

**Green Fluorescent Protein (GFP) zur Optimierung
von Transformationsmethoden und zur
Entwicklung transgener Zierpflanzen mit
verbesserter Verbraucherakzeptanz**

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

Doktorin der Gartenbauwissenschaften

Dr. rer. hort.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. agr. Viola Mußmann

geboren am 09.07.1975 in Liebenau

2008

Referentin:	Prof. Dr. Margrethe Serek
Korreferentin:	Prof. Dr. Traud Winkelmann
Tag der Promotion:	27.06.2008

Kurzfassung

Viola Mußmann

Green Fluorescent Protein (GFP) zur Optimierung von Transformationsmethoden und zur Entwicklung transgener Zierpflanzen mit verbesserter Verbraucherakzeptanz

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Methoden für eine effiziente Produktion und Detektion von gentechnisch veränderten Zierpflanzen im Segment Beet- und Balkonpflanzen mit verbesserter Verbraucherakzeptanz. Ausgewählt wurden *Petunia* Cultivars, *Pelargonium zonale* Cultivars, *Pelargonium peltatum* Cultivars und *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) aufgrund ihrer führenden Marktstellung im Segment Beet- und Balkonpflanzen und ihrer unterschiedlichen In-vitro-Regenerationsfähigkeit. Eine alternative Strategie für die alleinige Selektion der transgenen Pflanzen mittels des visuellen Markers Green Fluorescent Protein (*gfp*) sollte entwickelt werden, die den Verzicht auf umstrittene Antibiotika- oder Herbizidresistenzen als Selektionsmarker ermöglicht.

Bei *Petunia* zeigten erste Transformationsversuche mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP in bestimmten *Agrobacterium*-Stämmen starke, indirekte Sprossregeneration an Blattexplantaten, unter denen jedoch keine transgenen Sprosse identifiziert werden konnten. Daraufhin wurde der Einfluss verschiedener *Agrobacterium*-Stämme auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin untersucht. Nach Inkubation der *Agrobacterium*-Stämme GV3101 und EHA105 in phosphinothricinhaltigem Kulturmedium zeigte sich eine verminderte Wirksamkeit von Phosphinothricin. Dies ließ die Vermutung eines Abbaus oder einer Detoxifizierung von Phosphinothricin zu. In folgenden Transformationsversuchen fand der Vektor pMen65smRS-GFP mit *nptII* als Selektionsmarker im *Agrobacterium*-Stamm ABI Verwendung. Dieser resultierte bereits in der Kallusphase mit höherer GFP-Expression in potentiell transgenem Gewebe und ermöglichte die alleinige Selektion über GFP. In der Variante GFP+Kan konnte in den zwei Genotypen 'Famous Electric Purple' und 'Famous Lilac Dark Vein' eine höhere Transformationsrate als in der Variante GFP festgestellt werden. Im Genotyp 'Famous Violet Dark Eye' waren die Transformationsraten in den Varianten GFP und GFP+Kan identisch, lediglich im Genotyp 'Famous Cerise Pearl' wies die Variante GFP eine höhere Transformationsrate auf.

Bei Selektion ausschließlich aufgrund der GFP-Expression wurde im Vergleich zur Selektion mit Kanamycin und GFP bei allen vier untersuchten *Petunia*-Genotypen eine höhere Transformationsrate erzielt. Für die molekulare Analyse konnte eine effektive, kostengünstige und mit geringstem apparativem Aufwand durchzuführende Methode zur Aufbereitung des Probenmaterials und DNA-Extraktion nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) für *Petunia* und *Pelargonium* angewendet werden. Ein Nachweis der Integration und Expression von Transgenen in *Petunia* zeigte neben singulären Integrationen des *smRS-GFP* auch multiple Integrationen, die auch anhand ihrer GFP-Expression mikroskopisch unterschieden werden konnten.

Die alleinige Selektion über GFP konnte in *Pelargonium* ebenfalls etabliert werden. Nach indirekter Regeneration an Blatt- oder Stielexplantaten wurde bei Selektion allein aufgrund der GFP-Expression lediglich eine maximale Transformationsrate von 1 % erreicht, während aus der Variante mit Kanamycin- und GFP-Selektion keine transgenen Sprosse hervorgingen. Für *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) konnten in Transformationsversuchen weder GFP-Expression in den verwendeten meristematischen Clustern festgestellt noch transgene Sprossen erzielt werden.

Durch die Wahl eines geeigneten *gfp*-Gens und der optimalen Filterkombination war es bei *Petunia* und *Pelargonium* möglich, transgene Pflanzen allein aufgrund ihrer GFP-Fluoreszenz zu selektieren und somit auf umstrittene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene zu verzichten.

Schlagwörter: *Agrobacterium tumefaciens*, Green Fluorescent Protein, Zierpflanzen, transgene Pflanzen

Abstract

Viola Mußmann

Green Fluorescent Protein (GFP) as a tool for optimisation of transformation methods and for development of transgenic ornamental plants with higher consumer acceptance

The objective of this research was to develop methods for an efficient production and detection of transgenic bedding plants. For this purpose *Petunia* cultivars, *Pelargonium zonale* cultivars, *Pelargonium peltatum* cultivars and *Impatiens* cultivars (Neuguinea Grp.) were investigated because of their leading position on bedding plant market and their different regeneration ability *in vitro*. The presented study focused on testing the applicability of the Green Fluorescent Protein (GFP) for selecting transgenic ornamentals without antibiotic or herbicide selection markers.

In *Petunia* the first stable transformation experiments involved a vector containing the *bar* gene and the *smRS-GFP* gene (pGreenII0229smRS-GFP) in different *A. tumefaciens* strains. High rates of indirect shoot regeneration were achieved from leaf explants and revealed a high proportion of non-transformed shoots (escapes). Furthermore the effect of different *A. tumefaciens* strains on the selection of phosphinothricin was investigated. Incubation of the *A. tumefaciens* strains GV3101 and EHA105 in phosphinothricin containing culture medium reduced effectiveness of phosphinothricin. This led to an assumption of degradation or detoxification of phosphinothricin. Further transformation experiments involved the vector pMen65smRS-GFP containing *nptII* gene. This vector resulted in visually clearly detectable GFP expressed callus and shoots and made it possible to select exclusively on GFP. Transformations using GFP versus GFP and kanamycin selection (GFP+Kan) was compared for transformation efficiencies. In *Petunia* a higher transformation rate was achieved by using GFP+Kan selection instead of only GFP in the genotypes 'Famous Electric Purple' and 'Famous Lilac Dark Vein'. The genotype 'Famous Violet Dark Eye' showed identical transformation rates in the variants GFP or GFP+Kan, besides the genotype 'Famous Cerise Pearl' which showed a higher transformation rate in the variant GFP.

Molecular analyses of resulted transgenic plants were made by use of an effective, inexpensive and with least machinery use for preparation and DNA extraction according to DOROKHOV AND KLOCKE (1997) in *Petunia* and *Pelargonium*. The detection of integration and expression of transgenic plants via southern hybridisation revealed single and multiple integrations of *smRS-GFP* in *Petunia*. Single copy plants showed intensive expression in all parts of the plants, while rising copy numbers led to only weak or partial expression of *smRS-GFP*.

Selection by use of GFP was established in *Pelargonium*. After indirect regeneration from leaf blade or petiole explants GFP expression was detected and a transformation rate of 1 % was achieved, whereas GFP+Kan selection resulted in no transgenic shoots. In transformation studies of *Impatiens* meristematic clusters were used, but showed no GFP expression and no transgenic plants.

With regard to an appropriate *gfp* gene and optimal filter combination it is possible to select transgenic *Petunia* and *Pelargonium* by means of GFP without antibiotic or herbicide resistance genes.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, Green Fluorescent Protein, Ornamentals, Transgenic Plants

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XII
Formelverzeichnis	XIV
Anhangsverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XV
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1 Pflanzenmaterial	5
2.2 Erhaltung und Kultur <i>in vitro</i>	8
2.3 Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien	9
2.3.1 Nährmedien für die pflanzliche In-vitro-Kultur	9
2.3.2 Nährmedien für die Bakterienkultur	11
2.4 Akklimatisierung und Kulturführung im Gewächshaus	13
2.5 Bakterienstämme	13
2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	13
2.5.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
2.6 Kultivierung von Bakterien	14
2.6.1 Bakterienanzucht.....	14
2.6.2 Bestimmung des Bakterientiters	14
2.6.3 Anlegen von Bakteriendauerkulturen.....	14
2.7 Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Transformation	14
2.8 Eingesetzte Gene und Transformationsvektoren	16
2.8.1 Eingesetzte Gene.....	16
2.8.2 Transformationsvektoren	17
2.9 Enzyme	21
2.9.1 Restriktionsenzyme	21
2.9.2 DNA modifizierende Enzyme und Polymerasen	21
2.10 Synthetische Oligonukleotide	22
2.11 Agarosegelelektrophorese und verwendete Größenstandards	22

2.12 Infiltration zum transienten Nachweis von GFP	24
2.12.1 Herstellung der <i>A. tumefaciens</i> -Suspension zum transienten Nachweis	25
2.12.2 Infiltration der Blätter	26
2.13 <i>A. tumefaciens</i>-vermittelte Pflanzentransformation	26
2.13.1 Kultur, Anzucht, Aufreinigung von <i>A. tumefaciens</i> für die Pflanzentransformation	26
2.13.2 Transformationsmethode.....	27
2.13.3 Selektion und Regeneration transgener Pflanzen.....	31
2.13.3.1 Selektion mit Phosphinothricin	31
2.13.3.2 Selektion mit Kanamycin.....	32
2.13.3.3 Ohne Selektionsagens	32
2.13.3.4 Vergleich der Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP	32
2.14 Einfluss des <i>A. tumefaciens</i>-Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin	33
2.15 GFP-Fluoreszenzmikroskopie	36
2.16 Histochemischer GUS-Test	37
2.17 Isolation von Nukleinsäuren	38
2.17.1 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
2.17.2 Isolation von Gesamt-DNA aus Pflanzen	39
2.17.2.1 QIAGEN DNeasy™ Plant Mini Kit.....	39
2.17.2.2 Extraktion mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid).....	40
2.17.2.3 DNA-Isolation nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997).....	41
2.17.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen.....	42
2.18 Klonierung zur Erstellung neuer Vektoren	43
2.19 DNA-Sequenzierung	44
2.20 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.21 Reverse Transkriptase (RT)-PCR	45
2.22 Southern Hybridisierung	46
2.23 Statistische Auswertung	50
3. Ergebnisse	51
3.1 Untersuchungen zur transienten GFP-Expression	51
3.1.1 <i>Petunia</i> Cultivars.....	51
3.1.2 <i>Pelargonium</i>	52
3.1.3 <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.)	52
3.2 Klonierung zur Erstellung neuer Vektoren	53
3.2.1 Klonierung des Vektors pGreenII0229smRS-GFP	53
3.2.2 Klonierung des Vektors pMen65smRS-GFP	54
3.3 <i>A. tumefaciens</i>-vermittelte Transformation von <i>Petunia</i> Cultivars	55
3.3.1 Ermittlung geeigneter Selektionsbedingungen.....	55
3.3.1.1 Phosphinothricin (PPT)-Selektion.....	55

3.3.1.2 Kanamycin-Selektion.....	59
3.3.2 Einfluss des <i>A. tumefaciens</i> -Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin	62
3.3.3 Einfluss des Vektorsystems auf das Transformationsergebnis.....	67
3.3.3.1 Transformationseffizienz von pGreenII0229smRS-GFP	67
3.3.3.2 Vergleich der Transformationseffizienz von pGreenII0229 mit pMen65	69
3.3.4 Vergleich der Transformationseffizienz bei Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP.....	73
3.3.5 Nachweis der Integration und Expression von Transgenen	79
3.3.5.1 Vergleich von drei DNA-Extraktionsmethoden.....	79
3.3.5.2 Überprüfung transgener Integrationen über Polymerase Kettenreaktion (PCR)	84
3.3.5.2.1 Transformationen mit pGreenII0229smRS-GFP	84
3.3.5.2.2 Transformationen mit pMen65smRS-GFP	85
3.3.5.3 Southern Hybridisierung zum Nachweis der Integration von <i>smRS-GFP</i>	87
3.3.5.3.1 Transformationen mit pGreenII0229 <i>smRS-GFP</i>	87
3.3.5.3.2 Transformationen mit pMen65smRS-GFP	89
3.3.5.4 GFP-Expression	93
3.3.5.4.1 Transformationen mit pGreenII0229smRS-GFP	93
3.3.5.4.2 Transformationen mit pMen65smRS-GFP	97
3.3.5.5 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	101
3.4 <i>A. tumefaciens</i>-vermittelte Transformation von <i>Pelargonium</i>	103
3.4.1 Ermittlung der geeigneten Selektionsbedingungen.....	103
3.4.1.1 Phosphinothricin-Selektion.....	103
3.4.1.2 Kanamycin-Selektion.....	105
3.4.2 Vergleich der Transformationseffizienz bei Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP.....	106
3.4.2.1 Transformationsversuche mit pGreenII0229smRS-GFP	106
3.4.2.2 Transformationsversuch mit pMen65smRS-GFP	106
3.4.3 GFP-Expression	111
3.4.4 Präparation von genomischer DNA aus <i>Pelargonium</i>	113
3.5 <i>A. tumefaciens</i>-vermittelte Transformation von <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.).....	115
3.5.1 Ermittlung der geeigneten Selektionsbedingungen.....	115
3.5.1.1 Phosphinothricin-Selektion.....	115
3.5.1.2 Kanamycin-Selektion.....	122
3.5.2 Einfluss des Vektorsystems auf das Transformationsergebnis.....	123
3.5.3 Präparation von genomischer DNA aus <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.).....	124
4. Diskussion	125
4.1 Transiente GFP-Expression	127
4.2 <i>A. tumefaciens</i>-vermittelte Transformation von <i>Petunia</i> Cultivars	129
4.2.1 Selektionsbedingungen	129
4.2.2 Einfluss des <i>A. tumefaciens</i> -Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin	131

4.2.3 Vergleich der Transformationseffizienz bei Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP.....	134
4.2.4 Nachweis der Integration und Expression von Transgenen	137
4.3 <i>A. tumefaciens</i>-vermittelte Transformation von <i>Pelargonium</i>	141
4.4 <i>A. tumefaciens</i>-vermittelte Transformation von <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.).....	144
5. Literatur.....	146
6. Anhang.....	167

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Verwendete <i>Petunia</i> Genotypen 'Famous Electric Purple' (A), 'Famous Lilac Dark Vein' (B)...	5
Abbildung 2.2: Verwendete <i>Petunia</i> Genotypen 'Famous Violet Dark Eye' (A), 'Famous Cerise Pearl' (B).....	6
Abbildung 2.3: Verwendete <i>Pelargonium peltatum</i> Cultivars 'Royal Blue'	6
Abbildung 2.4: Verwendete <i>Pelargonium zonale</i> Cultivars 'Katinka' (A) und 'Sailing' (B).....	7
Abbildung 2.5: Verwendete <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.): 'CP Red' (A), 'CP Violet' (B), 'CP White' (C)	8
Abbildung 2.6: Plasmidkarte des binären Vektors pGreenII0000.....	18
Abbildung 2.7: Plasmidkarte des Vektors pMen65.....	19
Abbildung 2.8: Plasmidkarte des binären Vektors pIBGUS	20
Abbildung 2.9: Fragmentlängen des λ - <i>PstI</i> Markers (Fermentas)	23
Abbildung 2.10: Fragmentlängen der zwei verwendeten 100bp Marker	23
Abbildung 2.11: Fragmentlängen des DIG-markierten DNA Molecular Weight Markers (Roche)	24
Abbildung 2.12: Schematische Darstellung von <i>A. tumefaciens</i> -vermittelter Pflanzentransformation und GFP- Expressionsbeobachtung	27
Abbildung 2.13: Präparation der Blattextplantate für <i>Petunia</i> Cultivars.....	28
Abbildung 2.14: In-vitro-Sprosskultur von <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) 'CP Red', Ausgangsmaterial für die Präparation von meristematischen Clustern (A: bewurzelter Spross, B: Spross nach Entfernung der Wurzeln).....	30
Abbildung 2.15: Präparation der Sprossachsenabschnitte von <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) 'CP Red' aus In-vitro-Sprosskulturen (A: seitliche Ansicht, B: Aufsicht).....	30
Abbildung 2.16: Sprossbildung an einem präparierten Sprossachsenabschnitts von <i>Impatiens</i> 'CP White' nach zwei Wochen (A) und daraus geschnittene meristematische Cluster (B).....	30
Abbildung 2.17: Sprossbildende meristematische Cluster nach vier Wochen Kultur bei <i>Impatiens</i> 'CP White' .	31
Abbildung 2.18: Schematische Darstellung des Versuchs zum Einfluss des <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin (Versuch 1)	35
Abbildung 2.19: Verwendete Filtersätze für <i>smRS-GFP</i> (A) für <i>mGFP4</i> (B) und Transmission (%) in Abhängigkeit von der Wellenlänge	37
Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der Klassifizierung der Stärke der GUS-Expression.....	38

Abbildung 3.1: SmRS-GFP-Expression von Epidermiszellen in <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Electric Purple' (40x Vergrößerung).....	51
Abbildung 3.2: <i>SmRS-GFP</i> -Expression in <i>Impatiens</i> Genotyp 'CP White'	53
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Erstellung der T-DNA von pGreenII0229smRS-GFP.....	54
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Erstellung des Vektors pMen65smRS-GFP.....	55
Abbildung 3.5: Wirkung von Phosphinothricin (PPT) auf die Sprossregeneration nach drei Wochen bei vier <i>Petunia</i> Genotypen	56
Abbildung 3.6: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) auf die Regeneration von nicht-transformierten Blattexplantaten bei <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Electric Purple' (A) und 'Famous Lilac Dark Vein' (B) in 6 cm Petrischalen nach dreiwöchiger Kultur.....	57
Abbildung 3.7: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) auf die Regeneration von nicht-transformierten Blattexplantaten bei <i>Petunia</i> Cultivars und 'Famous Violet Dark Eye' (A) 'Famous Cerise Pearl' (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen	58
Abbildung 3.8: Wirkung von Kanamycin auf die Sprossregeneration von <i>Petunia</i> Genotypen nach drei Wochen	59
Abbildung 3.9: Effekt steigender Konzentrationen von Kanamycin auf die Regeneration von nicht-transformierten Blattexplantaten bei <i>Petunia</i> 'Famous Electric Purple' (A) 'Famous Cerise Pearl' (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen.....	61
Abbildung 3.10: Effekt von Phosphinothricin (3 mg/L) und verschiedenen <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen nach Übernachtkultur auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat und Sprossregeneration von <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Electric Purple' nach drei Wochen (Versuch 1)	63
Abbildung 3.11: Effekt von Phosphinothricin (3 mg/L) während Übernachtkultur mit vier verschiedenen <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen auf die Sprossregeneration von <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Electric Purple' in 3,5 cm Petrischalen nach drei Wochen (Versuch 1).....	64
Abbildung 3.12: Wirkung der Phosphinothricingabe (3 mg/L zum Regenerationsmedium) nach Übernachtkultur (ÜNK) mit vier verschiedenen <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen bei <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Electric Purple' in 3,5 cm Petrischalen nach drei Wochen (Versuch 2).....	65
Abbildung 3.13: Effekt von verschiedenen <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen ohne Phosphinothricin-Selektion auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat von <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Electric Purple' nach drei Wochen (Versuch 3)	66
Abbildung 3.14: Transformationsraten (%) pGreenII0229smRS-GFP mit unterschiedlichem <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen bei vier <i>Petunia</i> Cultivars Genotypen; Anzahl Versuchwiederholungen	68
Abbildung 3.15: Selektionswirkung von Phosphinothricin (3 mg/L) in Transformationsversuchen mit pGreenII0229smRS-GFP in zwei <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämmen bei <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen.....	70
Abbildung 3.16: Selektionswirkung von Kanamycin (100 mg/L) in Transformationsversuchen mit pMen65GUS und pMen65smRS-GFP in <i>A. tumefaciens</i> ABI bei <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen.....	70
Abbildung 3.17: GUS-Expression an Blattexplantate von <i>Petunia</i> Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' drei (A) und vier Wochen (B) nach Transformation mit pMen65GUS in ABI.....	72
Abbildung 3.18: Histochemischer GUS-Assay: GUS-positiver Spross sechs Wochen nach Transformation von <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' mit pMen65GUS in ABI.....	72

