsraten führte, woraufhin die Protoplasten nach der von CONSTABEL UND KAO (1974) beschriebenen Methode, in modifizierter Form, fusioniert wurden. Bei dieser Methode erfolgt die PEG-Zugabe erst,

nachdem sich die Protoplasten am Boden der Petrischale abgesetzt haben. In der vorliegenden Untersuchung konnten mit dieser Methode Fusionsraten von bis zu 17 % erzielt werden. Im Mittel lagen die Fusionsraten zwischen 3,9 und 8,9 % für die verschiedenen Fusionskombinationen (Abb. 4.12). In der Literatur sind für die PEG induzierte Fusion von *Petunia* zwischen 0,5 % (PHILLIPS UND DARELL 1992) und 10,2 % (CHAND ET AL. 1988) angegeben bzw. geben PENTAL ET AL. (1986) für die Fusion zwischen *Petunia hybrida* und *Nicotiana tabacum* eine Heterofusionsrate von 1 % an. CHAND ET AL. (1988) verglichen die PEG induzierte Fusion mit der Elektrofusion sowie der PEG-Elektrofusion. Die Heterofusionsrate der Fusion mittels PEG lag mit durchschnittlich 10,2 % deutlich über den durch Elektrofusion oder PEG-Elektrofusion erzielten Heterofusionsraten von 1,6 bzw. 5,5 %. TAGUSHI ET AL. (1993) erzielten mittels Elektrofusion Fusionsraten von 5 %, wenn *Calibrachoa*- mit *Petunia*-Protoplasten fusioniert wurden. Die Teilungsfrequenz der Heterofusionsprodukte unterschied sich mit 36,2 bzw. 36,9 % bei den beiden erstgenannten Methoden nicht. Wohingegen sie nach der PEG-Elektrofusion mit 11,1 % deutlich geringer war. Die Fusionsrate ist abhängig von dem verwendeten Material. So lassen sich nach den Angaben von GLEBA UND SYTNIK (1984) Kallusprotoplasten besser fusionieren als zum Beispiel stark vakuolisierte Protoplasten bzw. Protoplasten mit entwickelten Chloroplasten. Beides trifft auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mesophyllprotoplasten zu.

In einem Optimierungsversuch wurden verschiedene Fusionsmethoden, und -varianten miteinander verglichen (Abb. 4.14). Wie der Vergleich zeigte, wurden keine Heterofusionen in Variante fünf, der zu Beginn der Arbeit gewählten Fusionsmethode, gezählt. Zudem wurden in dieser Variante im Vergleich zu den übrigen Varianten eine höhere Anzahl nicht intakter Protoplasten beobachtet. Eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl intakter Protoplasten in dieser Variante ist die Behandlung der Protoplasten mit der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung bzw. dem Zentrifugationsschritt, der im Anschluss an die Fusion erfolgte. So beschrieben GLEBA UND SYTNIK (1984), dass in manchen Fällen hohe Kalziumkonzentrationen zusammen mit hohen pH-Werten zu einer vollständigen Zerstörung von Mesophyllprotoplasten führen können. Ebenso führen DURIEU UND OCHATT (2000) den Zentrifugationsschritt nach der Fusion als Ursache für eine verringerte Anzahl intakter Protoplasten an. Die Zusammensetzung der Fusionslösung kann als mögliche Ursache ausgeschlossen werden, da diese mit der in den Varianten drei und vier verwendeten identisch war und in diesen Varianten auch nach erfolgter Fusion eine hohe Anzahl intakter Protoplasten vorhanden waren.

Selektion der heterologen Fusionsprodukte mittels “Cell Finder“- Objektträger

Da die Selektion der heterologen Fusionsprodukte durch die Hemmstoffe R6G und JAA nicht zufriedenstellend war, und auf Grund der bestehenden Möglichkeit der Unterscheidung zwischen heterologen und nicht fusionierten Protoplasten bzw. Homofusionsprodukten durch die Verwendung von Petalenprotoplasten, wurden diese für die Identifizierung verwendet.

VAN DER VALK ET AL. (1988) beschrieben die Selektion von Protoplasten mit Hilfe von Objektträgern, auf denen sich ein Koordinatensystem bzw. ein Raster befand. Der Objektträger wurde mit einer 0,4 %igen Agarose-Lösung beschichtet. Die Fixierung der Protoplasten erfolgte, indem die Protoplasten mit einer 0,8 %igen Agarose-Lösung im Verhältnis 1:10 gemischt wurden, und 50 µl dieser Suspension auf dem Objektträger mittels einer Pasteurpipette verteilt wurden. In der vorliegenden Untersuchung führte dies zu einer sehr geringen Protoplastendichte sowie einer starken Abnahme der intakten Protoplasten. Aus diesem Grund wurden die Protoplasten wie unter 4.2.4.2 beschrieben auf dem Träger ebenfalls mittels Agarose plattiert und kultiviert. Im Gegensatz zu dem von VAN DER VALK ET AL. (1988) beschriebenen Verfahren zur Fixierung der Protoplasten, bei dem die Träger sogar auf einem Schüttler kultiviert werden konnten, kam es bei dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Verfahren bei starken Bewegungen teilweise zur Ablösung des Agarosefilmes vom Objektträger. Das Plattieren der Protoplasten auf den Träger, ein bis zwei Tage nach der Fusion, führte zu einer höheren Anzahl intakter Protoplasten.

Die Anzahl der möglichen Genotypen war auf jene beschränkt, die eine dunkle Blütenfarbe aufwiesen. Um das Spektrum der nutzbaren Genotypen zu erweitern, wäre es denkbar, diese Petalenprotoplasten mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise FDA anzufärben. Nach der Fusion mit Mesophyllprotoplasten wären die heterologen Protoplasten durch das Vorhandensein der Chloroplasten des Mesophyll-Protoplastenelterns sowie der Fluoreszenz des Petalenprotoplastenelterns unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. In nicht dargestellten Versuchen war es möglich, die Protoplasten mit FDA anzufärben und bis zum Mikrokallusstadium weiterzukultivieren. DURIEU UND OCHATT (2000) färbten zur Bestimmung der Heterofusionsraten die Protoplasten *Lathyrus sativus* und *Pisum sativum* mit den Fluoreszenzfarbstoffen FDA und Rhodamine B Isothiocyanat an und kultivierten diese ebenfalls erfolgreich weiter.

Durchflusscytometrische Untersuchung der Fusionssprosse aus Fusionen mit gehemmten Protoplasten

Die durchflusscytometrische Untersuchung der aus der Fusionsexperiment B2 (Ca07 + Pt09, s. Tab. 4.16) in großer Anzahl hervorgegangenen Sprosse zeigte, dass es sich bei der Mehrzahl dieser Sprosse um diploide Pflanzen handelte. Es wurden jedoch auch einige tetraploide und sogar oktaploide Pflanzen gefunden. Das Vorhandensein dieser Pflanzen könnte ein Hinweis auf erfolgte Protoplastenfusionen sein. Es könnte sich aber auch um spontane Fusionen handeln, die nicht auf die Fusionsbehandlung zurückgehen. In durchflusscytometrischen Untersuchungen von Pflanzen, welche aus Protoplasten regeneriert wurden (s. 3.3.3.2), konnten Pflanzen mit erhöhter Ploidiezahl nachgewiesen werden. Der Anteil der Pflanzen betrug für *Petunia* Genotyp Pt07 (regeneriert aus Mesophyllprotoplasten) jedoch nur 2,3 % und lag somit deutlich unter dem, der aus Fusionsexperiment B2 (Ca07 + Pt09) regenerierten und durchflusscytometrisch untersuchten Pflanzen von 33,7 %. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei Pt09 (diploid) und Pt07 (tetraploid) um Genotypen mit unterschiedlicher Ploidiezahl handelt. OH UND KIM (1995 A) zeigten in ihren Untersuchungen, dass der Anteil an Pflanzen mit veränderter Ploidiezahl mit über 80 % deutlich höher war, wenn die aus Protoplastenkultur regenerierten Pflanzen auf diploides Ausgangsmaterial zurückgingen. Im Gegensatz dazu betrug der Anteil an Pflanzen mit veränderter Ploidiezahl 0 %, wurden die Pflanzen aus tetraploidem Ausgangsmaterial regeneriert. Die Identifikation möglicher Hybriden war auf Grund des ähnlichen relativen DNA-Gehaltes der Fusionspartner auf diesem Weg nicht möglich. Eine der Pflanzen wies einen rel. DNA-Gehalt auf, der geringer als die Summe der DNA-Gehalte der Eltern war. Eine mögliche Erklärung wäre der Verlust einzelner Chromosomen wie er von MIZUHIRO ET AL. (2001) nach der Fusion von *Primula malacoides* und *Primula obconica* beschrieben wurde. Denkbar wären ebenfalls messtechnische Schwankungen.

Auf Grund der Tatsache, dass bei dem *Calibrachoa*-Genotyp Ca07 in keinem der durchgeführten Regenerationsversuche die Regeneration von Sprossen beobachtet wurde, wurde vermutet, dass es sich bei den regenerierten Sprossen entweder um Hybriden handeln musste, oder dass dieser Genotyp nur Sprosse regeneriert, wenn eine Veränderung der Ploidiestufe stattgefunden hat. Durch die molekulargenetische Untersuchung mittels RAPD-Analyse konnten die untersuchten Kallusse aus Fusionsexperimenten eindeutig dem *Calibrachoa*-Elter Ca07 zugeordnet werden.