Abbildung 3.19: Vergleich der smRS-GFP-Expression an Blattexplantaten von <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Lilac Dark Vein' transformiert mit pGreenII0229smRS-GFP in EHA105 (A) und transformiert mit pMen65smRS-GFP in ABI (B) 10 Tage nach Kokultur.....	73
Abbildung 3.20: Transformationsraten (%) für vier <i>Petunia</i> Genotypen (pMen65smRS-GFP im <i>A. tumefaciens</i> -Stamm ABI) mit Selektion alleinig über smRS-GFP (GFP) oder über GFP in Kombination mit Kanamycin (Kan+GFP).....	74
Abbildung 3.21: Auftreten von fasciierten Wuchs (roter Pfeil) bei <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Electric Purple' (A) und 'Famous Lilac Dark Vein' (B) transformiert mit pMen65smRS-GFP in der Variante GFP	79
Abbildung 3.22: Vergleich der DNA-Ausbeute bei <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Violet Dark Eye' unter Verwendung der Extraktionsmethode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997), QIAGEN und CTAB-Fällung	81
Abbildung 3.23: DNA-Ausbeute bei <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Violet Dark Eye' unter Verwendung der Extraktionsmethode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) bei Variation von Reaktionsgefäß, Aufbereitungsart und Ausgangsmaterial	82
Abbildung 3.24: PCR-Amplifikation des <i>smRS-GFP</i> -Gens bei putativ transgenen <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Electric Purple' (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105).....	84
Abbildung 3.25: PCR-Amplifikation des <i>smRS-GFP</i> -Gens bei putativ transgenen <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) selektiert alleinig über GFP	85
Abbildung 3.26: PCR-Amplifikation des <i>smRS-GFP</i> -Gens bei putativ transgenen <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) selektiert Kanamycin und GFP	85
Abbildung 3.27: PCR-Amplifikation des <i>nptII</i> -Gens bei putativ transgenen <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) selektiert Kanamycin und GFP	86
Abbildung 3.28: PCR-Amplifikation des <i>nptII</i> -Gens bei putativ transgenen <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) selektiert alleinig über die Expression von GFP	86
Abbildung 3.29: Autoradiogramm zum Nachweis der Integration und Kopienzahl des <i>smRS-GFP</i> -Gens in sieben <i>smRS-GFP</i> putativ transgenen <i>Petunia</i> -Sprossen der Sorte 'Famous Electric Purple' transformiert mit pGreenII0229smRS-GFP in EHA105 mittels Southern Hybridisierung (<i>smRS-GFP</i> -Sonde/ <i>HindIII</i>)	88
Abbildung 3.30: Autoradiogramm zum Nachweis der Integration des <i>smRS-GFP</i> -Gens in die genomische DNA transgenen <i>Petunia</i> 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) mittels Southern Hybridisierung (<i>smRS-GFP</i> -Sonde/ <i>HindIII</i>)	90
Abbildung 3.31: Autoradiogramm zum Nachweis der Integration des <i>smRS-GFP</i> -Gens in die genomische DNA putativ transgenen <i>Petunia</i> 'Famous Electric Purple' (pMen65smRS-GFP in ABI) mittels Southern Hybridisierung (<i>smRS-GFP</i> -Sonde/ <i>HindIII</i>)	92
Abbildung 3.32: GFP-Expression von <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Electric Purple' (T12) (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) mit drei Kopien von <i>smRS-GFP</i> (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht).....	94
Abbildung 3.33: GFP-Expression von <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Electric Purple' (T6) (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) mit einer Kopie von <i>smRS-GFP</i> (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht).....	95
Abbildung 3.34: GFP-Expression einer Pflanze von <i>Petunia</i> Genotyp 'Famous Electric Purple' (T1) (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) für die im Southern Hybridisierungen keine Integration des <i>smRS-GFP</i> (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht) nachweisbar war	95
Abbildung 3.35: Phänotypischer Vergleich transgener Pflanzen (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) mit unterschiedlicher Kopienzahl des <i>smRS-GFP</i> (A: eine Kopie, T6; B: drei Kopien, T12) und der Kontrollpflanze <i>Petunia Cultivars</i> 'Famous Electric Purple' (C).....	96

Abbildung 3.36: Transformiertes Petunien-Explantat 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) ohne Kanamycinselektion zehn Tage nach Kokultur (Durchlichtaufnahme (A), Fluoreszenzaufnahme (B))	97
Abbildung 3.37: SmRS-GFP-Expression eines regenerierten <i>Petunia</i> 'Famous Lilac Dark Vein' Sprosses drei Wochen nach Kokultur (pMen65smRS-GFP in ABI) ohne Kanamycinselektion (Durchlicht (A); Fluoreszenzaufnahme (B))	98
Abbildung 3.38: SmRS-GFP-Expression eines <i>Petunia</i> Sprosses ('Famous Electric Purple', transformiert mit pMen65smRS-GFP in ABI) ohne Kanamycinselektion (Durchlicht (A); Fluoreszenzaufnahmen (B))	98
Abbildung 3.39: GFP-Expression einer Pflanze von <i>Petunia</i> Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' (T33; pMen65smRS-GFP in ABI) für die im Southern Hybridisierungen eine Kopie des smRS-GFP nachweisbar war (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht)	99
Abbildung 3.40: GFP-Expression alleinig in Seitenknospen von <i>Petunia</i> Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' (T26) transformiert mit pMen65smRS-GFP in ABI für die in Southern Hybridisierung vier Kopien von <i>smRS-GFP</i> nachgewiesen war (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht)	99
Abbildung 3.41: Phänotypischer Vergleich transgener <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) mit einer Kopie des <i>smRS-GFP</i> (A: T33; B: T22)	100
Abbildung 3.42: Phänotypischer Vergleich transgener <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' mit zwei Kopien des <i>smRS-GFP</i> (A: T30; B: T19) hervorgegangen aus Transformationsversuchen mit dem Vektor pMen65smRS-GFP in ABI	100
Abbildung 3.43: Nicht transgene Kontrollpflanze <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein'	101
Abbildung 3.44: OneStep RT-PCR Amplifikation des <i>smRS-GFP</i> -Gens mit dem Primerpaar GFP neu bei putativ transgenen <i>Petunia</i> Cultivars	102
Abbildung 3.45: OneStep RT-PCR-Amplifikation mit dem 18S-Primer bei putativ transgenen <i>Petunia</i> Cultivars	102
Abbildung 3.46: Wirkung von Phosphinothricin (PPT) auf die Sprossregeneration bei <i>Pelargonium zonale</i> Cultivars nach drei Wochen	104
Abbildung 3.47: Effekt steigender Phosphinothricin (PPT) Konzentrationen auf die Regeneration nicht-transformierter Blatexplantate von <i>Pelargonium zonale</i> 'Katinka' (A) und 'Sailing' (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen	104
Abbildung 3.48: Ermittlung einer geeigneten Selektionsschwelle für Kanamycin bei <i>Pelargonium zonale</i> Genotyp 'Katinka' (A) und <i>Pelargonium peltatum</i> Genotyp 'Royal Blue' (B) auf nicht-transformierte Blatexplantate in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen	105
Abbildung 3.49: Transformationsraten (%) mit und ohne Selektion auf Kanamycin bei Verwendung von Blatt- oder Stielexplantaten von <i>Pelargonium</i> (pMen65smR-GFP im <i>Agrobacterium</i> -Stamm ABI)	107
Abbildung 3.50: SmRS-GFP-Expression eines regenerierten Sprosses von <i>Pelargonium zonale</i> 'Sailing' (pMen65smRS-GFP in ABI) drei Wochen nach Kokultur ohne Kanamycin-Selektion unter Verwendung von Stielexplantaten (Durchlicht (A); Fluoreszenzlicht (B))	112
Abbildung 3.51: SmRS-GFP-Expression eines regenerierten Sprosses von der <i>Pelargonium peltatum</i> 'Royal Blue' (pMen65smRS-GFP in ABI) drei Wochen nach Kokultur mit Kanamycin-Selektion unter Verwendung von Blatexplantaten (Durchlicht: links; Fluoreszenzlicht: rechts)	112
Abbildung 3.52: DNA-Ausbeute bei <i>Pelargonium zonale</i> 'Katinka' unter Verwendung der Extraktionsmethode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) bei Variation von Reaktionsgefäßen, Aufbereitungsart und Ausgangsmaterial	114

Abbildung 3.53: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) auf die Sprossregeneration von nicht-transformierten <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) nach drei Wochen	116
Abbildung 3.54: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) appliziert zehn Tage nach in Kulturnahme und Entfernung neugebildeter Sprosse auf die Sprossregeneration von meristematischen Clustern bei <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) nach drei Wochen.....	117
Abbildung 3.55: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) appliziert zehn Tage nach in Kulturnahme und Entfernung neugebildeter Sprosse auf die Sprossregeneration von nicht-transformierten meristematischen Clustern bei <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) `CP Red` (A) und `CP White` (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen.....	118
Abbildung 3.56: Effekt mit und ohne Selektion von Phosphinothricin (PPT) appliziert zehn Tage nach Entfernung neu gebildeteter Sprosse auf die Sprossregeneration von transformierten (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) meristematischen Cluster bei <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) `CP Red` (A) und `CP White` (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen	119
Abbildung 3.57: Zeitreihe der Selektionsabfolge für Transformationen von <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.)	120
Abbildung 3.58: Prozentuale Anzahl Explantate mit GUS-Färbung (pIBGUS in LBA4404/EHA101) in Abhängigkeit vom <i>A. tumefaciens</i> -Stamm bei <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.), ermittelt im histochemischen GUS-Assay	120
Abbildung 3.59: GUS-Expression drei Wochen nach Transformation (pIBGUS in LBA4404) bei <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) `CP White` (A, D, E), `CP Red` (B, F) und `CP Violet` (C)	121
Abbildung 3.60: Wirkung der Kanamycin-Selektion (100 mg/L) auf die Sprossregeneration in Transformationsversuchen mit meristematischen Clustern (pMen65smRS-GFP in ABI) von <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) `CP White` nach drei Wochen	122
Abbildung 3.61: Effekt von Kanamycin, appliziert zehn Tage nach in Kulturnahme und Entfernung von neu gebildeten Sprossen auf die Sprossbildung von transformierten (pMen65smRS-GFP) meristematischen Clustern bei <i>Impatiens</i> Cultivars (Neuguinea Grp.) `CP White` in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete <i>Petunia</i> Sorten und deren Eigenschaften	5
Tabelle 2.2: Verwendete <i>Pelargonium</i> Sorten und deren Eigenschaften	6
Tabelle 2.3: Verwendete <i>Impatiens</i> Sorten und deren Eigenschaften	7
Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Makro- und Mikroelemente nach MURASHIGE UND SKOOG (1962).....	9
Tabelle 2.5: Verwendete Bakterienmedien	11
Tabelle 2.6: Zusammensetzung SOB (Super Optimal Broth)-Medium	11
Tabelle 2.7: Zusammensetzung SOC-Medium	12
Tabelle 2.8: Verwendetes flüssiges, hormonfreies Medium für <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Pflanzentransformationen.....	12
Tabelle 2.9: Verwendete <i>A. tumefaciens</i> -Stämme und deren chromosomale Eigenschaften	13
Tabelle 2.10: Liste der verwendeten Transformationsvektoren	17
Tabelle 2.11: Verwendete Restriktionsenzyme.....	21
Tabelle 2.12: Verwendete DNA modifizierende Enzyme und Polymerasen	21
Tabelle 2.13: Primersequenzen zum Nachweis transgener Pflanzen	22
Tabelle 2.14: Zusammensetzung 1×TAE-Puffer:	24
Tabelle 2.15: Zusammensetzung OrangeG-Ladepuffer	24
Tabelle 2.16: Zusammensetzung des Infiltrationspuffers:	25
Tabelle 2.17: Ausgewählte <i>A. tumefaciens</i> -Stämme, deren chromosomaler Hintergrund und Opintyp (nach HELLENS ET AL. 2000b)	33
Tabelle 2.18: Verwendete <i>gfp</i> -Gene und Eigenschaften der verwendeten Filtersätze	36
Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Substratstamlösung 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronid (X-GlcA):.....	37
Tabelle 2. 20: Zusammensetzung NaPO ₄ -Puffer	37
Tabelle 2.21: Zusammensetzung der GUS-Färbelösung:.....	38
Tabelle 2.22: Beschreibung der Versuchsvarianten zur Optimierung der DNA-Extraktion nach DORORKHOV UND KLOCKE (1997).....	39
Tabelle 2.23: Zusammensetzung Extraktionspuffer CTAB:	41
Tabelle 2.24: Zusammensetzung CTAB-Fällungspuffer:	41

Tabelle 2.25: Zusammensetzung TE (high salt)-Puffer:	41
Tabelle 2.26: Zusammensetzung TE-Puffer:.....	41
Tabelle 2.27: Zusammensetzung Extraktionspuffer DOROKHOV UND KLOCKE (1997):.....	42
Tabelle 2.28: Standardreaktionsansatz für PCR.....	44
Tabelle 2.29: PCR-Amplifikationbedingungen.....	45
Tabelle 2.30: Zusammensetzung 10× Williams-Puffer (WILLIAMS ET AL. 1990).....	45
Tabelle 2.31: Standardreaktionsansatz für RT-PCR	46
Tabelle 2.32: OneStep RT-PCR-Amplifikationsbedingungen am Beispiel des Primers GFP neu.....	46
Tabelle 2.33: Zusammensetzung Bromphenolblau-Ladepuffer	47
Tabelle 2.34: Zusammensetzung 20× SSC	47
Tabelle 2.35: Reaktionsansatz DIG-Markierung DNA	48
Tabelle 2.36: PCR-Bedingungen für die Herstellung von DIG-markierten Sonden	48
Tabelle 3.1: Transformationsraten in Abhängigkeit vom <i>A. tumefaciens</i> -Stamm und verwendeten Vektor bei <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein'	71
Tabelle 3.2: Vergleich der Transformationsraten [%] bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion bei <i>Petunia</i> Genotyp 'Famous Electric Purple' (pMen65smRS-GFP in ABI).....	77
Tabelle 3.3: Vergleich der Transformationsraten [%] bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion bei <i>Petunia</i> Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI).....	77
Tabelle 3.4: Vergleich der Transformationsraten [%] bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion bei <i>Petunia</i> Genotyp 'Famous Violet Dark Eye' (pMen65smRS-GFP in ABI)	78
Tabelle 3.5: Vergleich der Transformationsraten [%] bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion bei <i>Petunia</i> Genotyp 'Famous Cerise Pearl' (pMen65smRS-GFP in ABI)	78
Tabelle 3.6: Zusammensetzung der Extraktionspuffer aus drei unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden ..	80
Tabelle 3.7: Beschreibung der Versuchsvarianten zur Optimierung der DNA-Extraktion nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997).....	82
Tabelle 3.8: Zeit- und Kostenvergleich von drei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden	83
Tabelle 3.9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Southern Hybridisierung der PCR positiven <i>Petunia</i> 'Famous Electric Purple' (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105).....	88
Tabelle 3.10: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Southern Hybridisierung auf die Integration von <i>smRS-GFP</i> der PCR positiven <i>Petunia</i> 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI).....	90
Tabelle 3.11: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Southern Hybridisierung bezüglich der Integration von <i>smRS-GFP</i> der PCR positiven <i>Petunia</i> 'Famous Electric Purple' (pMen65smRS-GFP in ABI).....	93
Tabelle 3.12: Vergleich der Transformationsraten [%] mit und ohne Selektion auf Kanamycin bei <i>Pelargonium zonale</i> Genotyp 'Sailing' (pMen65smRS-GFP in ABI)	109

Tabelle 3.13: Vergleich der Transformationsraten [%] mit und ohne Selektion auf Kanamycin bei <i>Pelargonium zonale</i> Genotyp 'Katinka' (pMen65smRS-GFP in ABI).....	109
Tabelle 3.14: Vergleich der Transformationsraten [%] mit und ohne Selektion auf Kanamycin bei <i>Pelargonium peltatum</i> Genotyp 'Royal Blue' (pMen65smRS-GFP in ABI).....	110
Tabelle 3.15: Beschreibung der Versuchsvarianten zur Optimierung der DNA-Extraktion nach DORORKHOV UND KLOCKE (1997) bei <i>Pelargonium</i>	113

Formelverzeichnis

Formel 1: Transformationsrate (%).....	27
Formel 2: Mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendes Explantat.....	36
Formel 3: Sprossregenerationsrate (%).....	36

Anhangsverzeichnis

Abbildung A1: Plasmidkarte des binären Vektors pGreenII0229smRS-GFP.....	167
Abbildung A2: Wirkung von Phosphinothricin (PPT) auf die Sprossregeneration nach drei Wochen bei vier <i>Petunia</i> Genotypen.....	169
Abbildung A3: Effekt von Phosphinothricin (3 mg/L) und verschiedenen <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen nach Übernachtkultur auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierenden Explantat von <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Electric Purple' nach drei Wochen (Versuch 1).....	171
Abbildung A4: Effekt von verschiedenen <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen ohne Phosphinothricin-Selektion auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat von <i>Petunia</i> Cultivars 'Famous Electric Purple' nach drei Wochen (Versuch 3).....	172

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CDP	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.3,7]decan}-4-yl) phenyl phosphate
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbamit
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
EU	Europäische Union
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GVP	Gentechnisch veränderte Pflanze
H ₂ O _{dest.}	Destilliertes Wasser
Hg	Druckeinheit
IAA	Indol-3-Essigsäure
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
L	Liter
LB/RB	Linke/rechte Bordersequenz
LB-Medium	LURIA BERTANI-Medium
LM	Low Melting
M	Molar
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µL	Mikroliter
mL	Milliliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar

NAA	1-Naphtylelessigsäure
nm	Nanometer
NOS	Nopalin synthase Promotor/Terminator
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPT	Phosphinothricin
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumsalz-Citrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer-Desoxyribonukleinsäure
TE	Tris-EDTA
Ti-Plasmid	Tumor induzierendes-Plasmid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (Units)
ÜNK	Übernachtkultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultra violettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Volumen (volume per volume)
VT	Volumenteil
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (weight per volume)
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-GlcA	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronid

1. Einleitung

Beet- und Balkonpflanzen stellen zurzeit unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten eines der attraktivsten Segmente des Zierpflanzenbaus dar. Nach Berechnungen der Zentralen Markt- und Preisberichtsstelle GmbH (ZMP) und der Centralen Marketing-Gesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH (CMA) belief sich 2005 der Markt für Beet- und Balkonpflanzen auf rund 1,91 Milliarden Euro in der Bundesrepublik Deutschland. Dies entsprach etwa 22 % der gesamten Ausgaben für Schnittblumen, Topfpflanzen und Gehölze (ZMP-/CMA 2007). Die in dieser Arbeit verwendeten Zierpflanzen *Petunia* Cultivars, *Pelargonium peltatum* Cultivars, *Pelargonium zonale* Cultivars und *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) gehören zu den „Top Ten“-Pflanzen im Marktsegment Beet- und Balkonpflanzen. *Pelargonium zonale* Cultivars stehen an Platz eins, *Pelargonium peltatum* Cultivars an Platz zwei, Petunien an Platz drei und *Impatiens* an Platz vier in diesem Marktsegment (LANDGARD, 2005).

Die Entwicklung neuer Sorten erfolgt vorwiegend durch konventionelle Züchtungsarbeit. Durch die pflanzliche In-vitro-Kultur und die Entwicklung der pflanzlichen Gentechnik eröffneten sich neue Perspektiven in der Pflanzenzüchtung. Züchtungstechniken konnten hierdurch erweitert werden und die Bearbeitung bislang schwer zu erreichender Zuchtziele möglich gemacht werden. Mit der Gentechnik konnten erstmals erwünschte Eigenschaften durch gezielte Übertragung einzelner Gene auf die Pflanze erzeugt werden. Die wichtigste Entdeckung der pflanzlichen Gentechnik in den 80er Jahren war die Möglichkeit Pflanzen gentechnisch zu verändern. Pflanzentransformation basiert auf der Übertragung, Integration und Expression von Fremd-DNA in Pflanzen. Voraussetzung hierfür sind geeignete Transformationssysteme zur Übertragung der DNA, Selektionssysteme zur Identifizierung und effektive Regenerationssysteme für transformierte Zellen. Pflanzentransformation mit Hilfe des Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* ist die verbreitetste Methode des Gentransfers in Pflanzenzellen. Die Art *Agrobacterium tumefaciens* besitzt die Fähigkeit, einen Teil ihrer DNA (Transfer-DNA) ins pflanzliche Genom zu integrieren und dadurch die Ausprägung eines Tumors zu bewirken (CHILTON ET AL. 1977). Die zu übertragende DNA befindet sich auf einem speziellen Tumor induzierenden Plasmid (Ti - Plasmid bei *A. tumefaciens*), das für die Infektiosität verantwortlich ist. Das Ti- Plasmid beinhaltet die Transfer- oder *tra*-Gene, Virulenz- oder *vir*-Gene (beide sind notwendig für den

DNA-Transfer in die Pflanzenzelle), Gene für den Opinkatabolismus (notwendig für den Abbau von Opinen durch das Bakterium) und die T-DNA (Transfer-DNA). Die gesamte T-DNA befindet sich zwischen je 25 Basenpaaren großen Sequenzwiederholungen, die sie links und rechts begrenzen (rechte und linke Bordersequenz) (ZAMBRYSKI 1988). In nicht modifizierten *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen enthält die T-DNA Gene, die für Tumorgenese (*onc*-Gene, notwendig für die Tumorinduktion in der Pflanzenzelle), sowie für die Opinsynthese verantwortlich sind (*ops*-Gene, notwendig für die Synthese der Opine durch die Pflanzenzelle) (HELLENS ET AL. 2000b). Chemisch gesehen können Opine in zwei Klassen gruppiert werden: Agrocinopine (Zucker-Phosphodiester) und sekundäre Aminosäurederivate, zu denen z. B. Octopin und Nopalin gehören (MOORE ET AL., 1997). Grundsätzlich induziert das Bakterium die Synthese eines Opins, das es katabolisieren und als einzige Energie-, Kohlenstoff- und/oder Stickstoff-Quelle nutzen kann (OLD UND PRIMROSE 1992).