Die durchflusscytometrische Untersuchung der Sprosse, die aus den zwei Fusionen zwischen Ca07 und Pt06 regeneriert wurden, zeigte, dass es sich bei den 20 untersuchten Sprossen um tetraploide Sprosse handelte. Um diesbezüglich weitere Aussagen treffen zu können, wäre eine Colchizinbehandlung der Protoplasten des Genotypes Ca07 denkbar. Diese führt durch Lähmung der Spindelfasern während der Mitose zu einer Verdoppelung des Chromosomensatzes. Trifft die oben genannte Vermutung zu, sollten die so behandelten Protoplasten bzw. die daraus resultierenden Kallusse im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle eine höhere Sprossregenerationsrate aufweisen.

Molekulargenetische Untersuchung der Fusions sprosse bzw. Kallusse

Die aus dem Protoplastenfusionsexperiment B2 (Pt09 fusioniert mit Ca07, s. Tab. 4.15 und 4.16), hervorgegangenen und in ihrem rel. DNA-Gehalt auffälligen Sprosse wurden molekulargenetisch mittels RAPD-Primern untersucht. Die selektierten Sprosse konnten anhand der Übereinstimmung des amplifizierten Bandenmusters eindeutig dem *Petunia*-Elter Pt09 zugeordnet werden. Auch alle weiteren aus Fusionen mit ungehemmten (Fusionsexperiment A1, s. Tab. 4.15 und 4.16) und gehemmten Protoplasten (B10 und B15, s. Tab. 4.16 und 4.17) hervorgegangenen Sprosse konnten eindeutig auf Grund des amplifizierten Bandenmusters einem Elter zugeordnet werden.

Im Gegensatz dazu führte die RAPD-Analyse der Kallusse aus dem mit Petalenprotoplasten durchgeführten Fusionsexperiment C1(Tab. 4.17) zu keinem eindeutigen Ergebnis. Bei der Amplifikation der Banden durch Primer A04 wies das Bandenmuster einiger der untersuchten Kallusse (hervorgegangen aus der Fusion zwischen P04 und Ca12) eine Übereinstimmung mit dem *Calibrachoa*-Elter auf. Wurden dieselben Kallusse mit Primer A12 untersucht, zeigten diese eine hohe Übereinstimmung mit dem *Petunia*-Elter bzw. wiesen einige der amplifizierten Bandenmuster überhaupt keine Übereinstimmung mit denen der Eltern auf. Ein zusammengesetztes Bandenmuster, welches die amplifizierten Bandenmuster beider Eltern vereinte, wurde bei keinem der untersuchten Primer beobachtet. Die aus diesem Fusionsansatz regenerierten Sprosse konnten dagegen in allen Fällen eindeutig dem *Calibrachoa*-Elter, mit dem sie auch morphologisch eine Übereinstimmung zeigten, mittels RAPD-Analyse (mit den Primern A04 und A12) zugeordnet werden. Um auszuschließen, dass diese Unstimmigkeiten auf das für die Isolation verwendete Material (Kallus) zurückzuführen sind, wurden von einem Kallus mit Sprossbildung jeweils die DNA des Kallus und des Sprosses isoliert und

mittels der oben beschriebenen Primer (A04 und A12) untersucht. Die amplifizierten Bandenmuster beider Proben entsprachen dem des *Calibrachoa*-Elter.

Ein Teil der aus Fusionsexperiment C1 stammenden Kallusse wurde mit einem weiteren Primer A09 untersucht. Die mittels Primer A09 amplifizierten Bandenmuster setzten sich aus den Banden beider Eltern zusammen (Abb. 4.19). Eine Bande konnte keinem Eltern zugeordnet werden konnte.

Auf Grund der nicht eindeutigen Ergebnisse der RAPD-Analyse wurde eine ausgewählte Anzahl der aus verschiedenen Fusionskombinationen regenerierten Kallusse mittels AFLP-Analyse untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der RAPD-Analyse konnten bei den untersuchten Kallussen der Fusionskombination P04 fusioniert mit Ca12 in dem amplifizierten Bandenmuster der AFLP-Analyse spezifische Banden beider Eltern nachgewiesen werden. Dies ist besonders interessant, da der Kallus Nr. 12, wurde er mit RAPD-Primern untersucht, bei der Amplifikation mit Primer A04 ein Bandenmuster aufwies, dass keinem der Eltern entsprach, während das mit Primer A12 amplifizierte Bandenmuster dem des *Calibrachoa*-Elters entsprach.

Ebenso wurden weitere Hybriden aus weiteren Fusionsexperimenten (C4, s. Tab. 4.18) mittels AFLP-Analyse (Abb. 4.27b) nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Veröffentlichungen von ROKKA ET AL. (1994) und RASMUSSEN UND RASMUSSEN (1995) zum Nachweis von aus Protoplastenfusion hervorgegangenen Hybriden zwischen *Solanum tuberosum* und *S. brevidens* Phil. bzw. zwei verschiedenen Genotypen von *S. tuberosum* war eine eindeutige Identifizierung von Hybridkallussen bei dieser Fusionskombination mittels RAPD-Markern nicht gegeben. XU ET AL. (1993) berichteten von einem ähnlichen Problem bei der Untersuchung von Fusionshybriden zwischen *Solanum tuberosum* und *S. brevidens*. Vier von fünf untersuchten RAPD-Primern amplifizierten ein Bandenmuster, das der Summe der Banden beider Eltern entsprach. Das Bandenmuster eines weiteren Primers entsprach dem von *S. brevidens*. Als Erklärung geben sie eine mögliche Konkurrenz der Primer um Bindungsstellen an und beziehen sich auf WILLIAMS ET AL. (1990). Bei der Amplifikation eines Gemisches aus Sojabohne und dem Genom von Cyanobakterien stammten alle Amplifikationsprodukte von der Sojabohne (WILLIAMS ET AL. 1990). TASKI-AJDUKOVIC ET AL. (2006) untersuchten potentielle Hybriden hervorgegangen aus der Fusion zwischen *Helianthus annuus* und *H. maximiliani*, letztere wurden mit UV-Strahlung behandelt, mit 11 RAPD-Primern. Zehn dieser Primer amplifizierten ausschließlich spezifische Banden für *H. annuus* während ein Primer Banden beider Eltern amplifizierte. Das Auftreten von

spezifischer Banden von *H. maximiliani* bei nur einem der 10 untersuchten Primer führen TASKI-AJDUKOVIC ET AL. (2006) auf die asymmetrische Natur der Hybriden zurück. Möglicherweise handelt es sich bei einem Teil der in dieser Arbeit untersuchten Kallusse um asymmetrische Hybriden, bei denen nur ein Teil des Genoms eines Elters vorhanden ist. Im Gegensatz dazu wiesen die von SHIMIZU ET AL. (1999) untersuchten und aus symmetrischen sowie asymmetrischen Fusionen zwischen *Iris ensata* und *I. germanica* hervorgegangenen Hybriden identische Bandenmuster auf, welche sich aus den spezifischen Banden beider Eltern zusammensetzten.

Das Vorhandensein von kombinierten Bandenmustern bzw. der Nachweis von Banden beider Eltern nach der Amplifikation mit Primer A09 wurde ebenfalls bei verschiedenen aus weiteren Fusionsexperimenten stammenden Kallussen beobachtet. Eine Auswahl dieser Proben wurde ebenfalls durch AFLP-Analyse untersucht und der Hybridstatus bei einigen der untersuchten Kallusse bestätigt bzw. nachgewiesen werden. Der Nachweis somatischer Hybriden mittels AFLP-Analyse wurde mehrfach beschrieben, so z. B. von BREWER ET AL. (1999) am Beispiel somatischer Hybriden zwischen *Thlapsi caerulea* und *Brassica napus*. In einigen Fällen konnten mittels AFLP-Analyse keine Hybriden nachgewiesen werden, obwohl in der RAPD-Analyse das amplifizierte Bandenmuster nicht vollständig dem eines Elters entsprach, sondern ebenfalls eine spezifische Bande des anderen Elters aufwies.

Bei dem Fusionskallussen 1h und 3a (Fusionsexperiment C4, s. Tab. 4.17 und 4.18) konnten mittels RAPD-Marker (Primer A09 und A15) spezifische Banden beider Eltern nachgewiesen werden. Beide Kallusse regenerierten Sprosse, jeweils ein Spross wurde mittels RAPD-Analyse (Primer A09 und A15) untersucht. Das Bandenmuster des von Fusionskallus 1h abstammenden Sprosses, zeigte eine Übereinstimmung mit dem *Calibrachoa*-Elter Ca10. Es wurden keine spezifischen Banden des *Petunia*-Elters Pt07 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte das Bandenmuster des von Fusionskallus 3a abstammenden Sprosses eine Übereinstimmung mit dem *Petunia*-Elter Pt07. Spezifische Banden des *Calibrachoa*-Elters Ca10 konnten ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine mögliche Inkompatibilität zwischen den Genomen hinweisen. Nach LIU UND DENG (2005) werden bei der Protoplastenfusion Kerngenom und Cytoplasma verwandtschaftlich entfernter Arten in den somatischen Hybriden neu kombiniert. Genauso oft kommt es jedoch zu Unverträglichkeiten bzw. sind nur Teile der Genome in den Hybriden vorhanden. So kann es z. B. zu einer spontanen Eliminierung von Chromosomen eines oder beider Eltern kommen, was zu einer Regeneration von asymmetrischen Hybriden oder Cybriden führt (GLEBA ET AL. 1988). Zu einer Eliminierung von Chromosomen eines Elters kann es z. B. durch

Unterschiede im Zellteilungszyklus kommen. Die Heterofusion der Protoplasten führt zu Protoplasten, die die Zellkerne beider Fusionspartner enthalten. Voraussetzung für die Fusion dieser Zellkerne ist laut SQUIRRELL ET AL. (2005) jedoch, dass sich beide Kerne synchron teilen. XING ET AL. (2001) fusionierten Weizen mit drei unterschiedlichen Gräsern. Die höchste Chromosomeneliminierungsrate trat bei jener Kombination auf, bei der das verwandtschaftliche Verhältnis zwischen dem Weizen- und dem Gras-Elter am weitesten war. Im Cytoplasma sind sowohl die Plastiden, im besonderen die Chloroplasten, als auch die Mitochondrien enthalten. Bei der Protoplastenfusion mischt sich das Cytoplasma der fusionierten Protoplasten. Während gemischte Chloroplastenpopulationen (FLUHR ET AL. 1984, TOMZIK UND HAIN 1988) oder rekombinierte Chloroplasten (WAARA UND GLIMELIUS 1995, beziehen sich auf MEDGYESY ET AL. 1985) sehr selten sind, ist laut LANDGREN UND GLIMELIUS (1990) die Neuordnung bzw. die Rekombination von Mitochondrien-Genomen nicht ungewöhnlich. Das Aussortieren der Chloroplasten und Mitochondrien geschieht willkürlich und ist unabhängig von der Kernfusion (WAARA UND GLIMELIUS 1995)

Unverträglichkeiten innerhalb der *Solanaceae* wurden von PENTAL ET AL. (1986) für die Fusion zwischen *Petunia hybrida* und *Nicotiana tabacum* beschrieben. Nach der Fusion konnten PENTAL ET AL. (1986) das Vorhandensein von Hybridkallus nachweisen. Der Hybridstatus nahm jedoch mit zunehmender Kulturdauer ab, so dass nach einem Jahr die Mehrheit der Zelllinien einen Großteil des Tabakgenoms verloren hatten.

Dagegen sprechen allerdings die Arbeiten von POWER ET AL. (1980) und TAGUCHI ET AL. (1993). Beiden war es möglich, durch Protoplastenfusion zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* somatische Hybriden, noch dazu bei verschiedenen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Spezies (*P. parodii* wurde mit *C. parviflora* und *P. hybrida* wurde mit *C. variabilis* fusioniert), zu regenerieren. Weiterhin wurde Mitte 2005 von der Firma Danziger eine Kreuzung zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* mit dem Namen Calitunia vorgestellt, wobei nicht klar ist, ob diese Hybride auf sexuelle Kreuzung oder biotechnologische Methoden wie z. B. Protoplastenfusion zurückzuführen ist. ROSE ET AL. (1990) beschrieben eine Inkompatibilität, welche auf der Unverträglichkeit zwischen Pollen und Stigmata oder Pollenschlauchwachstum und Griffel beruht, leichter durch somatische Hybridisierungen überwunden werden kann als jene, die auf einer postzygotischen reproduktiven Isolation beruht. Laut ROSE ET AL. (1990) soll die asymmetrische Fusion das Potenzial zur Überwindung inkompatibler Genome haben. Sie beziehen sich dabei auf die Untersuchungen von GLEBA UND HOFFMANN (1980). Sollte es sich in der vorliegenden Arbeit tatsächlich um

eine Inkompatibilität zwischen den Genomen handeln, was jedoch erst noch bewiesen werden muss, wäre die asymmetrische Fusion eventuell eine Möglichkeit, diese zu überwinden.

Ein möglicher Einfluss der Ploidiezahl der Eltern auf die Ergebnisse der Markeranalyse scheint in der vorliegenden Arbeit nicht vorzuliegen. Bei den Fusionskombinationen C2 und C3 (s. Tab. 4.17) wurden Genotypen mit unterschiedlicher Ploidiezahl (Pt07 = tetraploid und Ca10 = diploid) fusioniert. Die mit Primer A09 untersuchten Bandenmuster setzten sich aus spezifischen Banden beider Eltern zusammen. Bei den von MIZUHIRU ET AL. (2001) sowie KRASNYANSKI ET AL. (1998) durchgeführten Protoplastenfusionen zwischen *Primula obconica* (diploid) und *P. malacoides* (tetraploid) sowie *Mentha piperita* (tetraploid) und *M. spicata* (diploid), wiesen die Eltern ebenfalls unterschiedliche Ploidiezahlen auf. In den regenerierten und mittels RAPD-Primern untersuchten Hybriden wurden die spezifischen Banden beider Eltern nachgewiesen.

6 Zusammenfassung

In die vorliegende Untersuchung wurden zehn *Petunia*- und 13 *Calibrachoa*-Genotypen, darunter verschiedene Genotypen der Wildart *Calibrachoa parviflora* sowie zwei *Calibrachoa*-Genotypen von unbekannter Herkunft einbezogen. Ausgehend von Mesophyll- bzw. Petalengewebe ließen sich aus den untersuchten *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen mit der vorliegenden Methode erfolgreich Protoplasten isolieren. Abhängig von Genotyp und Versuch variierte dabei die Anzahl der isolierten Protoplasten beträchtlich. So wurden für die *Calibrachoa*-Genotypen im Mittel Ausbeuten zwischen $1,1$ und $4,2 \times 10^6$ Protoplasten je Gramm Frischmasse und für die *Petunia*-Genotypen zwischen $0,6$ und $3,5 \times 10^6$ je Gramm Frischmasse erzielt.

Zellteilungen sowie Kallusbildung wurden mit einer Ausnahme bei allen untersuchten Genotypen beobachtet. Abhängig vom Genotyp unterschieden sich die ermittelten Teilungsraten, die für sieben *Calibrachoa*- und vier *Petunia*-Genotypen ermittelt wurden, jedoch beträchtlich. Ebenso wie bei der Teilung wurden auch bei der Sprossregeneration genotypische Unterschiede beobachtet. Vier der neun untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen regenerierten auf den untersuchten Medien keine Sprosse, während bei den anderen fünf Genotypen deutliche Unterschiede in der Regenerationsrate abhängig vom Phytohormongehalt der Medien beobachtet werden konnten.

Zur Charakterisierung der aus Protoplasten hervorgegangenen Regenerate wurden 55 bzw. 70 Pflanzen zweier *Calibrachoa* Genotypen, sowie 85 bzw 70 Pflanzen, regeneriert aus Mesophyll bzw. Petalenprotoplasten eines *Petunia*-Genotyps, ins Gewächshaus überführt. Die Rate der erfolgreich ins Gewächshaus überführten Pflanzen lag bei 96-98 %. Neben zwei Pflanzen mit Chlorophylldefekten wurde für 2,3 und 5,8 % der untersuchten Pflanzen eine veränderte Ploidiezahl beobachtet. Im Hinblick auf die Identifikation möglicher Hybriden wurden die verschiedenen Genotypen durchflusscytometrisch sowie molekulargenetisch untersucht. Durchflusscytometrische Untersuchungen zeigten, dass die relativen DNA-Gehalte der untersuchten Genotypen relativ eng beieinander lagen. Eine Unterscheidung möglicher Hybriden auf diesem Weg für die Mehrzahl der Fusionskombinationen war deshalb nicht gegeben. Im Gegensatz dazu scheint die Identifikation von Hybriden mittels RAPD-Analyse möglich. Im Zuge dieser Untersuchungen, wurde basierend auf RAPD-Markern eine Distanz-Matrix sowie ein Phänogramm erstellt, um Informationen über das Verwandtschaftsverhältnis zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* sowie weiteren Spezies aus der Familie der *Solanaceae* zu erhalten. Der Stammbaum sowie die Distanz-Matrix zeigten eine

sehr enge Verwandtschaft zwischen den untersuchten *Petunia*-Genotypen. Unter den untersuchten *Calibrachoa*-Genotypen befand sich ebenfalls eine Gruppe bereits züchterisch bearbeiteter Genotypen, welche enger miteinander und mit den *Petunien* verwandt sind als z. B. die untersuchten Wildarten (*C. parviflora*-Genotypen).

Die Untersuchung der Hemmstoffwirkung von Jodacetamid sowie Rhodamin 6G (R6G), zeigte starke Unterschiede sowohl zwischen den verschiedenen Genotypen als auch zwischen den verschiedenen Experimenten, so dass keine optimale Konzentration für eine vollständige reproduzierbare Hemmung der Protoplasten gefunden wurde.

Die Protoplastenfusion erfolgte chemisch mittels Polyethylenglycol (PEG). Eine Überprüfung der Effektivität der verwendeten Fusionsmethode war zunächst nicht möglich, da weder Ethidiumbromid noch DAPI zur Bestimmung der Fusionsraten mittels Zellkernanfärbung geeignet waren. Erst die Verwendung von Petalenprotoplasten zeigte, dass die bisher gewählte Fusionsmethode nur zu sehr geringen Heterofusionsraten von ca. 1 % führte. Die aus diesen Experimenten regenerierten Sprosse wurden mittels RAPD-Analyse untersucht und konnten in allen Fällen jeweils einem Fusionselter zugeordnet werden. Durch die Veränderung der Fusionsmethode wurden im weiteren Verlauf für verschiedene Fusionskombinationen im Mittel Fusionsraten zwischen 3 und 9 % bzw. bis zu 17 % erzielt. Zur Selektion der heterologen Fusionsprodukte wurden die Protoplasten mittels LM-Agarose zwei bis drei Tage nach der Fusion auf sogenannte "Cell Finder"-Objektträger plattiert. Mit Hilfe dieser "Cell Finder"-Objektträger, auf denen sich ein Koordinatensystem befindet, wurde unter dem Mikroskop die Lage der heterologen Fusionsprodukte bestimmt. Die daraus entstandenen Mikrokalluse wurden unter dem Stereomikroskop mit einer Präpariernadel herausgepickt und auf ein mit Agarose verfestigtes Medium überführt.