Die T-DNA wird in das Pflanzengenom integriert, und der Prozess der Tumorbildung ist danach unabhängig von der Anwesenheit des Bakteriums. Abgesehen von den sie begrenzenden Gensequenzen können alle Gene innerhalb der T-DNA durch definierte Zielgene ersetzt werden. Solche Ti-Plasmide und ihre *A. tumefaciens*-Stämme sind nicht mehr onkogen, und werden als entwaffnet bezeichnet (HELLENS ET AL. 2000b). Für die Infektion von Pflanzen durch *Agrobacterium tumefaciens* sind Verbindungen wie Acetosyringon und andere Zellwandphenole von Bedeutung, die bei Verwundung von Pflanzen ausgeschieden werden. Diese phenolischen Verbindungen werden von dem chemotaktisch aktiven *Agrobacterium* erkannt (LOAKE ET AL. 1988) und führen zur Expression der *vir*-Gene.

Für einen erfolgreichen Gentransfer in Pflanzen werden Systeme zur Selektion und Identifikation der transformierten Zelle benötigt (Selektionsmarker). Selektionsmarkersysteme können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Negative Selektionssysteme, die in der Regel auf Antibiotika- oder Herbizidresistenz beruhen, und positive Selektionssysteme, die sich unter anderem aus dem pflanzlichen Zuckerstoffwechsel oder auch Hormonhaushalt ableiten lassen. Das Prinzip positiver Selektionsmarker basiert auf der Expression von Proteinen, die einen Vorteil beim Wachstum unter definierten Bedingungen mit sich bringen (meist unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors). Die Isopentenyl Transferase katalysiert den ersten Schritt in der Cytokininbiosynthese, was transgenen Zellen auf cytokininfreiem Medium die Sprossregeneration erlaubt (EBINUMA ET AL. 1997). Die Xylose Isomerase ermöglicht

transformierten Zellen die Verwendung von D-Xylose als Kohlenstoffquelle, nicht transformierte Zellen besitzen diese Fähigkeit nicht und können auf dem Substrat nicht regenerieren (HALDRUP ET AL. 1998).

Eine weitere Kategorie stellen visuelle Marker dar. Sie unterscheiden anhand visueller Genexpression transgenes von nicht transgenem Gewebe (WINK 2004). Diese visuellen Marker lassen sich durch deren Genprodukt nachweisen. Beta-Glucuronidase und Luciferase sind Enzyme, die durch Umsetzung eines spezifischen Substrats (Glucuronid bzw. Luciferin) und Detektion des Katalyseprodukts oder von Photonen im Fall von Luciferase nachgewiesen werden können (KEMPKEN UND KEMPKEN 2004).

Ein anderer visueller Marker ist das *gfp* (Green Fluorescent Protein)-Gen aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria*, erstmals beschrieben von PRASHER ET AL. (1992). GFP kodiert für ein Protein, das bei Anregung durch UV-Licht oder Blaulicht eine Fluoreszenz emittiert. Anwendung fand dieses Reportergen bisher in Transformationen, bei der Beobachtung von Virusausbreitung oder als Marker für Proteinlokalisierungen und Transport (HARPER ET AL. 1999; HALFHILL ET AL. 2001, MIKI UND MC HUGH, 2004). GFP benötigt kein Substrat wie vergleichbare Reportergene und ist zerstörungsfrei nachweisbar. Diese Eigenschaften machen *gfp* zu einem idealen Marker für Transformationsereignisse, da es eine kontinuierliche Beobachtung zu jedem Zeitpunkt der Kultur erlaubt.

Der Einsatz von pflanzlicher Biotechnologie ist von großer Bedeutung, wenn ein Qualitätsmerkmal einer Zierpflanze durch konventionelle Kreuzungszüchtung nicht oder sehr zeitaufwendig realisiert werden kann. Beispiele, die im Bereich Zierpflanzen von besonderem Interesse sind, sind unter anderen Stresstoleranzen gegen abiotische Faktoren wie Kälte oder Trockenheit, generelle Krankheitsresistenzen und neue Blütenfarben.

Die Zahl zugelassener gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) ist nach wie vor sehr überschaubar. Im Zierpflanzenbau ist bisher nur eine transgene Nelke mit längerer Haltbarkeit und zwei blau blühende Nelken (ein natürlich nicht auftretender Farbton) für den Markt zugelassen. Die transgenen Nelken (*Moon*-Serie) werden durch die Firma Florigene und einige Händler in Australien, USA und Kanada vertrieben.

In den letzten Jahren wurden verstärkt experimentelle Untersuchungen in Bezug auf die Eliminierung verfügbarer Marker-Gene nach Identifizierung der GVP entwickelt. Hierbei konnte die Erweiterungen der verfügbaren Marker-Gene über den Bereich der Antibiotika-Resistenzgene hinaus bzw. deren Vermeidung beobachtet werden.

Besonders verstärkt wurde dies durch den Erlass der EU-Richtlinie 2001/18/EG (EU-RICHTLINIE 2001/18/EG), die darauf abzielt, den Gebrauch von Antibiotika-Resistenzgenen mit möglichen schädlichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und Umwelt auszuschließen. Obwohl keine wissenschaftliche Grundlage für diese Bedenken ermittelt werden konnte, würde die Erzielung markerfreier, transgener Pflanzen zweifellos zu einer höheren Verbraucherakzeptanz führen (DE VETTEN ET AL. 2003).

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Methoden für eine effiziente Produktion, Detektion und weitere Analyse von gentechnisch veränderten Zierpflanzen im Segment Beet- und Balkonpflanzen mit verbesserter Verbraucherakzeptanz. Ausgewählt wurden dazu *Petunia* Cultivars, *Pelargonium* und *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) aufgrund ihrer unterschiedlichen In-vitro-Regenerationsfähigkeit. Die Steigerung der Effizienz bestehender Transformationssysteme stand an erster Stelle. Weiterhin sollten alternative Strategien für die Selektion der transgenen Pflanzen entwickelt werden, die den Verzicht auf umstrittene Antibiotika- oder Herbizidresistenzen als Selektionsmarker ermöglichen. Dazu wurden transgene Zellen und Sprosse alleinig mittels des visuellen Markers *gfp* während der Regeneration selektiert und anschließend mit Hilfe von PCR (Polymerase Kettenreaktion)-gestützten Verfahren analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* etablierte Sprosskulturen der Firma Selecta Klemm GmbH & Co. KG von *Petunia* Cultivars (Juss.), *Pelargonium peltatum* Cultivars, *Pelargonium zonale* Cultivars und *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) (L.) verwendet.

Petunia Cultivars

Bei *Petunia* Cultivars handelte es sich um vier Genotypen der Serie 'Famous™' mit den in Tabelle 2.1 aufgelisteten Sorten und Eigenschaften (siehe auch Abbildung 2.1 und 2.2). Im Folgenden wird die Bezeichnung *Petunia* Genotypen anstelle von *Petunia* Cultivars weiter verwendet.

Tabelle 2.1: Verwendete *Petunia* Sorten und deren Eigenschaften

Sorte	Blüte	Blütezeit	Wuchs
'Famous™ Electric Purple'	violett	sehr früh	kompakt
'Famous™ Lilac Dark Vein'	lila, dunkelviolettblau geädert	früh	mittelstark
'Famous™ Violet Dark Eye'	helllila, dunkler Schlund	sehr früh	kompakt
'Famous™ Cerise Pearl'	kirschrot, gelbe Mitte	früh	mittelstark



Abbildung 2.1: Verwendete *Petunia* Genotypen 'Famous Electric Purple' (A), 'Famous Lilac Dark Vein' (B)



Abbildung 2.2: Verwendete *Petunia* Genotypen 'Famous Violet Dark Eye' (A), 'Famous Cerise Pearl' (B)

Pelargonium

Bei den verwendeten *Pelargonium* handelte es sich um zwei *Pelargonium zonale* Cultivars und eine *Pelargonium peltatum* Cultivars, deren Sortenbezeichnung und Sorteneigenschaften aus Tabelle 2.2 und Abbildung 2.3 und 2.4 hervorgehen.

Tabelle 2.2: Verwendete *Pelargonium* Sorten und deren Eigenschaften

Sorte	Blüte	Laub	Blütezeit	Wuchs
<i>Pelargonium peltatum</i> Cultivars				
'Royal™ Blue'	purpurviolett	gefüllt mittelgrün, leicht zorniert	früh	mittelstark
<i>Pelargonium zonale</i> Cultivars				
'Katinka'	fliederfarben, purpur Auge, halbgefüllt	mittelgrün	früh	mittelstark
'Sailing'	weiß, halbgefüllt	dunkelgrün	mittelfrüh	mittelstark



Abbildung 2.3: Verwendete *Pelargonium peltatum* Cultivars 'Royal Blue'

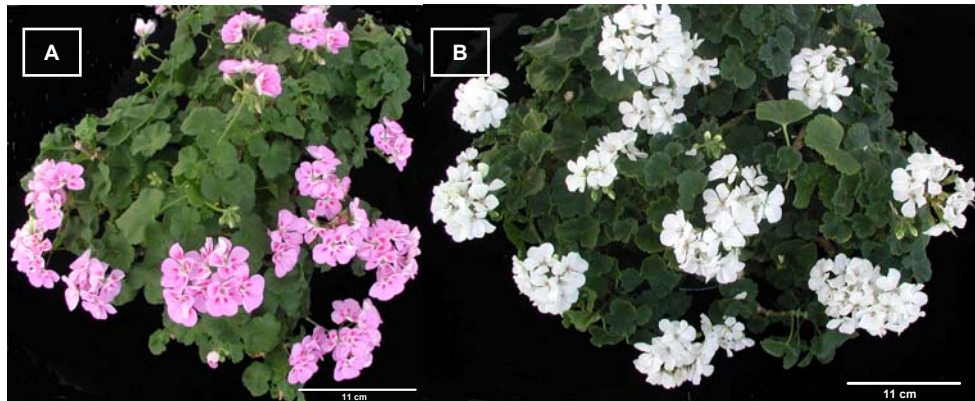


Abbildung 2.4: Verwendete *Pelargonium zonale* Cultivars 'Katinka' (A) und 'Sailing' (B)

Impatiens Cultivars (Neuguinea Grp.)

Bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) wurden Genotypen der Serie ColorPower[®] (CP), 'CP Red', 'CP Violet', 'CP White' der Firma Selecta Klemm GmbH & Co. KG verwendet (siehe Tabelle 2.3 und Abb. 2.5).

Tabelle 2.3: Verwendete *Impatiens* Sorten und deren Eigenschaften

Sorte	Blüte	Laub	Blütezeit	Wuchs
'CP Red'	rot	mittelgrün	sehr früh	mittelstark
'CP Violet'	violett	mittelgrün	früh	mittelstark
'CP White'	weiß	mittelgrün	früh	mittelstark



Abbildung 2.5: Verwendete *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.): 'CP Red' (A), 'CP Violet' (B), 'CP White' (C)

2.2 Erhaltung und Kultur *in vitro*

Die Kultur der bereits etablierten In-vitro-Sprosskulturen erfolgte bei einer Temperatur von 24 ± 1 °C, einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden und einer Beleuchtungsstärke von 32 bis 48 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Sprosse wurden in 150 mL Gläsern mit Twist-Off-Deckeln, in denen Filterpapier im Deckel eingelegt war, mit 25 mL des jeweiligen Sprosskulturmediums vier bis sechs Wochen kultiviert.

Blattexplantate wurden auf Regenerationsmedium in 6 cm Plastikpetrischalen (ca. 10 mL Medium pro 6 cm Petrischale) unter gleichen Bedingungen wie die Sprosskulturen kultiviert.

2.3 Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien

2.3.1 Nährmedien für die pflanzliche In-vitro-Kultur

Die verwendeten Nährmedien basieren auf den Angaben für die Makro- und Mikronährstoffe (siehe Tabelle 2.4) von MURASHIGE UND SKOOG (1962) (MS-Medium) und wurden je nach Pflanzenart modifiziert.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Makro- und Mikroelemente nach MURASHIGE UND SKOOG (1962)

Substanz	Konzentration [mg/L]	Molarität
Makroelemente (MS)		[mM]
NH ₄ NO ₃	1650	41,2
KNO ₃	1900	18,8
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	440	3,00
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370	1,50
KH ₂ PO ₄	170	1,25
Mikroelemente (MS)		[µM]
H ₃ BO ₃	6,20	100,27
MnSO ₄ × 1 H ₂ O	16,90	100,00
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,6	29,91
KJ	0,83	5,00
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,25	1,03
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,025	0,11
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025	0,10

Petunia Cultivars

Das Sprosskultur- und Regenerationsmedium für *Petunia* bestand aus den Makro- und Mikroelementen nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) zusätzlich mit 36,71 mg/L FeNaEDTA, 100 mg/L Myo-Inositol, 2 mg/L Glycin, 0,5 mg/L Nikotinsäure, 0,5 mg/L Pyridoxin HCl, 0,1 mg/L Thiamin HCl, 20 g/L Saccharose und 8,8 g/L Plant Agar (Duchefa, Niederlande). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren (Systec V-150; 210 kPa, 121 °C, 20 min) auf pH 5,7 eingestellt. Dem Regenerationsmedium wurden folgende pflanzliche Wachstumsregulatoren zugegeben: 1 mg/L (4,44 µM) BAP und 0,2 mg/L (1,07 µM) NAA.

Pelargonium

Das Regenerationsmedium für *Pelargonium* basierte auf den Makro- und Mikroelementen nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) mit Änderungen: Nach REUTHER (1983) wurden für *Pelargonium zonale* Cultivars und *Pelargonium peltatum* Cultivars im Regenerationsmedium verschiedene Makroelemente modifiziert. Für *Pelargonium zonale* resultierte dies in einer erhöhten Gabe von 2470 mg/L KNO₃ und 255 mg/L KH₂PO₄. Das Regenerationsmedium für *Pelargonium peltatum* Cultivars beinhaltete die halbe Konzentration an MS-Makroelementen, aber 1235 mg/L KNO₃ und 127,5 mg/L KH₂PO₄. Weitere Bestandteile waren 36,71 mg/L FeNaEDTA, 100 mg/L Myo-Inositol, 2 mg/L Glycin, 0,5 mg/L Nikotinsäure, 0,5 mg/L Pyridoxin HCl, 0,1 mg/L Thiamin HCl, 30 g/L Saccharose und 8,8 g/L Plant Agar (Duchefa, Niederlande). Dem Regenerationsmedium für *Pelargonium* wurden 2 mg/L (9,12 µM) Zeatin hinzugegeben, die Auxinkonzentration betrug bei *Pelargonium zonale* 0,5 mg/L (2,46 µM) IAA und *Pelargonium peltatum* Cultivars 0,1 mg/L (0,49 µM) IAA. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 5,8 eingestellt.

Das Sprosskulturmedium basierte auf MURASHIGE UND SKOOG (1962) mit der halben Konzentration von Makro- und Mikroelementen, 36,71 mg/L FeNaEDTA, 100 mg/L Myo-Inositol, 2 mg/L Glycin, 0,5 mg/L Nikotinsäure, 0,5 mg/L Pyridoxin HCl, 0,1 mg/L Thiamin HCl, 30 g/L Saccharose, einer Gabe an pflanzlichen Wachstumsregulatoren von 0,05 mg/L (0,25 µM) IAA und 8,8 g/L Plant Agar (Duchefa, Niederlande). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren (Systec-V150) auf 5,8 eingestellt.

Impatiens Cultivars (Neuguinea Grp.)

Das Regenerationsmedium beinhaltete Makroelemente mit der halben Konzentration sowie den Gehalt an Mikroelementen mit voller Konzentration nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) und 36,71 mg/L FeNaEDTA. Organische Substanzen und Vitamine wurden nach GAMBORG ET AL. (1968) hinzugefügt: 100 mg/L Myo-Inositol, 1 mg/L Nikotinsäure, 1 mg/L Pyridoxin HCl, 10 mg/L Thiamin HCl, 30 g/L Saccharose und 8,8 g/L Plant Agar (Duchefa, Niederlande). Das Regenerationsmedium enthielt 2 mg/L (9,12 µM) Zeatin und 0,5 mg/L (2,69 µM) NAA. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 5,8 eingestellt.

Das Sprosskulturmedium für *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) basierte auf den Makro- und Mikroelementen nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) mit 36,71 mg/L

FeNaEDTA, 100 mg/L Myo-Inositol, 2 mg/L Glycin, 0,5 mg/L Nikotinsäure, 0,5 mg/L Pyridoxin HCl, 0,1 mg/L Thiamin HCl, 30 g/L Saccharose und 3 g/L Gelrite™ (Duchefa, Niederlande). Die Cytokininkonzentration im Medium betrug 0,5 mg/L (2,28 µM) Zeatin und der Auxingehalt 0,025 mg/L (0,13 µM) NAA. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 5,8 eingestellt.

2.3.2 Nährmedien für die Bakterienkultur

Für die Anzucht und Transformation von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* kam es zur Verwendung der in Tabelle 2.5, 2.6 und 2.7 aufgeführten Bakterienmedien.

Tabelle 2.5: Verwendete Bakterienmedien

LB (Luria Bertani)-Festmedium (modifiziert nach SAMBROOK ET AL. 1989)
15 g Select-Agar
10 g Select Peptone 140
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
Auffüllen mit H ₂ O _{dest.} auf 1000 mL und auf pH-Wert 7,5 einstellen, autoklavieren
LB-Flüssigmedium
10 g Select Peptone 140
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
Auffüllen mit H ₂ O _{dest.} auf 1000 mL und auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren
LB-Kanamycin-Medium
50 mg/mL Kanamycin
Zugabe 1 mL/L, ca. 50 °C warmen, autoklaviertem LB-Festmedium
LB-Spectinomycin-Medium
50 mg/mL Spectinomycin
Zugabe 1 mL/L, ca. 50 °C warmen, autoklaviertem LB-Festmedium

Tabelle 2.6: Zusammensetzung SOB (Super Optimal Broth)-Medium

SOB-Medium:
10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
mit H ₂ O dest. auf 1000 mL auffüllen
pH-Wert 6,0 – 7,0

Tabelle 2.7: Zusammensetzung SOC-Medium

SOC-Medium:
1 mL 2 M Glucose
1 mL 2 M MgCl ₂
mit SOB-Medium auf 100 mL auffüllen
pH-Wert 6,0 – 7,0

Für die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Pflanzentransformationen wurde das in Tabelle 2.8 aufgeführte flüssige, hormonfreie Medium zur Herstellung von Bakteriensuspension verwendet.