Die Untersuchung der Fusionskalluse erfolgte mittels RAPD- bzw. AFLP-Analyse, dabei wiesen mehrere Kalluse aus Kombinationen verschiedener Genotypen Banden beider Eltern auf. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen um Hybridkalluse handelt. Zwei dieser Fusionskalluse regenerierten bereits Sprosse, welche ebenfalls mittels RAPD-Analyse untersucht wurden. Diese Sprosse zeigten jedoch nur noch das Bandenmuster eines Elters.

Ausblick

In der vorliegenden Untersuchung zur somatischen Hybridisierung zwischen *Petunia* und *Calibrachoa* konnte die erfolgreiche Fusion zwischen *Petunia*- und *Calibrachoa*-Protoplasten nachgewiesen werden. Zwei Kallusse regenerierten bereits Sprosse, die in molekulargenetischen Untersuchung mittels RAPD-Primern jedoch nur die Banden eines Elters zeigten. Aus diesem Grund wäre es von besonderem Interesse die Entwicklung vom Kallus zum Spross eingehender (molekulargenetisch mittels Primern) zu verfolgen, um den Zeitpunkt ermitteln zu können, von dem an sich der Hybridstatus nicht mehr nachweisen lässt. Zum jetzigen Zeitpunkt steht die molekulargenetische Untersuchung weiterer Sprosse dieser Fusionsexperimente noch aus. Da die Eltern unterschiedliche Ploidiezahlen aufweisen, der *Calibrachoa*-Elter Ca10 ist diploid wohingegen der *Petunia*-Elter Pt07 tetraploid ist, könnten die aus den Fusionskallussen (Fusionsexperimente C3 und C4, Abb. 4.19) regenerierten Sprosse durchflusscytometrisch untersucht werden. Pflanzen, die eine Chromosomenzahl aufweisen, die der Summe der Chromosomen der Eltern entspricht sollten mittels RAPD-Primern, auf ihren Hybridstatus hin untersucht werden. Bei abweichender Chromosomenzahl könnte mittels GISH (Genom in Situ Hybridisierung) die Zusammensetzung der elterlichen Chromosomen in den mutmaßlichen Fusionshybriden untersucht werden. PAROKONNY ET AL. 1992) untersuchten die Chromosomenzusammensetzung von asymmetrischen Hybriden zwischen *Nicotiana plumbaginifolia* und *N. sylvestris*. Des Weiteren wäre eine eingehende Untersuchung hinsichtlich möglicher Inkompatibilitäten zwischen den Genomen von *Petunia* und *Calibrachoa* sowie eine Analyse der Chloroplastenzusammensetzung, der aus den Kallussen 1h und 3a regenerierten Sprossen (Fusionsexperiment C4) denkbar.

Auf Grund der schlechten bzw. nicht vorhandenen Sprossregeneration einiger Genotypen sollten weitere *Petunia*- und *Calibrachoa*-Genotypen bezüglich ihrer Eignung für die Protoplastenisolation und -regeneration besonders im Hinblick auf die Sprossregeneration untersucht werden. Hierdurch könnte das Spektrum der für folgende Fusionsexperimente zur Verfügung stehenden Genotypen beträchtlich erweitert werden. Auf Grund der bisherigen Ergebnisse wurde nur in jenen Fusionskombinationen eine hohe Sprossregenerationsrate erzielt, in denen beide Partner zuvor eine gute Sprossregeneration zeigten. Eine Optimierung der bereits bestehenden Fusionsmethode hinsichtlich der Heterofusionsraten wäre ebenfalls denkbar. Optimierungsbedarf besteht auch bei der Selektion der heterologen Fusionsprodukte, insbesondere bei der Fixierung der Protoplasten auf den "Cell Finder"-Objektträgern. Auf

Grund der bisherigen Erfahrungen mit RAPD-Primern zur Identifikation von Hybriden, sollten zukünftig, für jede Fusionskombination die am besten geeigneten Primer ermittelt werden. Hierzu wird es notwendig sein weitere RAPD-Primer zu untersuchen. Sollte es nicht möglich sein geeignete Primer zu ermitteln, könnten mögliche Hybriden mittels AFLP-Analyse untersucht werden, bzw. wäre die Erstellung eines Gattungsspezifischen Primers eine Alternative zu den bereits genannten RAPD- und AFLP-Primern. Da sie auf Gattungsebene unterscheiden, hätten diese den Vorteil, dass sie unabhängig von der vorliegenden Fusionskombination eingesetzt werden können, was eine erhebliche Verringerung des Arbeitsaufwandes bedeuten würde.

7 Literaturverzeichnis

- AL-ATABEE, J.S., MULLIGAN, B.J. UND POWER, J.B. (1990): Interspecific somatic hybrids of *Rudbeckia hirta* and *R. laciniata* (*Compositae*). *Plant Cell Reports*, 8: 517-520
- ANDO, T., NOMURA, M., TSUKAHARA, S., WATANABE, H., KOKUBUN, H., TSUKAMOTO, T., HASHIMOTO, G., MARCHESI, E. UND KITCHING, I.J. (2001): Reproductive isolation in a native population of *Petunia sensu Jussieu* (*Solanaceae*). *Annals of Botany*, 88: 403-413.
- ANDO, T., KOKUBUN, H., WATANABE, H., TANAKA, N., YUKAWA, T., HASHIMOTO, G., MARCHESI, E., SUAREZ, E. UND BASUALDO, I.L. (2005): Phylogenetic analysis of *Petunia sensu Jussieu* (*Solanaceae*) using chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany*, 96: 289-297
- ARUMUGANATHAN, K. UND EARLE, E.D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 208-218, zitiert in MISHIBA, K.I., ANDO, T., MII, M., WATANABE, H., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G. UND MARCHESI, E. (2000): Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu Jussieu* (*Solanaceae*). *Annals of Botany*, 85: 665-673
- AVIV, D., CHEN, R. UND GALUN, E. (1986): Does pretreatment by rhodamine 6-G affect the mitochondrial composition of fusion-derived *Nicotiana* hybrids?. *Plant Cell Reports*, 5: 227-230
- BAJAJ, Y.P.S. UND DAVEY, M.R. (1974): The isolation and ultrastructure of pollen protoplasts. In H.F. Liskens (Editor): *Fertilization of higher plants*, S. 73-80. Amsterdam North Holland Publ. und Co.
- BENNETT, M.D. UND SMITH, J.B. (1976): Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. B274: 227-274, zitiert in MISHIBA, K.I., ANDO, T., MII, M., WATANABE, H., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G. UND MARCHESI, E. (2000): Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu Jussieu* (*Solanaceae*). *Annals of Botany*, 85: 665-673
- BERGOUNIOUX, C., PERENNES, C., BROWN, S.C. UND GADAL, P. (1988): Cytometric analysis of growth-regulator-dependent transcription and cell cycle progression in *Petunia* protoplast cultures. *Planta*, 175: 500-505
- BHOJWANI, S.S. UND RADZAN, M.K. (1996): *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier Verlag, Amsterdam
- BINDING, H. (1974): Regeneration von haploiden und diploiden Pflanzen aus Protoplasten von *Petunia hybrida* L.. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 74: 327-356
- BÖTTCHER, U.F., AVIV, D. UND GALUN, E. (1989): Complementation between protoplasts treated with either of two metabolic inhibitors results in somatic-hybrid plants. *Plant Science*, 63: 67-77
- BREWER, E.P., SAUNDERS, J.A., ANGLE, J.S., CHANEY, R.L. UND MCINTOSH, M.S. (1999): Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 761-771

- BUIVEVELD, J., SUO, Y., VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M.M. UND CREEMERS-MOLENAAR, J. (1998): Production and characterization of somatic hybrid plants between leek (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 765-775
- CASTIGLIONE, S., WANG, G., DAMIANI, G., BANDI, C., BISOFFI, S. UND SALA, F. (1993): RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus ssp.*) clones. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 54-59
- CHAND, P.K., DAVEY, M.R. POWER, J.B. UND COCKING, E.C. (1988): An improved procedure for protoplast fusing using polyethylene glycol. *Journal of Plant Physiology*, 133: 480-485
- COCKING, E.C. (1960): A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 197: 962-963
- COCKING, E.C., GEORGE, D., PRICE-JONES, M.J. UND POWER, J.B. (1977): Selection procedures for the production of inter-species somatic hybrids of *Petunia hybrida* and *Petunia parodii* II. Albino complementation selection. *Plant Science Letters*, 10: 7-12
- CONIA, J., BERGOUNIOUX, C., PERENNES, C., MULLER, P., BROWN, S. UND GADAL, P. (1987): Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes from *Petunia hybrida* protoplasts. *Cytometry*, 8: 500-508
- CONSTABEL F. UND KAO, K.N. (1974): Agglutination and fusion of plants by polyethylene glycol. *Canadian Journal of Botany* 52: 1603-1606
- CREEMERS-MOLENAAR, J., LOEFFEN, J.P.M. UND VAN DER VALK, P. (1988): The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence-derived callus of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. *Plant Science* 57: 165-172
- DOHM, A. (1993): Protoplastenkultur und -fusion verschiedener *Brassica*-Genotypen zur Etablierung eines CMS-Systems in *B. oleracea*. Dissertation, Universität Hannover
- DOLEZEL, J. SGORBATI, S. UND LUCRETTI, S. (1992): Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 625-631
- DOLEZEL, J. UND BARTOS, J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99-110
- DOROKHOV, D.B. UND KLOCKE, E. (1997): A rapid and economic technique for RAPD-analysis of plant genomes. *Russian Journal of Genetics*, 33: 358-365
- DURIEU, P. UND OCHATT, S.J. (2000): Efficient intergeneric fusion of pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protoplasts. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1237-1242
- DUTTA, S.K., DUTTA, K. UND POTRYKUS, I. (1990): Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both indica and japonica rice *O. sativa*. *Plant Science*, 67: 83-88
- EDWARDS, K., JOHNSTONE, C. UND THOMPSON, C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19: 1349

- FENG, G.H. UND OUYANG, R.G. (1988): The effect of KNO₃ concentration in callus induction medium for wheat anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12: 3-12
- FEDERICI, C.T., FANG, D.Q., SCORA, R.W. UND ROOSE, M.L. (1998): Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 812-822
- DE FILIPPIS, L., HOFFMANN, E. UND HAMPP, R. (1996): Identification of somatic hybrids of tobacco generated by electrofusion and culture of protoplasts using RAPD-PCR. *Plant Science*, 121: 39-46
- FLUHR, R., AVIV, D., EDELMAN, M. UND GALUN, E. (1984): Generation of heteroplastidic *Nicotiana* cybrids by protoplast fusion: analysis for plastid recombinant types. *Theoretical and Applied Genetics*, 67: 491-497
- FORD-LOGAN, J. UND SINK K.C. (1988): Plantlet regeneration from Protoplasts of *Petunia alpicola*. *Hort Science*, 23(2): 393-395
- FREARSON, E.M., POWER, J.B. UND COCKING, E.C. (1973): The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Developmental Biology*, 33: 130-137
- FRIES, R.F. (1911): Die Arten der Gattung *Petunia*. *Kunigl. Svenska Vetenskapsakademiens Handl* 46: 1-72, zitiert in TSUKAMOTO, T., ANDO, T., WATANABE, H., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G., SAKAZAKI, U., SUAREZ, E., MARCHESI, E., OYAMA, K. UND KAO, T-H. (2002): Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (*Solanaceae*). *Journal Plant Research*, 115: 185-193
- FURUTA, H., SHINOYAMA, H., NOMURA, Y., MAEDA, M. UND MAKARA, K. (2004): Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] and wormwood (*Artemisia sieversiana* J.F. Ehrh. Ex. Willd) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts. *Plant Science*, 166: 695-702
- FUSTER, O.O., DURAN-VILA, N. UND NAVARRO, L. (2005): Electrochemical protoplast in *Citrus*. *Plant Cell Reports*, 24: 112-119
- GALBRAITH, D.W. (1981): Microfluorimetric quantification of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using calcofluor white. *Physiologia Plantarum*, 53: 111-116
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. UND OJIMA, K. (1968): Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50: 151-158
- GEAR, A.R.L. (1974): A potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249: 3628-3637
- GLEBA, Y.Y. UND HOFFMANN, F. (1980): "Arabidobrasica": A novel plant obtained by protoplast fusion. *Planta*, 149: 112-117
- GLEBA, Y.Y. UND SYTNIK, K.M. (1984): Protoplast fusion, genetic engineering in higher plants. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.

- GLEBA, Y.Y., HINNISDAELS, S., SIDOROV, V.A., KALEDA, V.A., PAROKONNY, A.S., BORYSHUK, N.V., CHEREP, N.N., NEGRUTIU, I. UND JACOBS, M. (1988): Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by gamma fusion. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 760-766
- GLIMELIUS, K. UND BONNETT, H.T. (1986): *Nicotiana* hybrids with *Petunia* chloroplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, 72: 794-798
- GOLDS, T.J., BABZINSKY, J., RAUSCHER, G. UND KOOP, H.U. (1992): Computer controlled tracking of single cell development in *Nicotiana tabacum* L. and *Hordeum vulgare* L. protoplasts embedded in agarose/alginate films. *Journal of Plant Physiology*, 140: 582-587
- GOTTSCHALK, W. (1994): *Allgemeine Genetik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- GRIMES, H.D. UND BOSS, W.F. (1985): Intercellular calcium and calmodulin involvement in protoplast. *Plant Physiology*, 79: 253-258
- GROSSER, J.W. (1994): Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion and culture. *HortScience*, 29(11): 1241-1243
- HAHNE, G., HERTH, W. UND HOFFMANN, F. (1983): Wall formation and cell division in fluorescence-labelled plant protoplasts. *Protoplasma*, 115: 217-221
- HANSEN, M., HALLDEN, C. UND SÄLL, T. (1998): Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 139-146
- HAYWARD C. UND POWER J.B. (1975): Plant production from leaf protoplasts of *Petunia parodii*. *Plant Science Letters*, 4: 407-410
- HINNISDAELS S., BARILLER, L., MOURAS, A., SIDOROV, V., DEL-FAVERO, J., VEUSKENS, J., NEGRUTIU, I. UND JACOBS, M. (1991): Highly asymmetric intergeneric nuclear hybrids between *Nicotiana* and *Petunia*: evidence for recombinogenic and translocation events in somatic hybrid plants after "gamma"-fusion. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 609-614
- HORITA, M., MOROHASHI, H. UND KOMAI, F. (2003): Production of fertile somatic hybrid plants between oriental hybrid lily and *Lilium x Formolongi*. *Planta*, 217: 597-601
- HUNZIKER, A.T. (1979): South American *Solanaceae*: a synoptic survey. S. 49-85 in HAWKES, J.G., LESTER, R.N. UND SKELDING, A.D. (1979): *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press., London UK
- IZHAR S. UND POWER J.B. (1977): Genetical studies with *Petunia* leaf protoplasts 1. Genetic variation to specific growth hormones and possible genetic control on stages of protoplast development in culture. *Plant Science Letters*, 8: 375-383

- JONES, C.J., EDWARDS, K.J., CASTIGLIONE, S., WINFIELD, M.O., SALA, F., VAN DE WIEL, C., BREDEMEIJER, G., VOSMAN, B., MATTHES, M., DALY, A., BRETTSCHEIDER, R., BETTINI, P., BUIATTI, M., MAESTRI, E., MALCEVSKI, A., MARMIROLI, N., AERT, R., VOLCKAERT, G., RUEDA, J., LINACERO, R., VAZQUEZ, A. UND KARP, A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR marker in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381-390
- JOHNSTON, J.S., BENNETT, M.D., RAYBURN, A.L., GALBRAITH, D.W. UND PRICE, H.J. (1999): Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86 (5): 609-613
- JUSSIEU, A.L. (1803): Sur le *Petunia*, genre nouveau de la famille des plants solanees. *Ann. Mus. Hist. Nat.* 2: 214-216, zitiert in TSUKAMOTO, T., ANDO, T., WATANABE, H., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G., SAKAZAKI, U., SUAREZ, E., MARCHESI, E., OYAMA, K. UND KAO, T-H. (2002): Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (*Solanaceae*). *Journal Plant Research*, 115: 185-193
- KAO, K.N., GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. UND KELLER, W.A. (1971): Cell divisions in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature New Biol.* 232: 124
- KAO, K.N. UND MICHAYLUK, M.R. (1974): A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115: 355-367
- KAO, K.N. UND MICHAYLUK, M.R. (1975): Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126: 105-110
- KATO, C.Y., NAGAI, C.N., MOORE, P.H., ZEE, F., KIM, M.S., STEIGER, D.L. UND MING, R. (2004): Intra-specific DNA polymorphism in Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) assessed by AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 815-825
- KELLER, W.A. UND MELCHERS, G. (1973): The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Zeitung für Naturforschung*, 28c: 737-741
- KOBAYASHI, S., OHGAWARA, T., FUJIWARA, K. AND OIYAMA, I. (1991): Analysis of cytoplasmic genomes in somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and 'Murcott' tangor. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 6-10
- KRASNYANSKI, S., BALL, T.M. UND SINK, K.C. (1998): Somatic hybridization in mint: identification and characterization of *Mentha piperita* (+) *M. spicata* hybrid plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 683-687
- KULCHESKI, F.R., MUSCHNER, V.C., LORENZ-LEMKE, A.P., STEHMAN, J.R., BONATTO, S.L., SALZANO, F.M. UND FREITAS, L.B. (2006): Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (*Solanaceae*). *Genetica*, 126: 3-14
- DE LAAT, A.M.M., GÖHDE, W. UND VOGELZANG, M. J.D.C. (1987): Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding*, 99: 303-309

- LA LAVE, P. UND LEXARZA, J.J.M. (1825): *Calibrachoa*. *Novorum Vegetabilium Descriptiones* 2: 3, zitiert in TSUKAMOTO, T., ANDO, T., WATANABE, H., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G., SAKAZAKI, U., SUAREZ, E., MARCHESI, E., OYAMA, K. UND KAO, T-H. (2002): Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (*Solanaceae*). *Journal Plant Research*, 115: 185-193
- LANDGREN, M. UND GLIMELIUS, K. (1990): Analysis of chloroplast and mitochondrial segregation in three different combinations of somatic hybrids produced within *Brassicaceae*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 776-784
- LEE, C.H., PAEK, K.Y. UND HWANG, J.K. (1994): Production and characterisation of putative intertribal somatic hybrids between *Salpiglosses* and *Petunia*. *Journal of Korean Horticultural Science*, 35(4): 360-369
- LIU, J., XU, X. UND DENG, X. (2005): Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 19-44
- MALAURE, R.S., DAVEY, M.R. UND POWER, J.B. (1990): Plant regeneration from protoplasts of *Felicia* and *Brachycome*. *Plant Cell Reports*, 9: 109-112
- MARCHAND, R., DAVEY, M.R. UND POWER, J.B. (1997): Isolation and culture of mesophyll protoplasts from *Rosa hybrida*. *Plant Cell and Tissue Culture*, 50: 131-134
- MEDGYESY, P., FEJES, E. UND MALIGA, P.(1985): Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6960-6964
- MISHIBA, K.I., ANDO, T., MII, M., WATANABE, H., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G. UND MARCHESI, E. (2000): Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu Jussieu (Solanaceae)*. *Annals of Botany*, 85: 665-673
- MIZUHIRO, M., ITO K. UND MII, M. (2001): Production and characterization of interspezifische somatic hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*. *Plant Science*, 161: 489-496
- MULLER J.F., MISSONIER C. UND CABOCHE M. (1983): Low density growth of cells derived from *Nicotiana* and *Petunia* protoplasts: Influence of the source of protoplasts and comparison of the growth-promoting activity of various auxins. *Physiologia Plantarum* 57: 35-41
- MURASHIGE, T. UND SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479
- NAGATA, T. UND TAKEBE, I. (1971): Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, 99: 12-20
- NAKANO, M. UND MII, M. (1992): Protoplast culture and plant regeneration of several species in the genus *Dianthus*. *Plant Cell Reports*, 11: 225-228
- NAKANO, M. UND MII, M. (1993): Interspecific somatic hybridization in *Dianthus*: selection of hybrids by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *Plant Science*, 88: 203-208
- NBV / UGA (2003) Geschäftsbericht