Tabelle 2.8: Verwendetes flüssiges, hormonfreies Medium für *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Pflanzentransformationen

Substanz	Konzentration [mg/L]	Molarität
Makroelemente (½ MS)		[mM]
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	220	1,50
KH ₂ PO ₄	85	0,63
KNO ₃	950	9,40
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	175	0,73
NH ₄ NO ₃	825	10,30
Mikroelemente (½ MS)		[µM]
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,0125	0,06
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0125	0,05
FeNaEDTA	36,70	50,00
H ₃ BO ₃	3,10	50,14
KJ	0,415	2,50
MnSO ₄ × 1 H ₂ O	8,45	50,00
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,125	0,52
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	4,30	14,96
MS-Vitamine		[µM]
Myo-Inositol	100,00	554,94
Nicotinsäure	1,00	8,12
Pyridoxin HCl	1,00	4,86
Thiamin HCl	10,00	29,65
	[g/L]	[mM]
Saccharose	30	58,42
Glucose	2	
pH-Wert	5,8	

2.4 Akklimatisierung und Kulturführung im Gewächshaus

Die Akklimatisierung der In-vitro-Sprosse an Ex-vitro-Bedingungen erfolgte nach der Bewurzelungsphase. Die Sprosse wurden von Agarresten befreit, in Einheitserde P (Einheitserdewerke) Substrat in einer Pikierkiste pikiert und mit 0,15 % Previcur[®]N (Syngenta Agro AG/Vertrieb Maag Agro) angegossen. Die Kultur erfolgte bei 24 °C Bodentemperatur und 22 ± 2 °C Lufttemperatur in einen Folientunnel bei hoher Luftfeuchte, die nach und nach durch Steigerung der Luftzufuhr reduziert wurde. Im späteren Verlauf der Gewächshauskultur wurden die Pflanzen in Einheitserde P in einen 12 cm-Rundtopf (Pöppelmann) getopft und bei 18 °C unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Düngung erfolgte bei jedem Gießen mit Plantaaktiv[®] Spezial (0,7 %; Günther Cornufera GmbH).

2.5 Bakterienstämme

2.5.1 *Escherichia coli*

Der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm DH5 α wurde für die Vermehrung der Plasmide pMen65, pGreenII0229 und pGreenII0029 verwendet.

2.5.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Für den *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)-vermittelten Gentransfer wurden die in Tabelle 2.9 aufgelisteten *A. tumefaciens*-Stämme verwendet.

Tabelle 2.9: Verwendete *A. tumefaciens*-Stämme und deren chromosomale Eigenschaften

<i>A. tumefaciens</i> -Stamm	Chromosomaler Hintergrund	Resistenz	Referenz
ABI	C58C1	Kanamycin	(KONCZ UND SCHELL, 1986)
EHA101	C58	Rifampicin	(HOOD ET AL., 1986)
EHA105	C58	Rifampicin	(HOOD ET AL., 1993)
GV2260	C58	Rifampicin	(MC BRIDE UND SUMMERFELT, 1990)
GV3101	C58	Rifampicin	(HOLSTERS ET AL., 1980)
LBA4404	TiAch5	Rifampicin	(HOEKEMA ET AL. 1983)

2.6 Kultivierung von Bakterien

2.6.1 Bakterienanzucht

E. coli wurde aus einer Bakteriendauerkultur (siehe 2.6.3) auf LB-Festmedien (25 ml Medium in 9 cm Petrischale) ausgestrichen und bei 37 °C bis zur Bildung von Bakterienkolonien inkubiert. Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte bei 28 °C. Das Selektionsagens bedingte das verwendete Plasmid oder die verwendeten Bakterien.

Einzelkolonien oder Bakteriendauerkulturen wurden in LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Selektionsagens angeimpft, *E. coli* bei 37 °C, 200 UpM (Schüttelinkubator: Edmund Bühler, SM-30 Control) und *A. tumefaciens* bei 28 °C und 250 UpM bis zu einer deutlichen Trübung der Suspension inkubiert (Schüttelinkubator: B. Braun Biotech International, Certomat[®]HK Certomat[®]R).

2.6.2 Bestimmung des Bakterientiters

Die optische Dichte (OD) diente als Maß zur Bestimmung des Bakterienwachstums. Die OD sämtlicher Bakterienkulturen wurde photometrisch an einem Bio Rad SmartSpec[™] 3000 Spektralphotometer bei 600 nm (OD₆₀₀) gegen das entsprechende Medium bestimmt.

2.6.3 Anlegen von Bakteriendauerkulturen

Für eine spätere Nutzung wurden Bakteriendauerkulturen angelegt, sowohl für *E. coli* als auch *A. tumefaciens*. Hierfür wurden 250 µL einer Übernachtskultur mit 375 µL 87 % (v/v) Glycerin versetzt und nach gründlicher Vermischung (Vortex) bei -20 °C oder -80 °C gelagert.

2.7 Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Transformation

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* und *A. tumefaciens* wurde eine von Dr. D. Rothenstein (mündliche Mitteilung) modifizierte Methode verwendet.

Hierfür wurden 250 mL LB-Flüssigmedium mit 200 µL einer frischen ÜN-Bakterienkultur animpft und bei 22 °C (opt. 18 °C), 250 UpM bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 inkubiert. Beim Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurde der

Kolben für 30 min auf Eis gestellt und anschließend die komplette Kultur in sterile GSA-Bechern (200 mL) geerntet und bei 4 °C für 15 min bei 3000 UpM (1469 × g) (Herolab, HiCen 21, A 6.14 Rotor) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Bakterienzellen zweimal mit 150 mL eiskaltem sterilen H₂O_{dest.} resuspendiert. Die entstandene Bakteriensuspension wurde erneut bei 4 °C für 15 min bei 3000 UpM (1469 × g) (Herolab, HiCen 21, A 6.14 Rotor) zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde erneut der Überstand verworfen und die Bakterienzellen in 10 mL sterilem 10 %igen Glycerin resuspendiert und in ein 50 mL Falconröhrchen überführt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 4000 UpM (2808 × g) für 10 min bei 4 °C (Herolab, HiCen 21, ASH 4.055 Rotor), der Überstand wurde hiernach verworfen. Die Bakterienzellen wurden in 2 mL sterilem 10 %igen Glycerin aufgenommen, in jeweils 40 µL Aliquots in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

Elektroporation

Diese Methode setzt voraus, dass sich die Bakterien in einem Medium mit geringer Anzahl an Ladungsträgern zum Zeitpunkt des elektrischen Pulses befinden. Bakterien werden hierfür elektrokompent gemacht, indem sie mehrfach in Glycerin gewaschen und darin resuspendiert werden.

Für die Elektroporation wurden 40 µL elektrokompente Bakterien (*E. coli* oder *A. tumefaciens*) auf Eis aufgetaut und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Bio Rad, Elektrodenabstand 0,2 cm) gegeben. Nach Zugabe von ca. 0,5 µg des entsprechenden Plasmids wurde die Elektroporation im MicroPulser™ (Bio Rad) durchgeführt. Für Transformationen von *E. coli* wurde das Programm Ec 1 (Spannung: 1.8 kV) und für Transformationen von *A. tumefaciens* das Programm Agr 1 (Spannung 2.2 kV) verwendet.

Nach sofortiger Zugabe von 1 mL SOC-Medium (Tabelle 2.7) wurden die Bakterien in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und schüttelnd inkubiert. *A. tumefaciens* wurde hierbei bei 28 °C für drei bis vier Stunden bei 250 UpM inkubiert und *E. coli* bei 37 °C, für eine Stunde bei 200 UpM (Inkubationsschüttler: B. Braun Biotech International Certomat®HK Certomat®R). Anschließend wurden 100-150 µL Aliquots auf entsprechende Selektionsmedien ausplattiert und bei entsprechender Temperatur inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar waren.

2.8 Eingesetzte Gene und Transformationsvektoren

Die zur Transformation eingesetzten Gene und Transformationsvektoren werden im Folgenden beschrieben.

2.8.1 Eingesetzte Gene

smRS-GFP

Das *smRS-GFP* (DAVIS UND VIERSTRA, 1998) wurde als selektives Reportergen eingesetzt und stand unter der Kontrolle eines Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S-Promotors. DAVIS UND VIERSTRA (1998) modifizierten die GFP-Mutation Y66H (REICHEL ET AL. 1996) mit einer S65T Mutation und nannten diese GFP-Version *smRS-GFP* (soluble, modified red-shifted Green Fluorescent Protein). *SmRS-GFP* angeregt mit Fluoreszenzlicht hat ein Anregungsmaximum von 495 nm und emittiert bei einem Maximum von 510 nm grünes Licht.

mGFP4

Das *mGFP4* (modified Green Fluorescent Protein), ist ein modifizierter Wildtyp GFP, in dem eine cryptische Spleißstelle durch eine stillgelegte Mutation modifiziert wurde (HASELOFF ET AL. 1997). Es besitzt ein Anregungsmaximum von 395 nm und eine maximale Emission bei 509 nm.

bar-Gen und *pat*-Gen

Das *bar*-Gen (THOMPSON ET AL. 1987) wurde im *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer mit dem Vektor pGreenII0229 und das *pat*-Gen bei Transformationen mit dem Vektor pIBGUS als selektives Markergen eingesetzt. Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* und das *pat*-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* vermitteln eine Resistenz gegenüber dem Glutamatsynthetase-Hemmer Bialaphos. Bialaphos oder seine synthetischen Analoga Phosphinothricin (PPT) oder auch Glufosinat sind Strukturanaloga zur Glutaminsäure. Phosphinothricin (= Glufosinat) ist das aktive Agens der Totalherbizide BASTA[®] und Liberty[®].

***nptII*-Gen**

Das Neomycin 3'-O-phosphotransferase II (*nptII*)-Gen kodiert für ein Aminoglykosid, welches eine Resistenz gegenüber Antibiotika wie Kanamycin, Neomycin, Paromomycin, Butirosin, Gentamycin B und Geneticin überträgt (FRALEY ET AL. 1983).

***uidA*-Gen**

Das *uidA*-Gen kodiert für das Enzym beta-Glucuronidase, welches erwünschte Eigenschaften zur Konstruktion und Analyse von Genfusionen aufweist (JEFFERSON 1987). Das Enzym β -Glucuronidase ist eine Hydrolase, die die Spaltung von verschiedenen β -Glucuroniden (STOEBER 1961) katalysiert.

Als Reportergen wurde das *uidA*-Gen zum Nachweis von Transformationsereignissen in transformierten Pflanzen unter Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors eingesetzt.

2.8.2 Transformationsvektoren

Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Transformationsvektoren zeigt Tabelle 2.10.

Tabelle 2.10: Liste der verwendeten Transformationsvektoren

Plasmid	Bakterielle Selektion auf	Beschreibung	Hersteller
pGreenII0000	nptI	Binärer Vektor	M. Smedley, John Innes Centre
pGreenII0000mGFP4	nptI	Binärer Vektor	Prof. Dr. T. Winkelmann
pGreenII0229	nptI	Binärer Vektor	M. Smedley, John Innes Centre
pGreenII0029smRS-GFP	nptI	Binärer Vektor	Prof. Dr. T. Winkelmann
pGreenII0229smRS-GFP	nptI	Binärer Vektor	V. Mußmann
pIBGUS	nptIII	Binärer Vektor	Prof. Dr. I. Broer
pMen65	Spc/Str	Transformationsvektor	aus: pMON316 (SANDERS ET AL. (1987); Mendel Biotechnology
pMen65GUS	Spc/Str	Transformationsvektor	Dr. D. Rothenstein
pMen65smRS-GFP	Spc/Str	Transformationsvektor	V. Mußmann
pSoup	-	Helfervektor	M. Smedley, John Innes Centre

Die Plasmidkarte des Vektors pGreenII0229smRS-GFP mit den jeweils relevanten Restriktionsschnittstellen befindet sich im Anhang 6 (Abb. A1). Die Plasmidkarten für pGreenII wurden mit dem Programm Vector NTI (Invitrogen Corporation) angefertigt.

pGreenII:

Es wurde das binäre Vektor pGreenII verwendet, welches eine modifizierte Version des pGreen-Vektors ist (HELLENS ET AL. 2000) und eine erhöhte Stabilität in *E. coli* besitzt. Dieser ist ein binärer Vektor mit einer Plasmidgröße von 3304 bp (siehe Abbildung 2.6) und einem Helferplasmid pSoup mit einer Plasmidgröße von 7829 bp. Das Vektorsystem wurde von M. Smedly (John Innes Centre, Norwich, Großbritannien) bezogen.

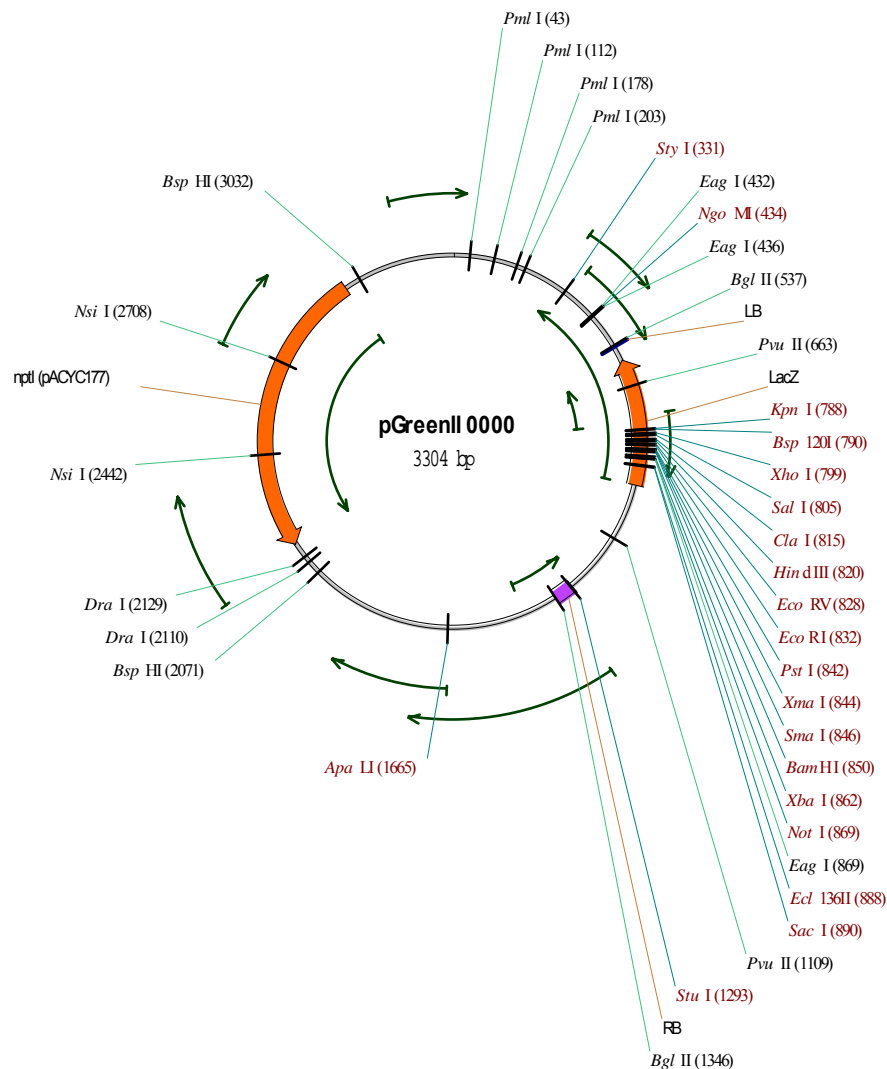


Abbildung 2.6: Plasmidkarte des binären Vektors pGreenII0000

LB/RB: linke/rechte Bordersequenz, *lacZ*: kodiert für das Enzym β -Galactosidase, *nptII*: Kanamycinresistenz, übrige Abkürzungen markieren Restriktionsschnittstellen (z. B. *BglII* (537)) sowie grüne Pfeile open reading frames (ORF)

pMen65:

Der Vektor pMen65 ist ein Derivat des Vektors pMon316 (SANDERS ET AL. 1987) mit einer Plasmidgröße von 8779 bp (siehe Abbildung 2.7) und wurde freundlicherweise von Mendel Biotechnology, Inc. zur Verfügung gestellt. Dieser Vektor beinhaltet innerhalb der T-DNA ein *nptII*-Gen für Kanamycinresistenz unter der Kontrolle eines NOS-Promotors und außerhalb der T-DNA verleiht *Spc/Str* (Spectinomycin/Streptomycin) eine Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin.

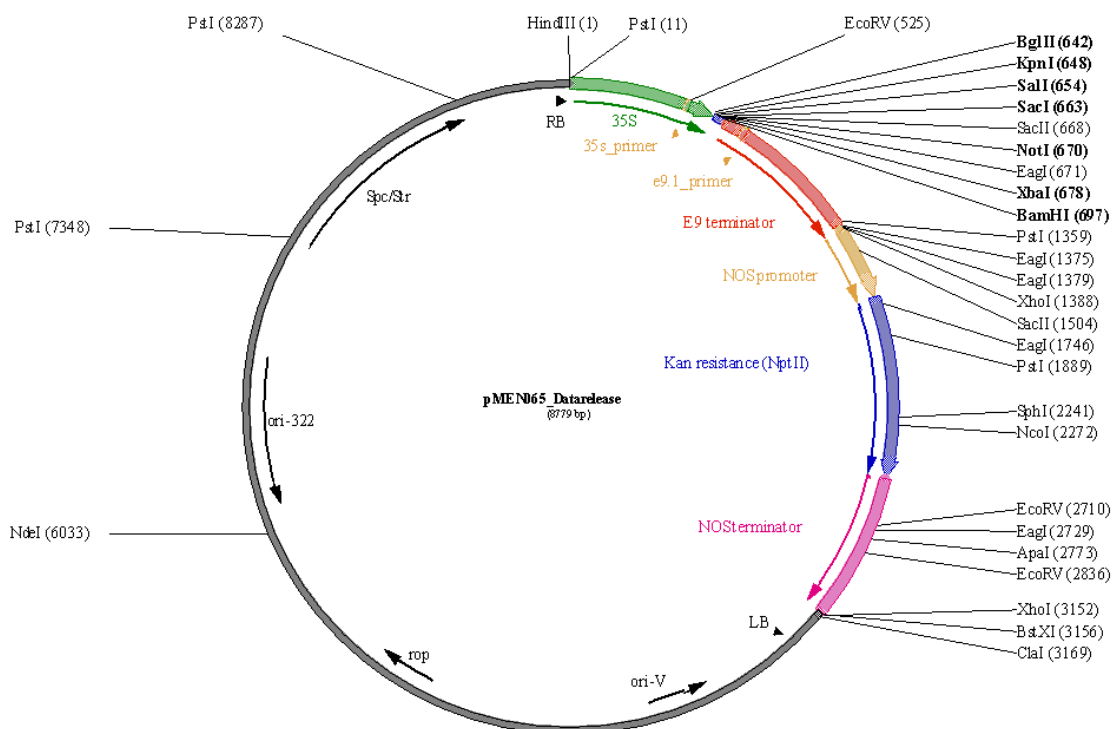


Abbildung 2.7: Plasmidkarte des Vektors pMen65

LB/RB: linke/rechte Bordersequenz, 35S: 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus, E9: Terminator aus der Untereinheit RUBP carboxylase, *nptII*: Neomycin Phosphotransferase Gen kodiert für Kanamycinresistenz, NOS: *Neomycin phosphotransferase II* Promotor/Terminator, Spc/Str: Streptomycin- und Spectinomycinresistenz, ori-V, ori-322: Origin of Replication, rop: *rop*-Gen, welches für das Rop-Protein kodiert, übrige Abkürzungen markieren Restriktionsschnittstellen (z. B. *BglII* (642))

pIBGUS

Der Vektor pIBGUS (DE KATHEN UND JACOBSEN 1990) wurde freundlicherweise von Prof. H.-J. Jacobsen (Leibniz Universität Hannover) zur Verfügung gestellt und stammte ursprünglich von Prof. Dr. I. Broer (Universität Rostock). Er basiert auf dem binären Vektor pBIN19 (BEVAN 1984) und trägt auf seiner T-DNA das *uidA*-Gen mit Intron, das *nptII*-Gen und das *pat*-Gen (siehe Abbildung 2.8). Das *pat*- und *uidA*-Gen stehen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, *nptII* unter der Kontrolle eines *nos*-Promotors. Außerhalb der T-DNA ist das *nptIII*-Gen lokalisiert, es stammt aus *Enterococcus faecalis* und codiert für Amino-glycosid-3'-Phosphotransferase III. Es verleiht Resistenz gegenüber Kanamycin, Neomycin und Amikavin. Bei Einsatz von pIBGUS wurde zur Selektion von transgenen Zellen Phosphinothricin verwendet. Der Vektor pIBGUS befand sich bereits in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen LBA4404 und EHA101. Die Plasmidgröße beträgt 15800 bp.

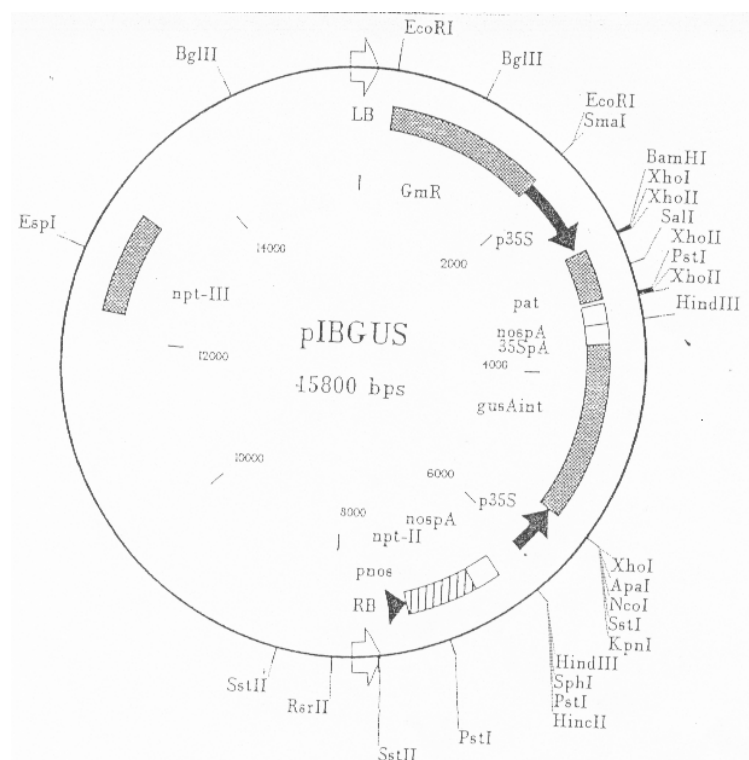


Abbildung 2.8: Plasmidkarte des binären Vektors pIBGUS

LB/RB: linke/rechte Bordersequenz, *GmR*: Gentamycinresistenz, p35S: 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus, *pat*: Phosphinothricinresistenz aus *Streptomyces viridochromogenes*, *nospA*: „polyadenylationsite“ des Nopalinsynthese-Promotors, 35SpA: polyadenylationsite des 35S-Promotors *gusAint*: β-Glucuronidase mit Intron, *pnos*: Nopalinsynthese-Promotor, übrige Abkürzungen markieren Restriktionsschnittstellen (z. B. *EcoRI*)

2.9 Enzyme

2.9.1 Restriktionsenzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind der Tabelle 2.11 zu entnehmen.

Tabelle 2.11: Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz (5'-3')	Hersteller	Konzentration
<i>Apa</i> I	G↓TGCAC	Fermentas	10 U/μl
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC	Fermentas	10 U/μl
<i>Cla</i> I	AT↓CGAT	Fermentas	10 U/μl
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	Fermentas	10 U/μl
<i>Eco</i> RV	GAT↓ATC	Fermentas	10 U/μl
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	Fermentas	10 U/μl
<i>Nco</i> I	C↓CATAGG	Fermentas	10 U/μl
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G	Fermentas	10 U/μl

2.9.2 DNA modifizierende Enzyme und Polymerasen

DNA modifizierende Enzyme und Polymerasen, die zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.12: Verwendete DNA modifizierende Enzyme und Polymerasen

Enzym	Hersteller	Konzentration
CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)	Fermentas	1 U/μL
Desoxyribonuclease I (DNase I; RNase frei)	Fermentas	1 U/μL
Ribonuclease A (RNase A; DNase frei)	AppliChem	10 mg/mL
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	Fermentas	40 U/μL
T4 DNA-Ligase	Fermentas	5 U/μL
<i>Taq</i> -Polymerase (rekombinant, keine erkennbare 3' - 5' Korrekturlesung)	Axon	5U/μL
<i>M-MLV</i> (Moloney-Murine-Leukemia-Virus) RT-Polymerase (H-) Point Mutant	Promega	200 U/μL
Hot Start- <i>Taq</i> -Polymerase	Axon	5 U/μL

2.10 Synthetische Oligonukleotide

Für die PCR-Analysen wurden synthetisierte Oligonukleotide der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg eingesetzt. Die in Tabelle 2.13 dargestellten Primersequenzen wurden für den Nachweis verschiedener Gensequenzen und zur Herstellung der Sonden für Southern Hybridisierung verwendet.

Tabelle 2.13: Primersequenzen zum Nachweis transgener Pflanzen

Zielgen bzw. -sequenz	Name	sense Primer antisense Primer	Annealing- temperatur	Produkt- größe
<i>smRS-GFP</i>	GFP	5' -GGA CGA CGG GAA CTA CAA GA-3' 5'- AAA GGG CAG ATT GTG TGG AC -3'	65 °C	320 bp
<i>smRS-GFP</i>	GFP neu	5'- ATG AGT AAA GGA GAA GAA C -3' 5'- TTT GTA TAG TTC ATC CAT GC -3'	55 °C	676 bp
<i>nptII</i>	nptII	5'- TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG -3' 5'- AAT ATC ACG GGT AGC CAA CG -3'	65 °C	512 bp
<i>uidA</i>	GUS	5'- GGC ACA GCA CAT CAA AGA GA -3' 5'- TGC TGT CGG CTT TAA CCT CT -3'	60 °C	380 bp
Ribosomale Untereinheit	18s	5'- ATG GCC GTT CTT AGT TGG TG -3' 5'- GTA CAA AGG GCA GGG ACG TA -3'	68 °C	350 bp

2.11 Agarosegelelektrophorese und verwendete Größenstandards

Für die Auftrennung von Nukleinsäuren, PCR-Produkten und Restriktionsspaltungen wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Dieses erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese in einem 0,8 %igem Agarosegel (w/v in 1x TAE-(Tris-EDTA-Actetat) Puffer, siehe Tabelle 2.14). Die Agarose wurde durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50 °C mit 0,1 µg/mL Ethidiumbromid versetzt, unter einem Abzug in eine Flachbett-Gelkammer gegossen und ca. 20 min stehen gelassen. Die Elektrophorese wurde bei ca. 5 V/cm durchgeführt. Nach gelelektrophoretischer Trennung erfolgte die Visualisierung der DNA durch Anregung mit UV-Licht (302 nm) auf einen Transilluminator (Biometra, Ti5). Die Schätzung der DNA-Konzentrationen als auch die Größenbestimmung der PCR- bzw. Restriktionsfragmente erfolgte im visuellen Vergleich (Geldokumentationsprogramm: BioDocAnalyze, Biometra).

Als Marker für die DNA-Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe von λ-DNA (ng/µL) eingesetzt. Die Überprüfung der PCR-Amplikons erfolgte in einem

0,8 %igen Agarosegel, zur Auftrennung von Restriktionsfragmenten wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Die Proben und die jeweils eingesetzten Marker wurden mit 1/10 des Volumens OrangeG-Ladepuffer (siehe Tabelle 2.15) versetzt und in die Taschen geladen. Zur Auftrennung der PCR-Amplikons wurde als molekularer Größenstandard der Gelelektrophorese *Pst*I restringierte λ -Phagen DNA (λ -*Pst* Marker) (Abbildung 2.9) oder ein 100bp-Marker (Abbildung 2.10) verwendet.

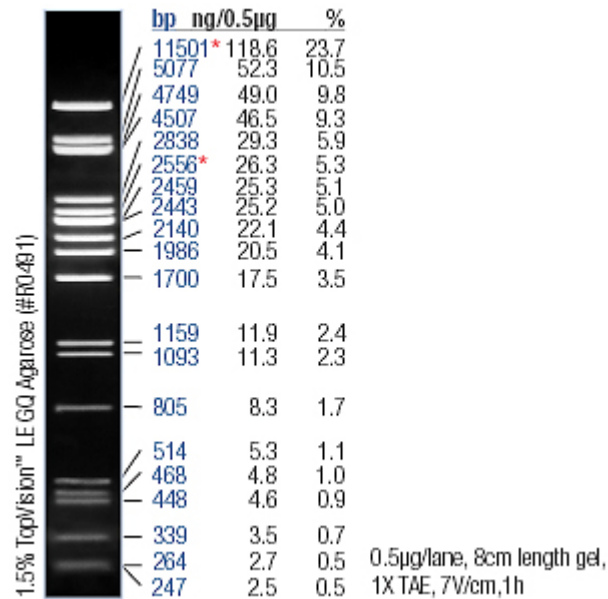


Abbildung 2.9: Fragmentlängen des λ -*Pst*I Markers (Fermentas)

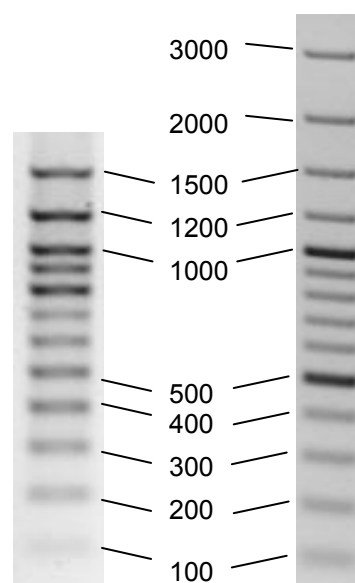


Abbildung 2.10: Fragmentlängen der zwei verwendeten 100bp Marker

Der DIG-markierte DNA Molecular Weight Marker III (Roche) wurde als Größenstandard bei Southern Hybridisierung verwendet (Abbildung 2.11).

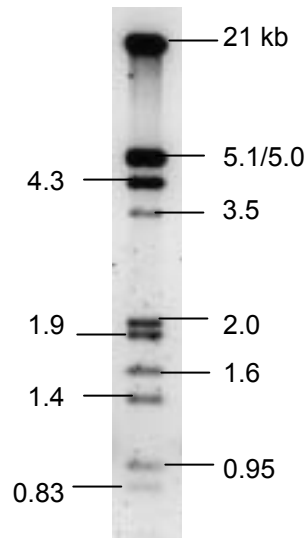


Abbildung 2.11: Fragmentlängen des DIG-markierten DNA Molecular Weight Markers (Roche)

Tabelle 2.14: Zusammensetzung 1×TAE-Puffer:

1× TAE-Puffer:
40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA
pH-Wert 8,0

Tabelle 2.15: Zusammensetzung OrangeG-Ladepuffer

OrangeG-Ladepuffer:
30 % Glycerin
0,25 % OrangeG
mit H ₂ O dest. auffüllen

2.12 Infiltration zum transienten Nachweis von GFP

Auf Basis einer transienten Genexpression wurde die Funktion verschiedener *gfp*-Versionen in den drei untersuchten Pflanzenarten getestet. Transiente Genexpression ist eine vorübergehende, nicht dauerhafte Expression eines Gens. In diesem Fall diente sie zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit und Detektierbarkeit des Green Fluorescent

Protein (GFP) in den drei Zierpflanzen *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.), *Petunia* Cultivars und *Pelargonium*.

Dazu sollte die Expression von zwei *gfp*-Varianten, *mGFP4* (HASELOFF ET AL. 1997) und *smRS-GFP* (DAVIS UND VIERSTRA 1998) verglichen werden. Ziel war es, die Funktionsfähigkeit des *gfp* als Reportergen in Transformationsversuchen zu zeigen und die Möglichkeit der Verwendung in stabilen Transformationsversuchen als Reportergen abzuschätzen. Als Kontrolle dafür, dass eine auftretende Fluoreszenz durch das GFP-Protein hervorgerufen wurde und nicht aufgrund einer eventuellen Eigenfluoreszenz auftrat, wurde ein Plasmid verwendet, das anstelle von *gfp* das *uidA*-Gen enthielt (JEFFERSON 1987).

2.12.1 Herstellung der *A. tumefaciens*-Suspension zum transienten Nachweis

Zur Herstellung der *Agrobacterium tumefaciens*-Suspension fand die Methode nach BENDAHMANE ET AL. (2000) Anwendung. 20 mL kanamycinhaltiges LB-Flüssigmedium (50 mg/L Kanamycin) wurden mit jeweils 30 µL einer Glycerindauerkultur von pGreenII0000mGFP4 im *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA4404, LBA4404+pGreenII0029smRS-GFP bzw. LBA4404+pIBGUS angeimpft und bei 28 °C und 250 UpM auf einem Schüttellinkubator (B. Braun Biotech International Certomat[®]HK Certomat[®]R) kultiviert. Die bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6-0,8 kultivierte Suspension wurde in 50 mL Falkonröhrchen überführt und bei 4 °C und 3000 UpM, (1620 × g) für 10 min zentrifugiert (Sigma Laboratory Centrifuges, 3k18). Der Überstand wurde danach verworfen und das Bakterienpellet im Infiltrationspuffer (Tabelle 2.16) resuspendiert. Dabei wurde die Bakteriendichte auf eine OD₆₀₀ = 0,5 eingestellt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung des Infiltrationspuffers:

Infiltrationspuffer:

10 mM MES
10 mM MgCl₂
150 µM Acetosyringon (sterilfiltriert; Zugabe direkt vor Infiltration)

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert auf 5,6 eingestellt

2.12.2 Infiltration der Blätter

Für den Versuch wurden Gewächshauspflanzen von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.), *Petunia* Cultivars, *Pelargonium* und *Nicotiana benthamina* als Positiv-Kontrolle verwendet. Die Infiltration wurde mit einer Injektionspritze ohne Nadel (Einmalspritze Injekt 5 mL von Braun) an voll entwickelten und gesunden Blättern durchgeführt. Dazu wurde die Spritze gegen die Blattunterseite gedrückt und mit dem Finger auf der Blattoberseite, komplementär zur Spritze, ein Gegendruck ausgeübt und dabei die Suspension in die Interzellularen der Blattunterseite infiltriert. Eine erfolgreiche Infiltration zeigte sich an einer Durchnässung des Blattes an der Blattunterseite. Nach zwei Tagen erfolgte an infiltrierten Blättern (ein Blatt/Pflanze) eine Detektion der GFP-Expression unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (siehe 2.15).

2.13 A. *tumefaciens*-vermittelte Pflanzentransformation

2.13.1 Kultur, Anzucht, Aufreinigung von *A. tumefaciens* für die Pflanzentransformation

Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer wurden über Nacht angezogene Kulturen von *Agrobacterium tumefaciens* verwendet, die aus Glycerindauerkulturen herangezogen wurden. Zur Inokulation wurden 250 µL einer *Agrobacterium tumefaciens*-Glycerindauerkultur in 50 mL LB-Flüssigmedium mit entsprechendem selektivem Antibiotikum in einem 250 mL Erlenmeyerkolben angezogen. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 28 °C und 250 UpM über Nacht. Die entstandene *Agrobacterium tumefaciens*-Suspension wurde zentrifugiert (10 min, 3000 UpM (1592 × g); Sigma Laboratory Centrifuges, 3k18) bei 22 °C und durch Resuspension in flüssigem, hormonfreiem Medium (siehe Tabelle 2.8) eine OD₆₀₀ = 0,4 eingestellt. Die daraus entstandene *Agrobacterium tumefaciens*-Suspension wurde nach Zugabe von 0,1 mM Acetosyringon (sterilfiltriert) für die Pflanzentransformationsversuche verwendet.

2.13.2 Transformationsmethode

Den allgemeinen Ablauf der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Pflanzentransformation zeigt Abbildung 2.12.

Die nach Transformation bei Abnahme von einem Spross pro Explantat errechnete Transformationsrate in % ergibt sich aus Formel 1:

$$\text{Transformationsrate [\%]} = \frac{(\text{Anzahl PCR positiver Sprosse} \times 100)}{\text{Sprosse gesamt}}$$

Formel 1: Transformationsrate (%)

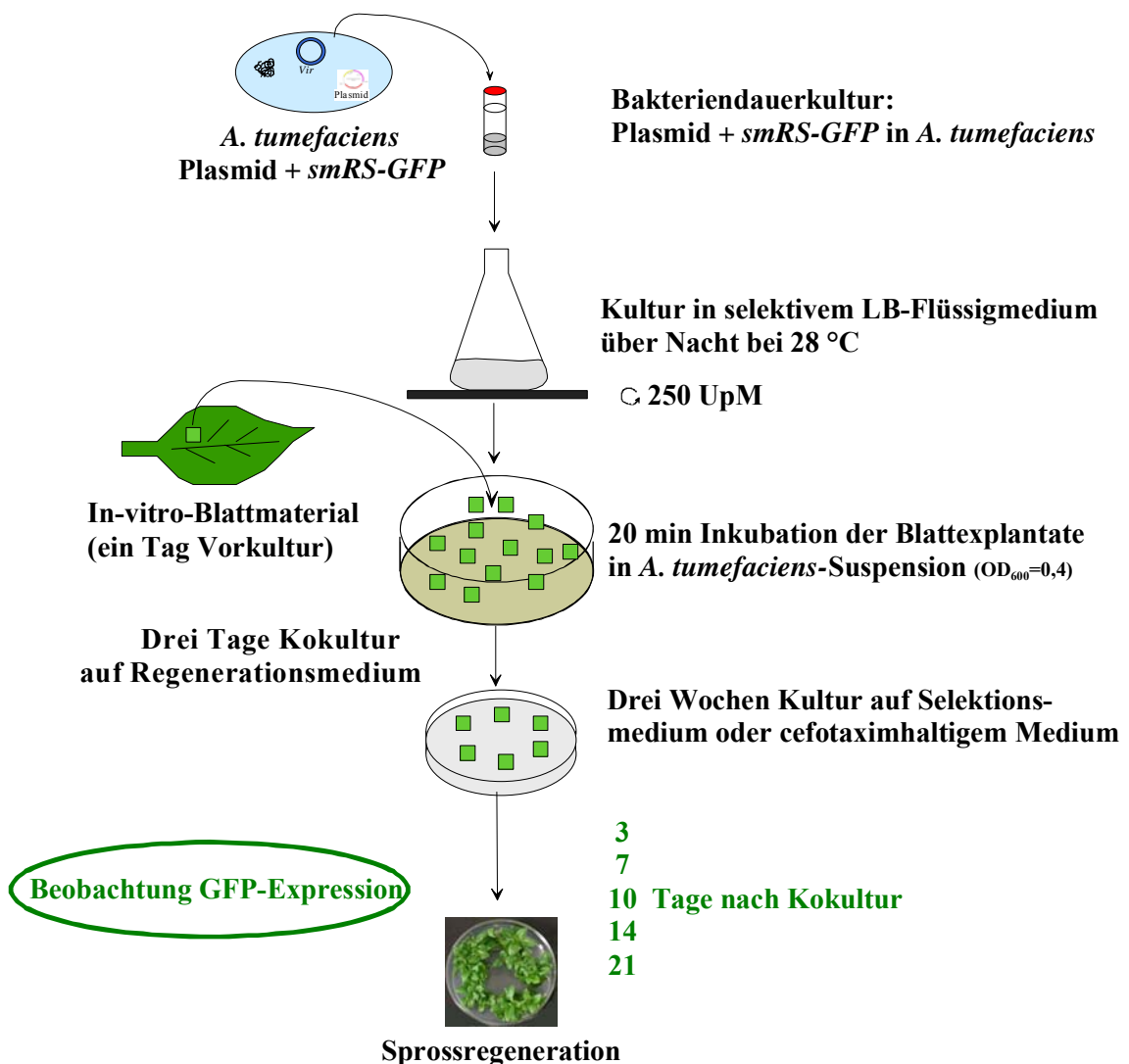


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung von *A. tumefaciens*-vermittelter Pflanzentransformation und GFP-Expressionsbeobachtung

***Petunia* Cultivars:**

Die Transformationsversuche von *Petunia* wurden in Anlehnung an die „Leaf-Disc“-Methode nach HORSCH ET AL. (1985) durchgeführt.

Hierfür wurden jeweils die jüngsten, vollständig entwickelten Blätter aus In-vitro-Sprosskulturen verwendet. Blattstiel, Spreitenspitze und Blattrand wurden verworfen und der zentrale verbleibende Bereich in ca. 0,3 cm breite Querstreifen geschnitten (siehe Abbildung 2.13).

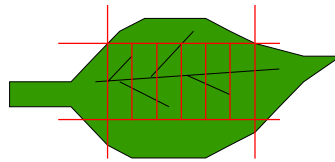


Abbildung 2.13: Präparation der Blattexplantate für *Petunia* Cultivars

Die Blattexplantate wurden für einen Tag mit der adaxialen Seite nach oben zeigend in einer 6 cm Petrischale auf dem Regenerationsmedium vorkultiviert. Während der Vorkulturzeit wurden die Petrischalen mit Parafilm™ verschlossen und bei 24 ± 1 °C und einer Beleuchtungsstärke von ca. 32 bis 48 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ kultiviert. Nach Vorkultur wurden die Blattexplantate in eine 9 cm sterile Plastikpetrischale überführt, die 15 mL *Agrobacterium tumefaciens*-Suspension enthielt (siehe 2.13.1). Die Blattexplantate wurden bei 40 UpM für 20 Minuten in dieser Bakteriensuspension inkubiert. Anschließend trockneten die Blattexplantate auf sterilem Filterpapier und wurden dann mit der adaxialen Seite nach oben zeigend auf das Regenerationsmedium gelegt, die Petrischalen mit Parafilm™ verschlossen und für drei Tage bei 24 ± 1 °C und einer Tageslänge von 16 Stunden kokultiviert. Zur Eliminierung von *Agrobacterium tumefaciens* wurden die Blattexplantate nach drei Tagen Kokultur in einer 9 cm Petrischale mit 40 mL sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ unter Zugabe von 500 mg/L Cefotaxim für 20 Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie auf Filterpapier getrocknet und auf entsprechendem Selektionsmedium für drei Wochen kultiviert, bonitiert und nach der ersten Bonitur alle 14 Tage auf neues Selektionsmedium umgesetzt. Die Kultur und Selektion der Blattexplantate und Sprosse erfolgte nach Transformation wie unter 2.13.3 beschrieben.

Pelargonium

Die Transformationsversuche von *Pelargonium* wurden in Anlehnung an WINKELMANN ET AL. (2005) durchgeführt.

Zur Verwendung kamen Blattexplantate und Blattstielsegmente von jungen, vollständig entwickelten Blättern aus In-vitro-Sprosskulturen. Zur Herstellung der Blattexplantate wurde die Spreitenspitze und der Blattrand verworfen und Blattexplantate von 5 mm × 5 mm Größe geschnitten. Blattstiele wurden in Segmente von 4 mm bis 6 mm Länge geschnitten. Während Blattstielsegmente horizontal auf dem Medium für einen Tag vorkultiviert wurden, erfolgte dies bei Blattexplantaten mit der adaxialen Seite nach oben zeigend in einer 6 cm Petrischale mit 10 mL des entsprechenden Regenerationsmediums. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und bei 24 ± 1 °C bei einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden und einer Beleuchtungsstärke von ca. 32 bis 48 μmol/m²s kultiviert. Nach Vorkultur wurde wie in Abbildung 2.12 dargestellt und bei *Petunia* Cultivars beschrieben fortgefahren.

Impatiens Cultivars (Neuguinea Grp.)

Für *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) existieren keine publizierten Transformationsprotokolle und die Pflanzenart gilt als schwer zugänglich für den *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer. Die Ball Horticultural Company hat ein Verfahren für den Gentransfer entwickelt und patentieren lassen („Production of transgenic *Impatiens*“, US Patent 6121511).

Als Ausgangsmaterial für *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformationen von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) wurde ein von der Firma Klemm & Sohn GmbH & Co. KG erarbeitetes Regenerationsprotokoll genutzt. Hierbei wurden sogenannte zerkleinerte, meristematische Cluster von In-vitro-Sprosskulturen verwendet. Abbildung 2.14 verdeutlicht die Herkunft der verwendeten Explantate, ausgehend von einer Sprosskultur (A, B). Aus einer In-vitro-Sprosskultur (Abb. 2.14, A) von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) wurden Sprossachsen präpariert. Hierbei wurden die Sprossachsen unter- und oberhalb der Nodien (Abb. 2.15 A, B) geschnitten und davon ca. 1 mm dicke Schnitte (Abb. 2.16 A) präpariert und zerkleinert (Abb. 2.16 B) auf Regenerationsmedium aufgelegt. Vier Wochen nach Kultur dieser Abschnitte auf Regenerationsmedium kam es zur Sprossbildung. Nach Abnahme der gebildeten Sprosse und erneutem Zerkleinern der Abschnitte mit einem Skalpell wurden diese weiterkultiviert und neue Sprosse wuchsen aus (siehe Abb. 2.17 A und B).



Abbildung 2.14: In-vitro-Sprosskultur von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) 'CP Red', Ausgangsmaterial für die Präparation von meristematischen Clustern (A: bewurzelter Spross, B: Spross nach Entfernung der Wurzeln)



Abbildung 2.15: Präparation der Sprossachsenabschnitte von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) 'CP Red' aus In-vitro-Sprosskulturen (A: seitliche Ansicht, B: Aufsicht)



Abbildung 2.16: Sprossbildung an einem präparierten Sprossachsenabschnitts von *Impatiens* 'CP White' nach zwei Wochen (A) und daraus geschnittene meristematische Cluster (B)



Abbildung 2.17: Sprossbildende meristematische Cluster nach vier Wochen Kultur bei *Impatiens* 'CP White'

Diese mit einem Skalpell zerkleinerten, meristematischen Cluster (Abb. 2.16, B) wurden in den Transformationsversuchen verwendet. Hierbei fand auch das in Abbildung 2.12 dargestellte Transformationsschema Anwendung. Die meristematischen Cluster wurden einen Tag vor Transformation geschnitten und auf einer Filterpapierlage auf Regenerationsmedium bei 24 ± 1 °C, einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden und einer Beleuchtungsstärke von ca. 32 bis $48 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ vorkultiviert. Nach Vorkultur wurde wie in Abbildung 2.12 dargestellt und bei *Petunia* Cultivars beschrieben, fortgefahren. Nach Kokultur wurden Versuche zur Ermittlung des geeigneten Zeitpunkts des Selektionsbeginns angelegt.

2.13.3 Selektion und Regeneration transgener Pflanzen

2.13.3.1 Selektion mit Phosphinothricin

Die Selektion von Explantaten transformiert mit pGreenII0229smRS-GFP und pIBGUS wurde unter Verwendung von Phosphinothricin durchgeführt. Die Selektion begann nach drei Tagen Kokultur mit einer zuvor auf die Pflanzenart und Sorte abgestimmten Konzentration an Phosphinothricin (siehe 3.3.1.1, 3.4.1.1, 3.5.1.1) mit zusätzlich 500 mg/L Cefotaxim im Regenerationsmedium. Drei Wochen nach Transformation wurde auf Sprossregeneration bonitiert, und potentiell transgene Sprosse wurden auf Sprosskulturmedium mit einer für die Pflanzenart zuvor getesteten Konzentration an Phosphinothricin (siehe 3.3.1.1, 3.4.1.1, 3.5.1.1) und 500 mg/L Cefotaxim transferiert.

2.13.3.2 Selektion mit Kanamycin

In Transformationsversuchen mit den Vektoren pMen65 und pGreenII0029 wurden Explantate unter Verwendung von Kanamycin selektiert. Hierbei wurde eine geeignete Kanamycinkonzentration (siehe 3.3.1.2, 3.4.1.2, 3.5.1.2) zur Selektion mit zusätzlich 500 mg/L Cefotaxim im Regenerationsmedium verwendet. Die Selektion begann drei Tage nach Kokultur auf Regenerationsmedium zur Induzierung von Adventivsprossbildung. Sprossregeneration wurde drei Wochen nach Transformation bonitiert und potentiell transgene Sprosse auf selektives Sprosskulturmedium mit 500 mg/L Cefotaxim transferiert.

2.13.3.3 Ohne Selektionsagens

Bei Pflanzentransformationen ohne Verwendung eines Selektionsagens wurden die Explantate nach drei Tagen Kokultur auf Regenerationsmedium mit 500 mg/L Cefotaxim kultiviert und alleinig über die Expression von *smRS-GFP* selektiert. Nach drei Wochen Kultur wurde auf Regeneration boniert und alle potentiell transgenen Sprosse mit Expression von *smRS-GFP* auf Sprosskulturmedium mit einer auf die Pflanzenart abgestimmten Konzentration an Selektionsagens für Sprosskulturen und 500 mg/L Cefotaxim weiter kultiviert. Hierbei wurden alle Sprosse, die *smRS-GFP*-Expression aufwiesen, d. h. auch mehrere pro Explantat, verwendet.

2.13.3.4 Vergleich der Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP

Bei Versuchen, die zum Ziel hatten, den Unterschied zwischen Selektion mit Kanamycin und GFP im Vergleich zur alleinigen Selektion über GFP zu zeigen, wurden die Explantate und die regenerierenden Sprosse drei, sieben, zehn, 14 und 21 Tage nach Transformation fluoreszenzmikroskopisch untersucht und markiert. Hierbei wurden *smRS-GFP* positive Sprosse, sowohl in der Variante mit Kanamycinselektion und GFP als auch in der Variante mit alleiniger Selektion von GFP, identifiziert, markiert und die Gesamtzahl detektierter, GFP-positiver Sprosse pro Explantat auf selektivem Sprosskulturmedium mit 500 mg/L Cefotaxim überführt.

2.14 Einfluss des *A. tumefaciens*-Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin

Der Effekt verschiedener *A. tumefaciens*-Stämme auf die Selektionswirkung des herbiziden Wirkstoffs Phosphinothricin (PPT) und auf die Sprossregeneration an Blattexplantaten von *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' sollte untersucht werden.

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden In-vitro-Sprosskulturen von *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' verwendet, die bei 24 °C drei Wochen auf Sprosskulturmedium kultiviert wurden und von denen Blattexplantate geschnitten und für die Versuche verwendet wurden. Ausgewählte *A. tumefaciens*-Stämme zur Versuchsdurchführung waren LBA4404 (HOEKEMA ET AL. 1983), GV2260 (MC BRIDE UND SUMMERFELT 1990), GV3101 (HOLSTERS ET AL. 1980) und EHA105 (HOOD ET AL. 1993). Einzelne Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* werden durch die Art der verwerteten Opine voneinander unterschieden. Die *Agrobacterium*-Stämme LBA4404 und GV2260 können das Opine Octopin, GV3101 und EHA105 Nopalin verwerten. EHA105 ist ein Derivat des super-virulenten *A. tumefaciens*-Stammes A281 und enthält im C58 chromosomalen Hintergrund das entwaflnete Ti-Plasmid pEHA105 (HOOD ET AL. 1993). Tabelle 2.17 listet die ausgewählten *A. tumefaciens*-Stämme, deren chromosomalen Hintergrund und den Opintyp auf.

Die hier untersuchten *Agrobacterium*-Stämme beinhalteten den binären Vektor pGreenII0229 mit *bar*-Gen und *smRS-GFP* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Phosphinothricin wurde in einer zuvor für Petunien als letal getesteten Dosis von 3 mg/L angewendet (siehe 3.3.1.1).

Tabelle 2.17: Ausgewählte *A. tumefaciens*-Stämme, deren chromosomaler Hintergrund und Opintyp (nach HELLENS ET AL. 2000b)

<i>Agrobacterium</i>-Stamm	Chromosomaler Hintergrund	Opine	Literatur
LBA4404	TiAch5	Octopin	(HOEKEMA ET AL. 1983)
GV2260	C58	Octopin	(MC BRIDE UND SUMMERFELT 1990)
GV3101	C58	Nopalin	(HOLSTERS ET AL. 1980)
EHA105	C58	Succinamopin (Nopalinanalog)	(HOOD ET AL. 1993)

Der Versuchsaufbau gliederte sich in drei Versuchsteile. Der erste Versuch untersuchte die Wirkung von Phosphinothricin während der Inkubation über Nacht mit verschiedenen *Agrobacterium*-Stämmen auf die Sprossregeneration. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob *Agrobacterium*-Stämme PPT so verändern, dass eine geringere Wirksamkeit die Folge ist. Der zweite Versuch sollte den Effekt der *Agrobacterium*-Stämme alleinig auf die Sprossregeneration dokumentieren und damit klären, ob die Stämme regenerationsfördernde Substanzen produzieren. Versuch 3 hatte zum Ziel den Effekt einer Phosphinothricingabe nach der Übernachtkultur mit *Agrobacterium*-Stämmen auf die Sprossregeneration darzulegen und damit zu klären, ob es zu einer Detoxifizierung oder eines Abbaus von Phosphinothricin durch *Agrobacterium*-Stämme kommt. Der grundlegende Versuchsaufbau ist der Versuchsdurchführung des nachfolgend beschriebenen Versuch 1 zu entnehmen und wurde für die weiteren Versuche verändert.

Versuchsdurchführung:

Der Versuch zur Untersuchung des Einflusses des *A. tumefaciens*-Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin gliedert sich in drei Versuchsteile. Im ersten Versuch sollte der Effekt der Selektionswirkung von Phosphinothricin in Anwesenheit verschiedener *Agrobacterium*-Stämmen auf die Sprossregeneration untersucht werden. Hierfür sollten die *Agrobacterium*-Stämme im Regenerationsmedium mit Phosphinothricin über Nacht kultiviert werden und erst nach der Übernachtkultur Phosphinothricin dem Medium zugegeben werden.

Versuch 1 ging von flüssigem Regenerationsmedium aus, und beinhaltete folgende Varianten: Kontrolle 1 Medium ohne Zusätze zur Überprüfung der Regenerationsleistung, Kontrolle 2 Medium mit 3 mg/L Phosphinothricin zur Verifikation der Regeneration hemmenden Wirkung von PPT und Varianten eins bis vier mit Phosphinothricin und *Agrobacterium*-Suspension (LBA4404, GV2260, GV3101 oder EHA105; $OD_{600} = 0,01$). Diese Varianten wurden über Nacht bei 24 ± 1 °C und 60 UpM. kultiviert. Die Varianten mit *Agrobacterium*-Inokulation wurden anschließend sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm, Filtropur Sarstedt). Aus den Übernachtansätzen wurde Festmedium hergestellt, das aus zweieinhalb Volumenteilen (VT) Mediumansatz und einem Volumenteil 3 %iger LM (Low melting)-Agarose (Biozym), die bei 70 °C verflüssigt wurde, bestand. Jeweils 3,5 mL Medium wurden in

eine 3,5 cm-Petrischale plattiert. In-vitro-Blattexplantate von *Petunia* Cultivars, die drei Tage auf Regenerationsmedium vorkultiviert worden waren, wurden auf diese verfestigten Medien aufgelegt. Eine Petrischale beinhaltete vier Explantate, pro Variante wurden zehn Petrischalen belegt. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs ist der Abbildung 2.18 zu entnehmen.

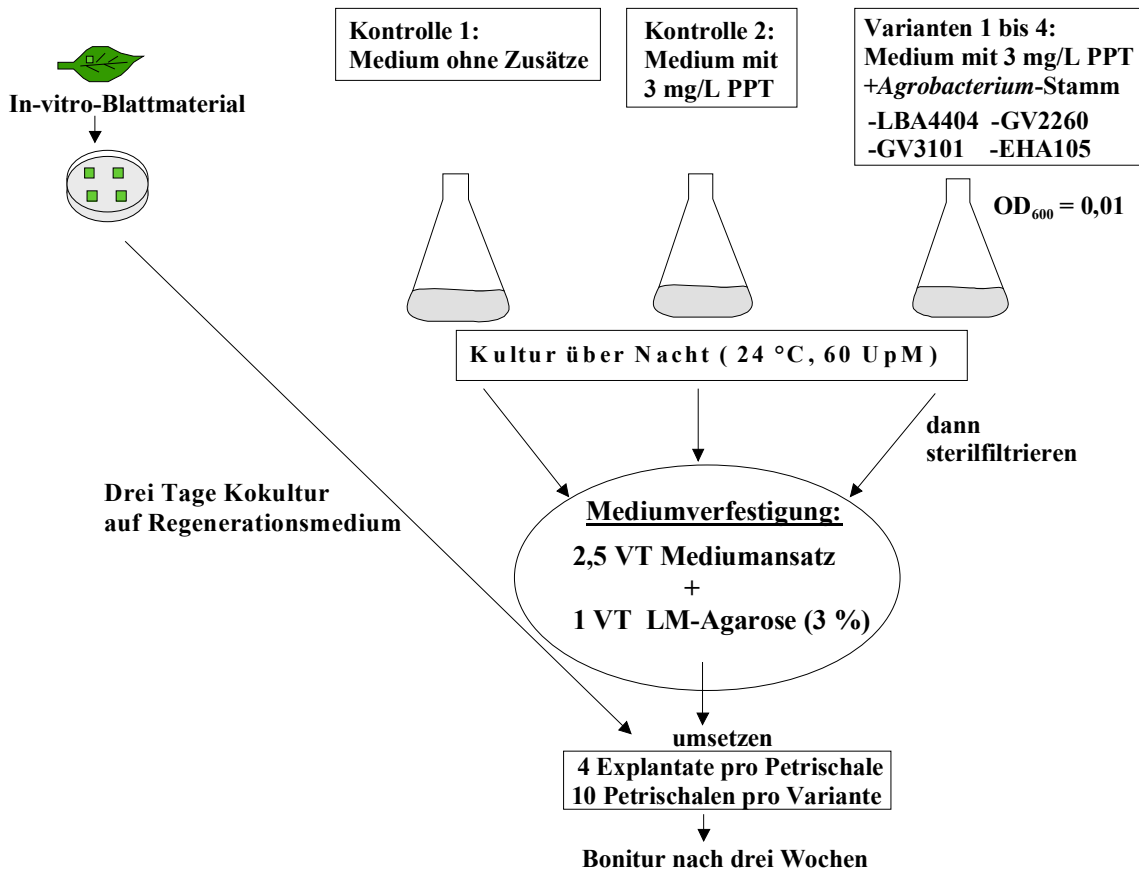


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung des Versuchs zum Einfluss des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin (Versuch 1)

In Versuch 2 wurden die *A. tumefaciens*-Stämme im Regenerationsmedium ohne Phosphinothricin über Nacht kultiviert. Nach der Sterilfiltration erfolgte dann die Zugabe von Phosphinothricin zum flüssigen Regenerationsmedium. Die Versuchsdurchführung war mit Versuch 1 identisch, ebenso die Bezeichnung der Versuchsvarianten.

Versuch 3 basierte auf Versuchsvarianten ohne Phosphinothricin. Die Versuchsvarianten waren: Kontrolle 1; Medium ohne Zusätze, Kontrolle 2; Medium mit 3 mg/L PPT und Varianten eins bis vier mit *Agrobacterium*-Inkubation (LBA4404,

GV2260, GV3101 oder EHA105; $OD_{600} = 0,01$). Die Durchführung war mit Versuch 1 identisch.

Die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendes Explantat ergab sich aus Formel 2:

$$\text{Mittlere Anzahl Sprosse / reg. Explantat} = \frac{\text{Gesamtzahl regenerierter Sprosse}}{\text{Anzahl Explantate mit Sprossregeneration}}$$

Formel 2: Mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendes Explantat

Die Sprossregenerationsrate in % ergab sich aus der Anzahl der Explantate mit Sprossregeneration in Bezug auf die Gesamtanzahl an Explantaten (Formel 3):

$$\text{Sprossregenerationsrate (\%)} = \frac{(\text{Anzahl Explantate mit Sprossregeneration} \times 100)}{\text{Anzahl eingesetzter Explantate}}$$

Formel 3: Sprossregenerationsrate (%)

2.15 GFP-Fluoreszenzmikroskopie

Der Nachweis der GFP-Aktivität erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie (Carl Zeiss Axioskop 40; Leica MZFLIII jeweils mit einer Quecksilberdampfampe ausgestattet) und Dokumentation mit dem Softwareprogramm (Carl Zeiss AxioVision 4.6). In Tabelle 2.18 sowie Abbildung 2.19 (A und B) sind die verwendeten Filterkombinationen von der Firma AHF Analystechnik und deren Emmision/Transmission (%) bei verschiedenen Wellenlängen (nm) aufgeführt.

Tabelle 2.18: Verwendete *gfp*-Gene und Eigenschaften der verwendeten Filtersätze

<i>gfp</i> -Gen	Anregung	Strahlteiler	Emission
smRS-GFP	HQ 470/40	Q 495 lp	HQ 525/50
mGFP4	D 395/40	425 dclp	D 510/40

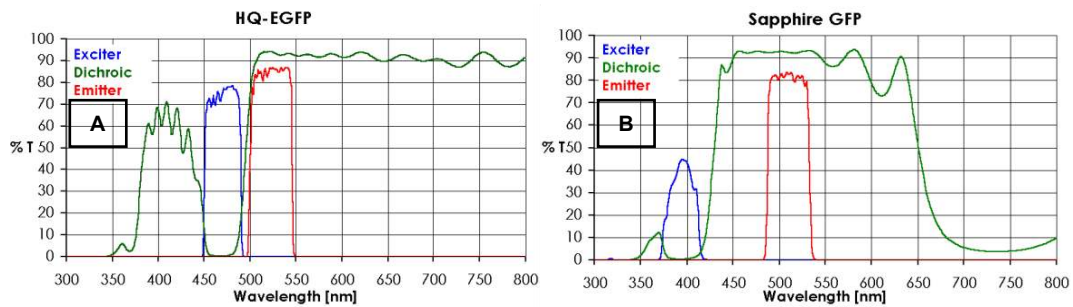


Abbildung 2.19: Verwendete Filtersätze für *smRS-GFP* (A) für *mGFP4* (B) und Transmission (%) in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Quelle: AHF Analystechnik)

2.16 Histochemischer GUS-Test

Zum histochemischen Nachweis der Expression des *uidA*-Gens in potentiellen transgenen Pflanzen wurde ein modifiziertes Protokoll von JEFFERSON (1987) verwendet. Hierbei wurden Sprosse oder Blattexplantate in einer GUS-Färbelösung (Tabelle 2.19, 2.20 und 2.21) in einem 2 mL Reaktionsgefäß für ca. ein bis zwei Minuten vakuuminfiltriert (Exsikkator (KNF Neuberger), angeschlossen an eine Vakuumpumpe (KNF Neuberger Laboport[®]) und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Substratstammlösung 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-GlcA):

50 mM X-GlcA gelöst in:

 52 % DMSO
 + 48 % 0,05 M NaPO₄-Puffer (pH 7,0)

Tabelle 2. 20: Zusammensetzung NaPO₄-Puffer

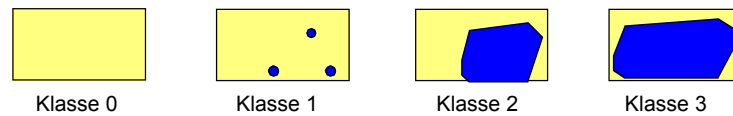
0,1 M NaPO₄-Puffer:

 6,77 ml 1 M Na₂HPO₄
 3,23 ml 1 M NaH₂PO₄
 pH-Wert 7,0

Tabelle 2.21: Zusammensetzung der GUS-Färbelösung:

GUS-Färbelösung:
2 mM X-GlcA
0,5 mM NaPO ₄ -Puffer (pH 7,0)
0,5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆]
0,5 mM K ₃ Fe(CN) ₆
0,5 % Triton X-100
H ₂ O dest.

Nach Inkubation über Nacht wurde die Färbelösung durch EtOH_{70%} ersetzt. Eine Entfärbung des Chlorophylls mit EtOH_{70%} ließ eine bessere visuelle Unterscheidung zwischen gefärbten und nicht gefärbten Bereichen zu, die unter einem Stereomikroskop (Zeiss Stemi 2000-C) ausgewertet wurden. Zur Bestimmung der GUS-Expression wurden blau gefärbte Bereiche am Explantat in Beziehung zur Gesamtexplantatgröße gesetzt und in Klassen von eins (geringe Anzahl blau gefärbte Bereiche am Explantat) bis Klasse drei (hoher Anteil blau gefärbter Bereiche an der Gesamtfläche) eingeteilt (siehe Abbildung 2.20).

**Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der Klassifizierung der Stärke der GUS-Expression**

2.17 Isolation von Nukleinsäuren

2.17.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Plasmid-DNA Isolation wurde das kommerziell erhältliche Macherey und Nagel NucleoSpin[®] Plasmid Kit verwendet, dessen Durchführung nicht im Detail erläutert wird, sondern es sei auf den Hersteller verwiesen.

Einzelne Bakterienkolonien wurden in 10 mL LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Selektionsagens inkubiert. Nach Übernachtskultur wurde aus 4 mL entsprechend den Angaben des Herstellers Plasmid-DNA isoliert sowie aus der restlichen Kultur eine Bakteriendauerkultur angelegt (siehe 2.6.3). Die DNA-Quantifizierung erfolgte visuell über Agarosegelelektrophorese (siehe 2.11).

2.17.2 Isolation von Gesamt-DNA aus Pflanzen

Zur Isolation von Gesamt-DNA wurden verschiedene grundlegende Extraktionsmethoden angewendet und auf ihre Effektivität hinsichtlich DNA-Extraktion aus geringen Mengen Pflanzenmaterials von *Petunia* Cultivars, *Pelargonium* und *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) verglichen. Zum Einsatz kam auch das kommerzielle DNeasy™ Plant Mini Kit (QIAGEN) Kit, dessen Anwendung vom Hersteller beschrieben wurde.

Für molekulare Analysen wurden, wenn nicht anders beschrieben pro Pflanze 30 mg junges In-vitro-Blattmaterial verwendet. Bei getrocknetem Blattmaterial handelte es sich um einen Tag in einem mit Silicagel befüllten Exsikkator (KNF Neuberger Laboport, Kartell) getrocknetes In-vitro-Blattmaterial.

Zum Vergleich der unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden wurden die Extraktionsmethoden zu Beginn nach Protokoll (siehe 2.17.2.1, 2.17.2.2, 2.17.2.3) durchgeführt und dann vor allem bezüglich des ersten Schrittes, der Lysis der Pflanzenzellen, optimiert. Dazu wurden die DNA-Extraktionsmethoden verglichen in der Verwendung von unterschiedlichen Volumen des Reaktionsgefäßes (1,5 mL oder 2,0 mL), Art der Aufbereitung (Mikropistill eingespannt in ein Laborrührwerk (Janke & Kunkel, IKA Werke, RW 20) oder mit einem Mikropistill per Hand aufbereitet) und Zustand des Blattmaterial (frisch oder getrocknet), woraus sich fünf Varianten ergaben (siehe Tabelle 2.22). Insgesamt wurde der Versuch in zwei Wiederholungen durchgeführt.

Tabelle 2.22: Beschreibung der Versuchsvarianten zur Optimierung der DNA-Extraktion nach DORORKHOV UND KLOCKE (1997)

Varianten	Blattmaterial	Art der Aufbereitung	Volumen des Reaktionsgefäßes
V1	frisch	per Hand	1,5 mL
V2	frisch	per Hand	2,0 mL
V3	frisch	Laborrührwerk	1,5 mL
V4	frisch	Laborrührwerk	2,0 mL
V5	trocken	Optimale Aufbereitungsart	Optimales Reaktionsgefäß

2.17.2.1 QIAGEN DNeasy™ Plant Mini Kit

Die Isolation von Gesamt-DNA erfolgte mit dem DNeasy™ Plant Mini Kit (QIAGEN) entsprechend den Angaben des Herstellers. Zur DNA-Isolation wurden 30 mg oder 100 mg junges In-vitro-Blattmaterial verwendet, welches entweder mit flüssigem

Stickstoff in einem Mörser oder mit einem Mikropistill, eingespannt in ein Laborrührwerk (Janke & Kunkel, IKA Werke, RW 20), in einem Reaktionsgefäß aufbereitet wurde.

2.17.2.2 Extraktion mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)

Zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen wurde das DNA-Extraktionsverfahren mit CTAB Fällung (persönliche Mitteilung F. Engel, 2004) verwendet. Im Folgenden wird die Vorgehensweise kurz beschrieben:

1. Einwaage von 30 mg frischem Blattmaterial, Zugabe von 200 μ L Extraktionspuffer CTAB (Tabelle 2.23) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß
2. Aufbereitung mit einem Mikropistill eingespannt in ein Laborrührwerk befestigt an einem Stativ
3. 200 μ L Extraktionspuffer CTAB zugeben, Probe kräftig schütteln (Vortex)
4. 30 min bei 65 °C inkubieren
5. Zugabe von 500 μ L Chloroform und kräftig schütteln (Vortex)
6. Zentrifugation bei 18 °C für 5 min bei 13200 UpM ($16110 \times g$) (Eppendorf Centrifuge 5415D)
7. Obere wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
8. 600 μ L CTAB-Fällungspuffer (Tabelle 2.24) hinzugeben
9. Kurzes Schwenken der Reaktionsgefäße, 15 min bei Raumtemperatur inkubieren, erneut schwenken
10. Zentrifugation für 5 min bei 13200 UpM ($16110 \times g$)
11. Überstand verwerfen
12. 600 μ L TE (high salt)-Puffer (Tabelle 2.25) auf das Pellet pipettieren und schwenken
13. 750 μ L eiskalten EtOH_{99%} zugeben und mischen
14. Zentrifugation für 5 min bei 13200 UpM ($16110 \times g$)
15. Überstand verwerfen und Trocknen des Pellets unter Luftstrom
16. Pelletierte DNA in 100 μ L TE (Tris-EDTA)-Puffer (Tabelle 2.26) lösen
17. Gelöste DNA bei -20 °C lagern oder längerfristig bei -80 °C

Tabelle 2.23: Zusammensetzung Extraktionspuffer CTAB:**Extraktionspuffer CTAB:**

1 % CTAB
50 mM Tris-HCl
770 mM NaCl
10 mM EDTA
0,1 % β -Mercaptoethanol
pH-Wert 8,0

Tabelle 2.24: Zusammensetzung CTAB-Fällungspuffer:**CTAB-Fällungspuffer:**

1 % CTAB
50 mM Tris-HCl
pH-Wert 7,5

Tabelle 2.25: Zusammensetzung TE (high salt)-Puffer:**TE (high salt)-Puffer:**

10 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
1 mM EDTA
pH-Wert 7,5

Tabelle 2.26: Zusammensetzung TE-Puffer:**TE-Puffer:**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
pH-Wert 8,0

2.17.2.3 DNA-Isolation nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997)

Zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen wurde die DNA-Schnellisolation für PCR nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) modifiziert nach EDWARDS ET AL. (1991) verwendet. Diese fand besonders bei *Petunia* Cultivars Anwendung. Im Folgenden wird die Vorgehensweise kurz beschrieben:

1. 30 mg frisches Blattgewebe in 1,5 mL Reaktionsgefäß einwiegen
2. 400 µL Extraktionspuffer (siehe Tabelle 2.27) hinzupipettieren und mit einem Mikropistill, eingespannt in ein Laborrührwerk befestigt an einem Stativ, aufbereiten
3. Probe kräftig schütteln (Vortex)
4. 15 min bei 65 °C, unter gelegentlichem Schwenken, inkubieren
5. 200 µL 5 M Kaliumacetat hinzugeben
6. 10 min 13200 UpM (16110 × g) (Eppendorf Centrifuge 5415D)
7. 10 min auf Eis inkubieren
8. 20 min bei 13200 UpM (16110 × g) zentrifugieren
9. 500 µL der oberen wässrigen Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
10. 500 µL Isopropanol (-20 °C) hinzugeben, beide Phasen gut vermischen
11. Nach max. 10 min, Zentrifugation bei 13200 UpM (16110 × g) für 10 min
12. Pellet in 1 mL EtOH_{70%} (-20 °C) waschen
13. Zentrifugation für 10 min bei 13200 UpM (16110 × g), Verwerfen des Überstandes und Trocknen des Pellets
14. Pelletierte DNA in 100 µL H₂O_{dest.} lösen
15. Gelöste DNA bei -20 °C lagern oder längerfristig bei -80 °C

Tabelle 2.27: Zusammensetzung Extraktionspuffer DOROKHOV UND KLOCKE (1997):

Extraktionspuffer DOROKHOV & KLOCKE (1997):

200 mM Tris-HCl, pH 7,5
250 mM NaCl
25 mM EDTA
0,5 % SDS

2.17.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte aus jungem Blattmaterial mit dem Invisorb[®] Spin Plant RNA Mini Kit (Fa Invitek) nach Anweisungen des Herstellers unter Verwendung des Lysis Solution RP. Hierbei wurden 100 mg Petunien-Blattmaterial (Gewächshaus) verwendet, das in flüssigem Stickstoff gemörsert wurde.

2.18 Klonierung zur Erstellung neuer Vektoren

Im Folgenden sind die verwendeten Methoden aufgelistet, die zur Klonierung von Fragmenten in Vektoren benutzt wurden. Plasmide, die zur Klonierung verwendet wurden, besaßen verschiedene Markergene, die eine Selektion in *Escherichia coli* ermöglichten. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen und T4-DNA-Ligase konnten Fragmente in Plasmide ligiert und nach Transformation in *Escherichia coli* vermehrt werden.

DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA wurde in einem 20 µL Reaktionsansatz durchgeführt. 0,5 bis 1,0 µg DNA wurden mit 10 U Restriktionsenzym und enzymspezifischen Restriktionspuffer nach Angaben des Herstellers Fermentas für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im LM (Low Melting)-Agarosegel (Biozym) aufgetrennte DNA-Fragmente (siehe 2.11), die zur DNA-Ligation eingesetzt werden sollten, wurden unter einem UV-Transilluminator (302 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des Invisorb Spin DNA Extraction Kits (Invitex) entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Desphosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die Dephosphorylierung (CIAP-Behandlung von Vektoren) von 0,8 µg des linearisierten Vektoren erfolgte mit 1,5 U hitzeinaktivierbarer, alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase = CIAP; Fermentas), 10× CIAP-Puffer bei 37 °C für 30 min. Nach 30 min wurden erneut 1,5 U CIAP hinzugefügt und wiederum für 30 min bei 37 °C behandelt. Abschließend erfolgte eine Aufreinigung mit dem Invisorb Spin PCRapid Kit (Invitex) entsprechend den Angaben des Herstellers.

DNA-Ligation

Für Ligationen wurde ein Verhältnis Vektor zu Insert von 1:5 gewählt. Ca. 1,0 µg Insert-DNA wurden mit 10 U T4-Ligase und entsprechender Menge 10× T4-Ligase-Puffer für zwei Tage bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Tagen Inkubation wurde der

Ligationsansatz mit dem Invisorb Spin PCRapid Kit (Invitex) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereingt.

2.19 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt, hierbei wurden ca. 1,0 µg pelletierte, vakuumgetrocknete Plasmid-DNA in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß versendet.

2.20 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zum Nachweis von Nukleinsäuren und zur Sondenherstellung (siehe 2.22) eingesetzt. Die Methode ermöglicht einzelne Nukleinsäuren aus unterschiedlichsten biologischen Materialien oder Gesamtnukleinsäurepräparationen nachzuweisen, indem sie spezifisch amplifiziert werden.

PCR zum Nachweis transgener Pflanzen

Die PCR wurde jeweils in 25 µL Volumen in 0,2 mL Reaktionsgefäßen (Sarstedt) in einem Biometra T3 Thermocycler durchgeführt, die Menge der eingesetzten Reagenzien in einer Standardreaktion sowie Amplifikationsbedingungen sind den zwei folgenden Tabellen (2.28 und 2.29) zu entnehmen. Die Zusammensetzung des 10 × Williams-Puffers ist Tabelle 2.30, die Primersequenzen und Annealingtemperaturen sind der Tabelle 2.13 zu entnehmen.

Tabelle 2.28: Standardreaktionsansatz für PCR

Reagenzien	Volumen pro Ansatz [µL]
DNA (20 ng/µL)	1
10× Williams-Puffer	2,5
dNTP Mix (2mM)	2
Primer forward(100 pmol/µL)	0,1
Primer reverse(100 pmol/µL)	0,1
<i>Taq</i> -Polymerase, Axon (5U/µL)	0,2
H ₂ O	auf 25

Tabelle 2.29: PCR-Amplifikationbedingungen

	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	300	1
Denaturierung	94	90	40 x
Annealing	55-68*	90	
Elongation	72	90	
Elongation nach dem letztem Zyklus	72	300	1
Endtemperatur	22	unbegrenzt	

*(siehe Tabelle 2.13)

Tabelle 2.30: Zusammensetzung 10× Williams-Puffer (WILLIAMS ET AL. 1990)

10× Williams-Puffer:

100 mM Tris-HCl, pH 8,3
 500 mM KCl
 20 mM MgCl₂
 0,01 % Gelatine

2.21 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Die Transkription des *smRS-GFP*-Gens in transgenen Pflanzen wurde mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen. Hierzu wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.17.3) und zuerst mit DNaseI behandelt, um eventuelle DNA-Verunreinigungen zu entfernen. 3 µg RNA wurden mit 0,25 U DNaseI (Fermentas), entsprechendem DNaseI-Puffer und 20 U RiboLock™ (Fermentas) in einem Ansatz von 20 µL für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Deaktivierung der DNaseI wurde 1 µL 25 mM EDTA hinzugefügt und weitere 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach der DNaseI-Behandlung wurde eine Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) (T3 Thermocycler, Bometra) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mittels OneStep RT-PCR hierbei findet direkt nach der reversen Transkription die spezifische Amplifikation statt, so dass die vollständige Reaktion in einem Ansatz erfolgt. Die Amplifikation wurde mit 1 ng RNA pro PCR-Reaktion unter den in Tabelle 2.31 und 2.32 aufgelisteten Bedingungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte visuell per Agarosegelelektrophorese (siehe 2.11).

Tabelle 2.31: Standardreaktionsansatz für RT-PCR

Reagenzien	Volumen pro Ansatz [μL]
RNA (500 $\text{pg}/\mu\text{L}$)	2
10x Williams-Puffer	2
MgCl_2 (25 mM)	1
dNTP Mix (2 mM)	1,5
Primer forward (2,5 μM)	2
Primer reverse (2,5 μM)	2
<i>M-MLV</i> RT-Polymerase (200 U/ μL)	0,1
HotStar <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μL)	0,2
DEPC H_2O	auf 20

Tabelle 2.32: OneStep RT-PCR-Amplifikationsbedingungen am Beispiel des Primers GFP neu

	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription	50	30 min	1
Initialer PCR-Aktivierungsschritt	95	10 min	1
Denaturierung	94	30 sec	35 x
Annealing	55	90 sec	
Elongation	72	120 sec	
Entemperatur	4	unbegrenzt	

2.22 Southern Hybridisierung

Zum Nachweis der Anzahl integrierter Transgene ins Pflanzengenom wurde die Methode der Southern Hybridisierung (SOUTHERN 1975) verwendet.

Restriktionsverdau von Pflanzen-DNA, Gelelektrophorese

10 μg Gesamt-DNA wurden mit 30 Units (U) des Restriktionsenzym *Hind*III (Fermentas) (3 U/ μg DNA) und Zugabe des entsprechenden Puffers über Nacht bei 37 $^{\circ}\text{C}$ in einem Reaktionsvolumen von 30 μL restringiert. Nach Zugabe von 3 μL Ladepuffer (Bromphenolblau, siehe Tabelle 2.33) wurde die DNA in einem 0,8 %igem (w/v) Agarosegel (mit 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Ethidiumbromid) elektrophoretisch in 1x TAE-Puffer bei 2 V/cm Gellänge für 14 bis 16 Stunden aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 0,03 μg des DIG-markierten DNA Molecular Weight Markers III (Roche) mit Ladepuffer versetzt und mit aufgetragen.

Tabelle 2.33: Zusammensetzung Bromphenolblau-Ladepuffer**Bromphenolblau-Ladepuffer:**

30 % (v/v) Glycerin
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
 mit H₂O_{dest.} auffüllen

Depurination, Denaturation, Neutralisierung

Zunächst wurde das Gel für 10 Minuten in 100 mL 0,25 M HCl (Depurinierungslösung) bei Raumtemperatur auf einem Taumelwipptisch (Labnet International, Inc. Rocker 25) depuriniert, darauf folgte die Denaturierung in 100 mL 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl (Denaturierungslösung) für zweimal 15 Minuten und anschließend die Neutralisierung für zweimal 15 Minuten in 100 mL 0,5 M Tris-HCl (pH-Wert 7,5) 1,5 M NaCl (Neutralisierungslösung). Das Gel wurde hiernach gleichmäßig mit 100 mL 20× SSC (siehe Tabelle 2.34) für zehn Minuten bedeckt.

Tabelle 2.34: Zusammensetzung 20× SSC**20× SSC:**

3 M NaCl
 0,3 M Na-citrat
 pH-Wert 7,5

10× SSC, 2× SSC sowie 0,5× SSC wurden durch entsprechende Verdünnungen aus 20× SSC hergestellt

Blotting

Die Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran Hybond™-N⁺ (Fa. Amersham) wurde mit einem Vakuumblotter (Bio Rad, Modell 785) durchgeführt. Hierfür wurde das Agarosegel auf eine zugeschnittene Nylonmembran gelegt und mit 10× SSC bei 5 in Hg für 90 Minuten geblottet.

UV-Crosslinking

Die Nylonmembran wurde mit der dem Agarosegel zugewandten Seite auf 10× SSC getränktes Filterpapier (3MM, Fa. Whatman Laboratory) gelegt und für drei Minuten auf einem Transilluminator mit UV-Licht (302 nm) belichtet, anschließend mit H₂O_{dest.} gespült und zwischen zwei Lagen Filterpapier (3MM, Whatman) getrocknet werden. Die Membran konnte danach bis zur Hybridisierung bei 4 °C gelagert oder weiterverwendet werden.

DIG-Markierung von DNA

Die Herstellung DIG-markierter Sonden für das *smRS-GFP*-Gen erfolgte mittels PCR mit den in Tabelle 2.35 aufgelisteten Reagenzien und unter den in Tabelle 2.36 aufgelisteten PCR-Bedingungen.

Tabelle 2.35: Reaktionsansatz DIG-Markierung DNA

Reagenzien	Sonde [μL]	Kontrolle [μL]
Plasmid-DNA (50 ng/ μL)	1	1
10x Williams-Puffer	3	3
dNTP Mix (2mM)	-	3
Primer 1 (100 pmol/ μL)	0,1	0,1
Primer 2 (100 pmol/ μL)	0,1	0,1
Taq-Polymerase (Axon, 5U/ μL)	0,2	0,2
10x DIG DNA labelling Mix (Roche)	1,5	-
H ₂ O _{dest.}	auf 30	auf 30

Tabelle 2.36: PCR-Bedingungen für die Herstellung von DIG-markierten Sonden

	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (s)	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	120	1
Denaturierung	94	30	40 x
Annealing	55-68*	60	
Elongation	72	120	
Elongation nach dem letztem Zyklus	72	300	1
Endtemperatur	22	unbegrenzt	

*siehe Tabelle 2.13

Zur Überprüfung der PCR wurden jeweils 5 μL der PCR-Produkte nach Zugabe von 2 μL OrangeG-Ladepuffer auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die DIG-markierte Probe lief im Vergleich zur Kontrolle langsamer, erschien deshalb ca. 100 bp größer und ließ sich im Agarosegel von der Kontrolle differenzieren.

Prähybridisierung, Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst mit 15 mL vorgewärmter Hybridisierungslösung (DIG-EASY HYB, Roche) für 30 Minuten bei 42 $^{\circ}\text{C}$ im Hybridisierungsofen (Labnet ProBlot, Hybridisierungsofen) in 250 mL Hybridisierungsröhren prähybridisiert. Danach wurde die DIG-markierte DNA für zehn Minuten bei 95 $^{\circ}\text{C}$ denaturiert, sofort auf Eis gekühlt und auf 7,5 mL vorgewärmte Hybridisierungslösung gegeben. Die

Prähybridisierungslösung wurde daraufhin durch die Hybridisierungslösung ersetzt und die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C über Nacht im Hybridisierungssofen.

Die Membran wurde zur Entfernung nicht hybridisierter Sonden-DNA gewaschen

- Zweimal 5 min, in 250 mL Low Stringency Puffer (2× SSC; 0,1 % SDS), bei Raumtemperatur
- Zweimal 15 min, in 250 mL High Stringency Puffer (0,5× SSC; 0,1 % SDS), bei 60 °C, im Hybridisierungssofen

Antikörperbindung

Nach Abschluss der Waschschrte wurde die Membran in Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH-Wert 7,5) equilibriert,

- 1 min, in 80 mL Washing Puffer (250 mL Maleinsäurepuffer; 0,75 mL Tween20)
- 30 min, in 200 mL 1× Blockinglösung (225 mL Maleinsäurepuffer; 25 mL 10× Blockinglösung (Roche))
- 30 min, Antikörperlösung (2,5 µL Anti-DIG-AP; 50 mL 1× Blockinglösung)
- Zweimal 15 min, in 80 mL Washing Puffer (250 mL Maleinsäurepuffer, 0,75 mL Tween20)

Detektion

Die DNA wurde folgendermaßen detektiert:

- Equilibrieren der Membran in 50 mL Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl pH-Wert 9,5; 0,1 M NaCl), 2 min
- 30 µL CDP-*Star* (Roche) in 1470 µL Substrate Dilution Puffer (100 mM Diethanolamine, pH-Wert 9,5; 1 mM MgCl₂)
- Auftropfen der CDP-*Star*-Lösung auf eine Plastikfolie
- Überführen der Membran auf die Tropfen
- Verteilung der Flüssigkeit auf der Membran, 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- verschließen mit einer zweiten Plastikfolie und vorherigen Entfernen von Luftblasen und überschüssiger Flüssigkeit
- Exposition der in Plastikfolie befindlichen Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm™, Amersham Biosciences) für 30 bis 60 min.

Die Röntgenfilme wurden anschließend in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert. Hierfür wurden die Filme in Entwicklerlösung (440 mL Entwickler (Fa. Tetanal) + 1560 mL H₂O_{dest.}) gelegt und anschließend für ca. 5 min fixiert (400 mL Fixierer (Fa. Tetanal) + 1600 mL H₂O_{dest.}). Noch anhaftender Fixierer wurde mit H₂O_{dest.} abgespült und die Filme in einem Heißluftschrank getrocknet.

Stripping

Wenn die Membran erneut zur Hybridisierung verwendet werden sollte, wurde die Sonde durch folgende Waschschriffe entfernt:

- Waschen der Membran mit H₂O_{dest.}, 1 min
- Zweimal Waschen der Membran in Stripping-Puffer (0,2 M NaOH, 0,1 % SDS), 20 min, bei 37 °C
- Spülen der Membran in 2× SSC, 5 min
- Lufttrocknen der Membran und Weiterverwenden oder Lagerung zwischen zwei Whatman 3MM Filterpapieren in Aluminiumfolie bei 4 °C

2.23 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde ein generalisiertes lineares Modell unter Verwendung des Programms R angepasst. Im Versuch zum Einfluss des *A. tumefaciens*-Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin wurde ein logistisches Modell unter Annahme von Binomialverteilung für regenerierte Sprosse verwendet. In Versuchen zur Ermittlung der Selektionsbedingungen wurden log-lineare Modelle unter Annahme von Poissonverteilung für die Anzahl der Sprosse je Explantat angepasst. Mögliche Variabilität zwischen einzelnen Versuchseinheiten wurde bei der Modellierung berücksichtigt. Vergleiche zwischen den Behandlungen zur Kontrolle erfolgten über einseitige 95 % profile-likelihood Konfidenzintervalle für die Odds-Ratio (Proportionen) oder Ratio (Zählraten). Zur Einhaltung des globalen Fehler-Niveaus wurde das Bonferroni-Verfahren (α /Anzahl der Vergleiche) angewandt.

Die Anzahl und Struktur der Daten ließen zum Teil aber auch keine schließende Statistik zu, weshalb lediglich deskriptive Statistik verwendet wurde. Die im Ergebnisteil gezeigten Grafiken wurden unter Verwendung des Programms Microsoft Office Excel 2003 erstellt und stellen Mittelwerte der Wiederholungen unter Angabe der Standardabweichungen dar.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur transienten GFP-Expression

Auf Basis einer transienten Genexpression wurde die Funktion verschiedener GFP-Versionen in drei Pflanzenarten getestet. Transiente Genexpression ist eine vorübergehende, nicht dauerhafte Expression eines Gens, die in diesem Fall dazu diente, die Funktionsfähigkeit und Nachweisbarkeit des Green Fluorescent Protein (GFP) in den drei Zierpflanzen *Petunia* Cultivars, *Pelargonium* und *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) zu testen.

Dazu sollte die Expression von zwei GFP-Varianten, des *mGFP4* (HASELOFF ET AL. 1997) und des *smRS-GFP* (DAVIS UND VIERSTRA 1998) in den ausgewählten Pflanzen verglichen werden. Ziel war es, die Eignung des *GFP* als Reporter gen in Transformationsversuchen zu zeigen und die Möglichkeit der Verwendung als Reporter gen in stabilen Transformationsversuchen zu bewerten.

3.1.1 *Petunia* Cultivars

Bei *Petunia* variierte die Intensität und Häufigkeit einer GFP-Expression stark von Genotyp zu Genotyp. Der Petunien Genotyp 'Famous Electric Purple' zeigte sehr leicht zu detektierende, intensive Fluoreszenz, sowohl bei *smRS-GFP* (siehe Abbildung 3.1) als auch bei *mGFP4*. Diese zu beobachtende Intensität der Fluoreszenz war höher als in anderen Genotypen. Bei Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' konnten nur vereinzelt fluoreszierende Epidermiszellen des *smRS-GFP* beobachtet werden, diese aber mit hoher Intensität.

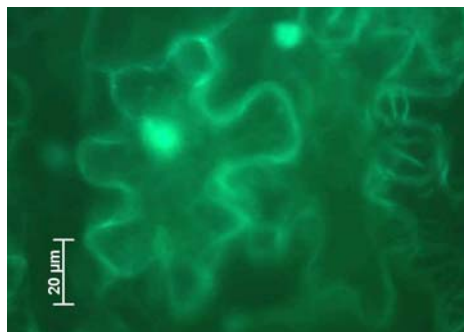


Abbildung 3.1: Transiente *smRS-GFP*-Expression von Epidermiszellen in *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' (40x Vergrößerung)

Die zu beobachtende Fluoreszenz bei den Genotypen 'Famous Violet Dark Eye' und 'Famous Cerise Pearl' zeigte bei Verwendung von *smRS-GFP* im Vergleich zum Genotyp 'Famous Electric Purple' eine geringere Anzahl fluoreszierender Epidermiszellen, diese aber mit hoher Intensität.

mGFP4-Fluoreszenz konnte bei 'Famous Violet Dark Eye', 'Famous Lilac Dark Vein' und 'Famous Cerise Pearl' ebenfalls in vergleichbaren Mengen wie für *smRS-GFP* nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte *smRS-GFP*- und *mGFP4*-Fluoreszenz in allen vier *Petunia* Genotypen nachgewiesen werden, aber in unterschiedlicher Qualität und Quantität.

Vorteilhaft bei der Verwendung von *smRS-GFP* war die einfache Unterscheidung zwischen spezifischer GFP-Fluoreszenz und Autofluoreszenz des Chlorophylls, durch die Benutzung der *mGFP4*-Filterkombination. Das *smRS-GFP* (soluble-modified-red shifted GFP) besitzt den Vorteil, dass es ein verändertes Emissionsspektrum besitzt und somit gut von der Autofluoreszenz des Chlorophylls zu trennen ist. Allein durch die Wahl des geeigneten Filtersystems bei der mikroskopischen Beobachtung kann eine störende Autofluoreszenz eliminiert werden. Oder in diesem Fall durch Nutzung des Filtersatzes von *mGFP4* als Kontrolle für *smRS-GFP*-Expression. *smRS-GFP*-fluoreszierende Zellen wurden unter Verwendung des Filtersatzes von *mGFP4* nicht angeregt und emittierten keine spezifische *mGFP4*-Fluoreszenz. Zeigte sich weiterhin emittiertes Fluoreszenzlicht, so handelte es sich um Autofluoreszenz.

3.1.2 *Pelargonium*

Die beiden *Pelargonium zonale* Genotypen exprimierten sehr gut *mGFP4* und *smRS-GFP* in Epidermiszellen.

In der *Pelargonium peltatum* 'Royal Blue' konnte *mGFP4* Fluoreszenz nachgewiesen werden, *smRS-GFP* Fluoreszenz war nicht detektierbar.

3.1.3 *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.)

In *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) konnte die Expression von *smRS-GFP* und *mGFP4* in den Genotypen 'CP Red', 'CP White' und 'CP Violet' nachgewiesen werden. Die Anzahl an Zellen mit Fluoreszenz war in den drei Genotypen sehr gering,

die Intensität der auftretenden Expression von *smRS-GFP* war ausreichend hoch (siehe Abbildung 3.2).

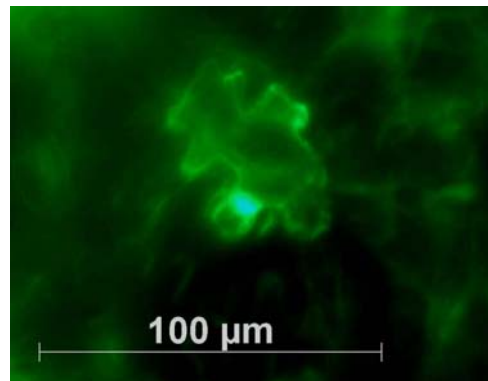


Abbildung 3.2: Transiente *smRS-GFP*-Expression in *Impatiens* Genotyp 'CP White'

In den beschriebenen Versuchen konnte anhand eines transienten Assays gezeigt werden, dass GFP in allen drei Pflanzenarten zu einem detektierbaren Fluoreszenzsignal führte und sich als Reporter gen für Transformationsversuche eignet.

Die verwendeten GFP-Varianten, *smRS-GFP* und *mGFP4*, zeigten ihre Eignung als Reporter gen in *Petunia*, *Pelargonium* und *Impatiens*. *smRS-GFP* führte stets zu einer intensiveren Fluoreszenz, die durch aufeinanderfolgende Betrachtung mit den Filtersätzen zweifelsfrei detektierbar war und wurde für die Verwendung als Reporter gen in stabilen Transformationen weiterverwendet.

3.2 Klonierung zur Erstellung neuer Vektoren

Basierend auf den Ergebnissen der transienten Genexpression sollte das *smRS-GFP* als in die Vektoren pGreenII0229 und pMen65 kloniert werden.

3.2.1 Klonierung des Vektors pGreenII0229smRS-GFP

Bei der Klonierung zur Erstellung des Vektors pGreenII0229smRS-GFP (siehe 2.18) wurden aus dem Vektor pGreenII0029smRS-GFP, der CaMV 35S-Promotor und das *smRS-GFP*-Gen in den Vektor pGreenII0229 kloniert. Die isolierte Plasmid-DNA (siehe 2.17.1) von pGreenII0029smRS-GFP und pGreenII0229 wurde jeweils mit den Restriktions-endonukleasen *HindIII* und *EcoRI* restringiert und nach Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen zur Ligation mit anschließender Transformation in

E. coli verwendet. Der resultierende Vektor pGreenII0229smRS-GFP wurde im Anschluss zur Kontrolle mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *ApaLI* in R-Puffer restringiert. Abbildung 3.3 zeigt eine schematische Darstellung der erstellten T-DNA des Vektors pGreenII0229smRS-GFP.

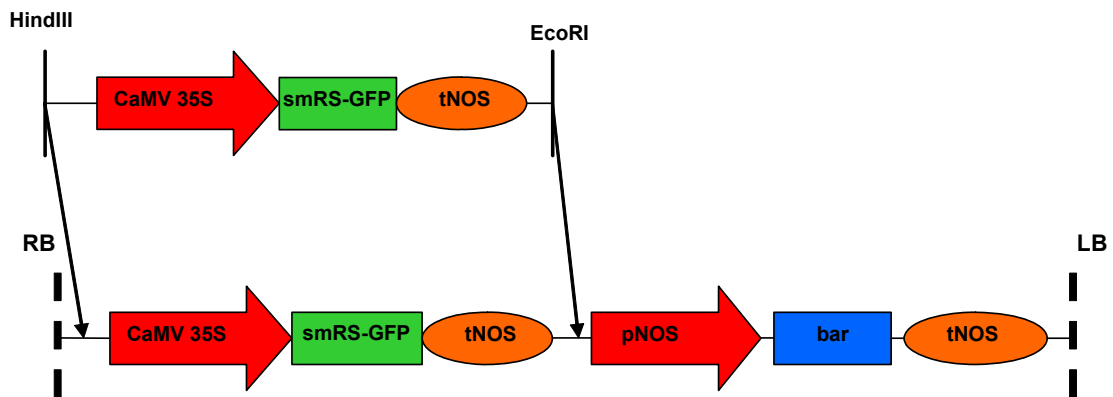


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Erstellung der T-DNA von pGreenII0229smRS-GFP

Der obere Teil der Abbildung stellt das smRS-GFP Gen mit Promotor aus pGreenII0029 dar, der untere Teil der Abbildung stellt die T-DNA des neu erstellten Vektors pGreenII0229smRS-GFP dar. Rote Pfeile symbolisieren Promotoren, grüne bzw. blaue Rechtecke kodierende Bereiche, orangefarbene Ellipsen Terminatoren, LB/RB: linke/rechte Bordersequenz

3.2.2 Klonierung des Vektors pMen65smRS-GFP

Zur Klonierung (siehe 2.18) des Vektors pMen65smRS-GFP wurde aus pGreenII0029smRS-GFP, das *smRS-GFP*-Gen in den Vektor pMen65 eingebracht. Die isolierte Plasmid-DNA (siehe 2.17.1) wurde jeweils mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI und entsprechendem 10× Puffer *Bam*HI behandelt und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurden überstehende 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um bei einer ungerichteten Klonierung das Religieren des linearisierten Vektors ohne Insert zu verhindern. Auf die Dephosphorylierung folgte die Ligation von Vektor und Insert mit anschließender Transformation in *E. coli* und anschließender Kontrollrestriktion mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und entsprechendem Restriktionspuffer Tango™. Abbildung 3.4 stellt die T-DNA des Vektors pMen65smRS-GFP schematisch dar.

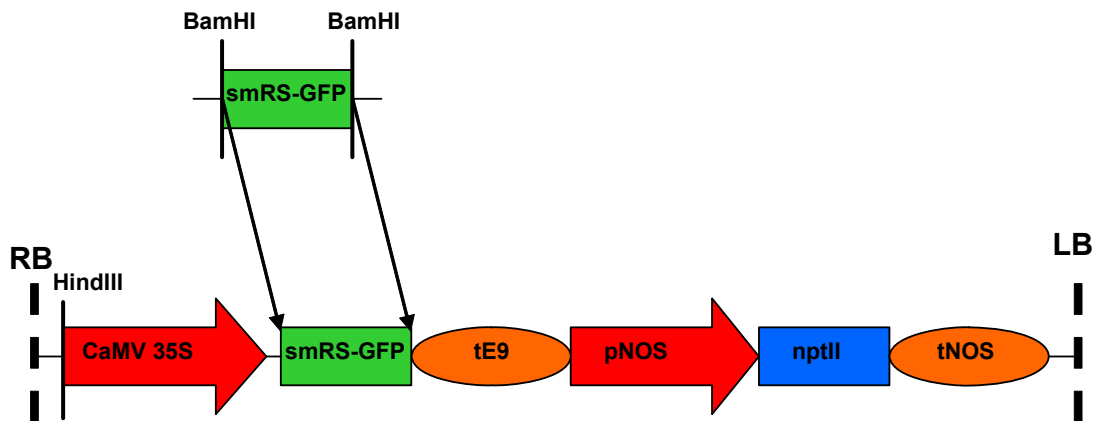


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Erstellung des Vektors pMen65smRS-GFP

Der obere Teil der Abbildung stellt das *smRS-GFP* aus pGreenII0029smRS-GFP dar, der untere Teil der Abbildung stellt die T-DNA des neu erstellten Vektors pGreenII0229smRS-GFP dar.

Rote Pfeile symbolisieren Promotoren, grüne bzw. blaue Rechtecke kodierende Bereiche, orangefarbene Ellipsen Terminatoren, LB/RB: linke/rechte Bordersequenz

3.3 A. *tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Petunia* Cultivars

Zur *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation von Petunien wurde die „Leaf-Disc-Methode“ nach HORSCH ET AL. (1985) verwendet.

3.3.1 Ermittlung geeigneter Selektionsbedingungen

Um eine effektive Selektion transgener Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung von nicht-transgenen Zellen zu gewährleisten, bedarf es der Ermittlung einer geeigneten Konzentration des Selektionsagens. Die geeignete Konzentration von Antibiotika- bzw. Herbizidselektionsagens ist die Konzentration, bei der die Regeneration nicht transformierter Zellen unterdrückt und die Regeneration der transformierten Zellen gegeben ist.

3.3.1.1 Phosphinothricin (PPT)-Selektion

Die Selektion mit Phosphinothricin (PPT) wurde bei Transformationsversuchen mit dem Vektor pGreenII0229 durchgeführt.

Zunächst wurden die kritischen Konzentrationen des Selektionsagens PPT ermittelt, die zur effektiven Hemmung nicht transgener Zellen notwendig sind. Zur Ermittlung geeigneter Selektionsbedingungen wurden Blattextplantate von *Petunia* Cultivars PPT-

Konzentrationen in Höhe von 0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, und 3,0 mg/L ausgesetzt und nach drei Wochen bonitiert. Bei Applizierung von verschiedenen Konzentrationen zur Selektion im Regenerationsmedium zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den vier verwendeten Genotypen im Regenerationsverhalten und in der Phosphinothricinsensitivität (Abb. 3.5).

In der Kontrolle (0 mg/L PPT) war für 'Famous Electric Purple' eine Sprossregeneration von 100 %, für 'Famous Lilac Dark Vein' von 78 %, für 'Famous Violet Dark Eye' 38 % und für 'Famous Cerise Pearl' von 13 % zu beobachten. Während bei Konzentrationen von 0,5 mg/L PPT 'Famous Electric Purple' und 'Famous Lilac Dark Vein' noch eine Sprossregeneration von über 22 % und 35 % zeigten, wirkte sich diese Konzentration bereits schädigend auf 'Famous Violet Dark Eye' (7 %) und 'Famous Cerise Pearl' (0 %) aus. Bei der Verwendung von 1 mg/L PPT konnte in allen vier Genotypen keine Sprossregeneration festgestellt werden (siehe Abbildung 3.5).