NBV / UGA (2004) Geschäftsbericht

- O'CONNELL, M.A. UND HANSON, M.R. (1987): Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon penellii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 75: 83-89
- OH, M.H. UND KIM, S.G. (1994): Plant regeneration from petal protoplast culture of *Petunia hybrida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36: 275-283
- OH, M.H., CHOI, D.W., KWON, Y.M. UND KIM, S.-G. (1995a): An assessment of cytological stability in protoplast cultures of tetraploid *Petunia hybrida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41: 243-248
- OH, M.-H., LEE, H.S., SONG, J.Y., CHOI, D.-W., KWON, Y.M., LEE, J.S. UND KIM, S.-G. (1995b): Origin of tetraploidization in protoplast culture of *Petunia (Petunia hybrida)*. *Journal of Heredity*, 86: 461-466
- OH, M.H. UND CLOUSE S.D. (1998): Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports*, 17: 921-92.
- OLIVARES-FUSTER, O., DURAN-VILA, N. UND NAVARRO, L. (2005): Electrochemical protoplast fusion in *Citrus*. *Plant Cell Reports*, 24: 112-119
- OLMSTEAD, R.G. UND PALMER, J.D. (1992): A chloroplast DNA phylogeny of the *Solanaceae*: subfamilial relationships and character evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79: 346-360
- OUYANG, J.W., ZHOU, S.M. UND JIA, S.E. (1983): The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 66: 101-109
- PAROKONNY, A.S., KENTON, A.Y., GLEBA, Y.Y. UND BENNETT, M.D. (1992): Genome reorganization in *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids analysed by in situ hybridization. *The Plant Journal*
- PATI, P.K., SHARMA, M. UND AHUJA, P.S. (2005): Extra thin alginate film: An efficient technique for protoplast culture. *Protoplasma*, 226: 217-221
- PENTAL, D., HAMILL, J.D., PIRRIE, A. UND COCKING, C. (1986): Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. *Molecular General Genetics*, 202: 342-347
- PHILLIPS, R. UND DARRELL, N.J. (1992): Pigment production in hormone-autonomous cell cultures following somatic fusion of petal and tumour protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Science*, 83: 95-102
- POTRYKUS, I. (1971): Fusion von Protoplasten mit gut sichtbaren Kernen. *Naturwissenschaften*, 58: 328
- POWER J.B., BERRY S.F., CHAPMAN J.V. UND COCKING E.C. (1979): Somatic hybrids between unilateral cross- incompatible *Petunia* species. *Theoretical Applied Genetics*, 55: 97-99

- POWER J.B., BERRY S.F. CHAPMAN J.V. UND COCKING E.C. (1980): Somatic hybridization of sexually incompartmentable *Petunias*: *Petunia parodii*, *Petunia parviflora*. Theoretical Applied Genetics, 57: 1-4
- RAMULU, K.S., DIJKHUIS, P., ROEST, S., BOKELMANN, G.S. UND DE GROOT, B. (1984): Early occurrence of genetic instability in protoplast cultures of potato. Plant Science Letters, 36: 79-86
- RAMULU, K.S., DIJKHUIS, P., HANISCH TEN CATE, CH.H. UND DE GROOT, B. (1985): Patterns of DNA and chromosome variation during in vitro growth in various genotypes of potato. Plant Science, 41: 69-78
- RASMUSSEN, J.O. UND RASMUSSEN, O.S. (1995): Characterization of somatic hybrids of potato by use of RAPD markers and isozyme analysis. Physiologia Plantarum, 93: 357-364
- RAVEH, D. HUBERMAN, E. UND GALUN, E. (1973): In vitro culture of tobacco protoplasts: use of feeder techniques to support division of cells plated at low densities. In vitro, 9: 216-222
- RENAUDIN, J.P., TOURNAIRE, C., BRILLAT, M. UND TEYSSENDIER DE LA SERVE, B. (1990): Sequential hormon requirement for growth and organogenesis of *Petunia hybrida* protoplasts-derived calli. Plant Science, 71: 239-250
- ROKKA, V.M., XU, Y.S., KANKILA, J., KUUSELA, A., PULLI, S. UND PEHU, E. (1994): Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. Euphytica, 80: 207-217
- ROSE, R.J., THOMAS, M.R. UND FITTER, J.T. (1990): The transfer of cytoplasmic and nuclear genomes by somatic hybridization. Australian Journal of Plant Physiology, 17: 303-321
- SCHUM, A., HOFMAN, K. UND FELTEN, R. (2002): Fundamentals for integration of somatic hybridization in rose breeding. Acta Horticulturae, 572: 29-35
- SHIBA, T. UND MII, M. (2005): Visual selection and maintenance of the cell lines with high plant regeneration ability and low ploidy level in *Dianthus acicularis* by monitoring with flow cytometry analysis. Plant Cell Reports, 24: 572-580
- SHILLITO R.D., PASZKOWSKI J. UND POTRYKUS I. (1983): Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. Plant Cell Reports, 2: 244-247
- SHIMIZU, K., MIYABE, Y., NAGAIKE, H. YABUYA, T. UND ADACHI, T. (1999): Production of somatic hybrid plants between *Iris ensata* Thunb. and *I. germanica* L.. Euphytica, 107: 105-113
- SINHA, A. UND CALIGARI, P.D.S. (2005): Enhanced protoplast division by encapsulation in droplets: An advance towards somatic hybridisation in recalcitrant white lupin. Annals of Applied Biology, 146: 441-448
- SINK K.C. UND POWER J.B. (1977): The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts of *Petunia parviflora* Juss.. Plant Science Letters, 10: 335-340

- SKROCH, P. UND NIENHUIS, J. (1995): Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 1086-1091
- SKVIRSKY, R.C., HANSON, M.R. UND AUSUBEL, F.M. (1984): Intraspecific genetic variation in cytokinin-controlled shoot morphogenesis from tissue explants of *Petunia hybrida*. *Plant Science Letters*, 35: 237-246
- SQUIRRELL, J., MANDEGARAN, Z., YOKOYA, K., ROBERTS, A.V. UND MOTTLEY, J. (2005): Cell lines and plants obtained after protoplast fusion of *Rosa+Rosa*, *Rosa+Prunus* and *Rosa+Rubus*. *Euphytica*, 146: 223-231
- STEHMANN, J.R. UND SEMIR J. (1997): A new species and new combinations in *Calibrachoa* (*Solanaceae*). *Novon*, 7: 417-419
- TAGUCHI T., SAKAMOTO K. UND TERADA M. (1993): Fertile somatic hybrids between *Petunia hybrida* and a wild fertile species *Petunia variabilis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 75-80
- TASKI-AJDUKOVIC, K., VASIC, D. UND NAGL, N. (2006): Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* (Schrader) via protoplasts. *Plant Cell Reports*, 25: 698-704
- TERADA, K., YAMASHITA, Y., NISHIBAYASHI, S. UND SHIMAMOTO, K. (1987): Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *Theoretical and Applied Genetics*, 73: 379-384
- TOMZIK, J.E. UND HAIN, R. (1988): Transfer and segregation of triazine tolerant chloroplasts in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 165-171
- TREHIN, C., PLANCHAIS, S., GLAB, N., PERENNES, C., TREGEAR, J. UND BERGOUNIOUX, C. (1998): Cell cycle regulation by plant growth regulators: involvement of auxin and cytokine in the re-entry of *Petunia* protoplasts into the cell cycle. *Planta*, 206: 215-224
- TRICOLI, D.M., HEIN, M.B. UND CARNES, M.G. (1986): Culture of soybean mesophyll protoplasts in alginate beads. *Plant Cell Reports*, 5: 334-337
- TSUKAMOTO, T., ANDO, T., WATANABE, H., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G., SAKAZAKI, U., SUAREZ, E., MARCHESI, E., OYAMA, K. UND KAO, T-H. (2002): Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (*Solanaceae*). *Journal Plant Research*, 115: 185-193
- ULRICH, I. UND ULRICH, W. (1991): High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. *Protoplasma*, 165: 212-215
- VAN DER VALK, H.C.P.M., BLAAS, J., VAN ECK, J.W. UND VERHOEVEN, H.A. (1988): Vital DNA staining of agarose-embedded protoplasts and cell suspensions of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Reports*, 7: 489-492
- VINDELOV, L.L., CHRISTENSEN, I.J., JENSEN, G.J. UND NISSEN, N.I. (1983): Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by set of methods for sample-storage, staining and interval standardization. *Cytometry* 3: 332-339

- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HOMES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. UND ZABEAU, M. (1995): AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414
- WAARA, S., WALLIN, A. UND ERIKSSON, T. (1991): Production and analysis of intraspecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science*, 75: 107-115
- WAARA, S. UND GLIMELIUS, K. (1995): The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica*, 85: 217-233
- WAARA, S., NYMAN, M. UND JOHANNISSON, A. (1998): Efficient selection of potato heterokaryons by flow cytometric sorting and regeneration of hybrid plants. *Euphytica*, 101: 293-299
- WATANABE, H., ANDO, T., IDA, S., SUZUKI, A., BUTO, K.I., TSUKAMOTO, T., HASHIMOTO, G. UND MARCHESI, E. (1996): Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 65(3): 625-634
- WATANABE, H., ANDO, T., IDA, S., BUTO, K.I., TSUKAMOTO, T., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G. UND MARCHESI, E. (1997): Cross-compatibility of *Petunia pubescens* and pygmae with native taxa of *Petunia*. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science*, 66: 607-612
- WATANABE, H., ANDO, T., NISHINO, E., KOKUBUN, H., TSUKAMOTO, T., HASHIMOTO, G. UND MARCHESI, E. (1999): Three groups of species in *Petunia sensu Jussieu* (*Solanaceae*) inferred from the intact seed morphology. *American Journal of Botany*, 86 (2): 302-305
- WATANABE, H., ANDO, T., TSUKAMOTO, T., HASHIMOTO, G. UND MARCHESI, E. (2001): Cross-compatibility of *Petunia exserta* with other *Petunia* taxa. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 70(1): 33-40
- WHITE, J. UND REES, H. (1987): Chromosome weight and measures in *Petunia*. *Journal of Heredity*, 55: 53-59
- WIDHOLM, J.M. (1972): The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47: 189-194
- WIJSMAN H.J.W., DE JONG, J.H. UND PEDERSEN, T.M. (1983): On the interrelationships of certain species of *Petunia* III. The position of *P. linearis* and *P. calcyna*. *Acta Botanica*, 32 (4): 323-332
- WIJSMAN, H.J.W. (1990): On the inter-relationships of certain species of *Petunia* VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (*Solanaceae*). *Acta Botanica*, 39(1): 101-102
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. UND TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22): 6531-6535
- WINKELMANN, T. UND GRUNEWALDT, J. (1995): Analysis of protoplast- derived plants of *Saintpaulia ionantha* H. Wendl.. *Plant Breeding*, 114: 346-350

-
- WINKELMANN, T. (1994): Zur Transformation, Protoplastenregeneration und -Fusion bei *Saintpaulia ionantha* und *Episcia* spec. Dissertation, Universität Hannover
- WINKELMANN, T., SPECHT, J. UND SEREK, M. (2006): Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill.. *Plant Tissue and Organ Culture*, 86: 337-347
- XING, H.Q., XIA, G.M. UND CHEN, H.M. (2001): Preliminary study on hybrid chromosome composition and relationship in symmetric hybridization between *Triticum aestivum* and intergeneric grasses (in Chinese), *Bull.Bot. Res.*, 21:74-78
- XU, Y.S., CLARK, M.S. UND PEHU, E. (1993): Use of RAPD-markers to screen somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Plant Cell Reports*, 12: 107-109
- XU, X., LIU, J. UND DENG, X. (2004): Production and characterization of intergeneric diploid hybrids derived from symmetric fusion between *Microcitrus papuana* Swingle and sour orange (*Citrus aurantium*). *Euphytica*, 136: 115-123
- YAMAGISHI, H., LANDGREN, M., FORSBERG, J. UND GLIMELIUS, K. (2002): Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 959-964
- YE, G.N. UND EARLE, D. (1991): Effect of cellulase on spontaneous fusion of maize protoplasts. *Plant Cell Reports*, 10: 213-216
- ZHANG, J., XIAO, Q., LI, K., CHEN, M., CHANG, J., LUO, L., LI, Y., LIU, Y., SHEWRY, P.R. UND HE, G. (2006): An optimal pooling strategy applied to high-throughput screening for rare marker-free transformants. *Biotechnology Letters*, 28: 1537-1544
- ZIEGLER, M.L. UND DAVIDSON, R.L. (1981): Elimination of mitochondrial elements and improved viability in hybrid cells. *Somatic Cell Genetics*, 7: 73-88
- ZIMMERMANN, U. UND SCHEURICH, P. (1981): High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta*, 151: 26-32

Anhang

Tab. A1: Für die Durchflusszytometrie verwendete *Petunia*- und *Calibrachoa*- Genotypen

Genotyp	Art
Pt10	<i>Petunia hybrida</i>
Pt18	<i>Petunia hybrida</i>
1	<i>Petunia hybrida</i>
2	<i>Petunia hybrida</i>
3	<i>Petunia hybrida</i>
4	<i>Petunia hybrida</i>
7	<i>Petunia hybrida</i>
8	<i>Petunia hybrida</i>
9	<i>Calibrachoa</i>
10	<i>Calibrachoa</i>
11	<i>Calibrachoa</i>
12	<i>Calibrachoa</i>
14	<i>Calibrachoa</i>
15	<i>Calibrachoa</i>

Tab. A2: Cv-Werte der durchflusszytometrischen Analyse für die untersuchten Genotypen

<i>Petunia</i>-Genotyp	cv	<i>Calibrachoa</i>- Genotyp	cv
Pt01	3,65	Ca02	4,2
Pt02	2,97	Ca03	4,3
Pt03	2,96	Ca04	3,84
Pt04	3,2	Ca05	3,68
Pt05	3,86	Ca06	3,33
Pt06	2,81	Ca07	3,98
Pt07	2,3	Ca09	3,36
Pt09	3,53	Ca10	4,05
Pt10	3,47	Ca11	3,14
Pt18	3,38	Ca12	3,86
1	2,6	9	3,35
2	2,96	10	3,09
3	3,66	11	2,96
4	3,55	12	4,03
7	3,43	14	3,07
8	3,13	15	3,35

Tab. A3: DNA-Ausbeuten mit dem Qiagen DNeasy Plant Kit

Genotyp	Anzahl der Isolierungen	DNA-Gehalt [µg/gFM]
Ca02	2	33,6 / 21,3
Ca03	2	17,2 / 47,1
Ca04	1	40,0
Ca05	2	24,0 / 31,9
Ca06	2	17,0 / 30,6
Ca07	1	32,5
Ca08	1	59,0
Ca09	2	52,0 / 40,4
Ca10	1	43,0
Ca11	2	17,0 / 33,3
Ca12	2	20,2 / 34,8
R31	1	41,7
Pt01	1	48,0
Pt02	2	34,5 / 40,0
Pt03	3	34,5 / 22,0
Pt05	1	41,2
Pt06	2	66,1 / 53,8
Pt07	1	51,0
Pt09	2	51,5 / 52,2
P04	1	34,2
<i>Nicotiana</i>	1	31,3
<i>Salpiglossis</i>	1	29,1
<i>Fabiana 1000</i>	1	31,3
<i>Fabiana 2000</i>	1	30,0

Tab. A4: Zusammensetzung der Medien für die Protoplasten- und Kalluskultur

Substanz [mg/l]	Medium				
	BNE 9	8pm7	KF1	KF2	KF2 Fest
NH ₄ NO ₃	600	600	600	600	600
KNO ₃	1900	1900	1900	1900	1900
CaCl ₂ x H ₂ O	600	600	600	600	600
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	300	300	300	300	300
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170
KCL	300	300	300	300	300
MnSO ₄ x H ₂ O			10		
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O			2		
H ₃ BO			3		
KJ			0,75		
CuSO ₄ x 5 H ₂ O			0,025		
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O			0,25		
CoCl ₂ x 6 H ₂ O			0,025		
NaFeEDTA			25		
Na-Pyruvat			20		
Zitronensäure			40		
Äpfelsäure			40		
Fumarsäure			40		
Myo-Inosit			100		
Thiamin HCL			10		
Nicotinsäure			1		
Pyridoxin			1		
D (-) Fruktose			250		
D (-) Ribose			250		
D (-) Xylose			250		
D (-) Mannose			250		
L (+) Rhamnose			250		
D (-) Cellobiose			250		
Sorbitol			250		
Mannitol			250		

Tab. A5: Zusammensetzung der Medien für die Sprossregeneration und Sprosswachstum

Substanz	Konzentration mg/l
Makroelemente	
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
CaCl ₂ x H ₂ O	166
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
Mikroelemente	
MnSO ₄ x H ₂ O	8,45
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	5,3
H ₃ BO ₃	3,1
KJ	0,415
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,0125
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,125
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,0125
Na-FeIII Salz v. Chel. II	34,51
Myo Inosit	100
Glycin	2,0
Nicotinsäure	0,5
Thiamin-HCL	0,1
Pyridoxin-HCL	0,5
Saccharose	20 g/l* bzw. 30 g/l* ¹
Plant Agar (Duchefa)	8,0 g/l
pH-Wert	5,7

* für 5.0 und 5.3 (s. Tab.)

*¹Pet 1 bis Pet K (s. Tab.)

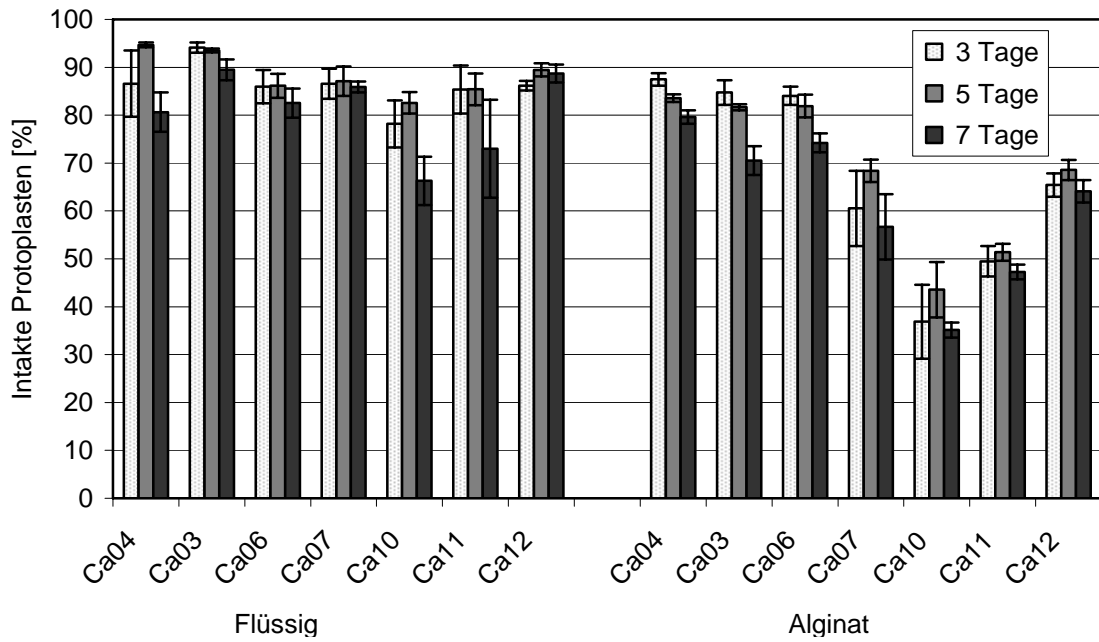


Abb. A1: Anteil intakter Protoplasten in Abhängigkeit von der Art der Kultur, dargestellt für verschiedene *Calibrachoa*-Genotypen.

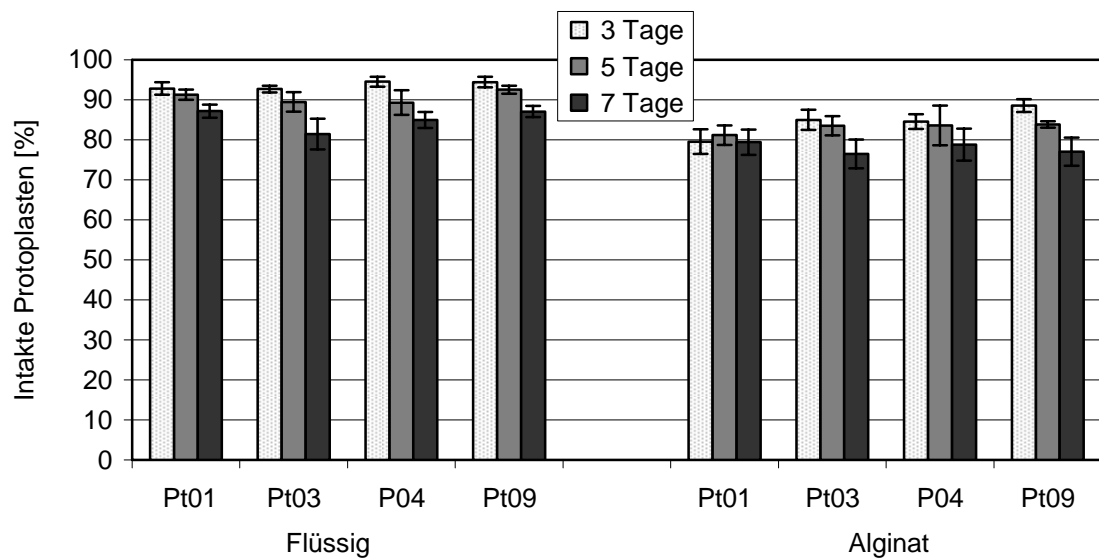


Abb. A2: Anteil intakter Protoplasten in Abhängigkeit von der Art der Kultur, dargestellt für verschiedene *Petunia*-Genotypen.

Tab. A6: Übersicht über alle durchgeführten Versuche zur Sprossregeneration

Genotyp + Versuchs- nummer	Anzahl plattierte Kalluse (n) je Versuch und Sprossregenerationsrate (S) nach achtwöchiger Kultur								
		Pet 2	Pet D	Pet E	Pet G	Pet H	Pet I	Pet J	Pet K
Pt01 (1) / (2)	n		112/-	144/80	96/ 80	64/80	80/80	80/80	80/80
	S [%]		0/-	28/0	23/0	39/18	56/0	51/0	90/0
Pt02 (1)	n		80	80					
	S [%]		38	46					
Pt03 (1)	n			60	60	75	75	75	75
	S [%]			17	78	12	25	27	33
Pt07 (1)	n			84	70	70	98	70	70
	S [%]			46	59	33	78	60	87
Pt09 (1)	n	75		90	90	90	90	90	75
	S [%]	0		0	0	0	0	0	0
Ca02 (1) / (2)	n		75/60	75/60	75/60	75/60	75/60	75/60	75/60
	S [%]		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Ca03 (1) / (2) / (3)	n		70/75/-	70/75/36	70/75/36	70/75/36	70/75/36	70/75/36	70/75/36
	S [%]		0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Ca04 (1) / (2) / (3)	n			-/-/60	90/60/60	-/-/60	-/-/60	-/-/60	-/-/60
	S [%]			-/-/12	21/30/5	-/-/2	-/-/3	-/-/0	-/-/0
Ca06 (1) / (2)	n			100/100	100/ 100	100/0	100/0	100/ 120	100/ 140
	S [%]			1/0	14/33	0/-	0/-	8/14	16/21
Ca07 (1) / (2) / (3)	n		75/ 75/-	75/75/36	75/75/36	75/75/36	75/75/36	75/75/36	75/75/36
	S [%]		0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Ca10 (1) / (2) / (3) / (4)	n			-/60/ 45/70	-/75/ 30/70	90/120/30 /70	-/75/ 30/70	-/- / 30/70	-/-/30/70
	S [%]			-/32/69/26	-/36/57/36	42/66/77 38	-/32/17/20	-/-/63/23	-/-/40/0
Ca11 (1) / (2)	n			48/70	48/70	48/56	48/84	48/56	48/70
	S [%]			83/3	31/3	60/14	67/4	35/7	33/0
Ca12 (1) / (2)	n			-/105	-/ 75	24/75	-/ 75	-/105	-/ 75
	S [%]			-/46	-/30	67/74	-/60	-/0	-/0
R31 (1)	n				72	96			
	S [%]				45	19			

Bezugsquellenverzeichnis

Firma		Kontakt
applichem		www.appliChem.de
AXON Labortechnik		www.axon-lab.de
Biozym Diagnostik GmbH		www.biozym.com
Carl Roth GmbH		www.carl-roth.de
Duchefa		www.duchefa.com
Eppendorf		www.eppendorf.de
Fluka		www.sigmaaldrich.com
Licor-Bioscience		www.licor.com
MBI Fermentas GmbH		www.fermentas.com
MWG Biotech GmbH		www.MWG-biotch.de
Nalgene bzw. nunc als Vertreiber in Deutschland		www.nalgenelabware/ www.nuncbrand.com
POG Präzisionsoptik Gera GmbH		www.precisionsoptic.com
Partec		www.partec.de
Qiagen GmbH		www.1.qiagen.com
Sarstedt		www.sarstedt.com
Sigma		www.sigma-zentrifugen.de
Sigma- Aldrich		www.sigmaaldrich.com
ZEISS Fa. Carl Zeiss		www.zeiss.de

Danksagung

Mit der Vorlage der Dissertation verbinde ich meinen Dank an Frau Prof. Dr. M. Serek für ihre Unterstützung sowie die Überlassung des Themas.

Bei Frau Prof. Dr. T. Winkelmann möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates bedanken. Außerdem möchte ich mich für ihre unermüdliche Unterstützung und ihre aufmunternden Worte im Verlauf dieser Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. T. Debener sowie Frau Dr. A. Schum.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den Kollegen der Abteilung Zierpflanzenbau, im besonderen bei Herrn Dr. Heiko Mibus-Schoppe der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand sowie den technischen Assistentinnen Frau A. Steding und Frau W. von Oertzen weiterhin bedanken möchte ich mich bei Frau G. Bölsing.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Bürokolleginnen Dipl. Ing. V. Mußmann und Msc. B. Raffener für die Korrektur dieser Arbeit, ihre unermüdliche Unterstützung und die schöne Zeit die wir miteinander verbringen durften.

Danken möchte ich auch meiner ganzen Familie, die mir in besonders schweren Zeiten immer zur Seite gestanden hat und auf die ich mich immer verlassen konnte.

Weiterhin möchte ich dem Bundesministerium für Wissenschaft, der Pro Inno und dem AiF für die finanzielle Förderung dieser Arbeit danken.

Lebenslauf

Name: Lara Meyer

Geboren: 30.09.1974

Geburtsort: Hildesheim

Schulausbildung:

1981 – 1985 Didrik-Pining-Grundschule, Hildesheim

1985 – 1994 Robert-Bosch-Gesamtschule, Hildesheim

Berufliche Ausbildung:

1995 – 1997 Berufsausbildung zur Zierpflanzengärtnerin

Hochschulausbildung:

1997 - 2002 Studium der Gartenbauwissenschaften am Fachbereich Gartenbau der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Diplom-Agraringenieurin

Okt. 2002 Promotionsstudium, am Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften, Abteilung Zierpflanzenbau der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Berufliche Tätigkeit:

Okt. 2002-Feb. 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften, Abteilung Zierpflanzenbau der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Ab Dez. 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften, Abteilung Zierpflanzenbau der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover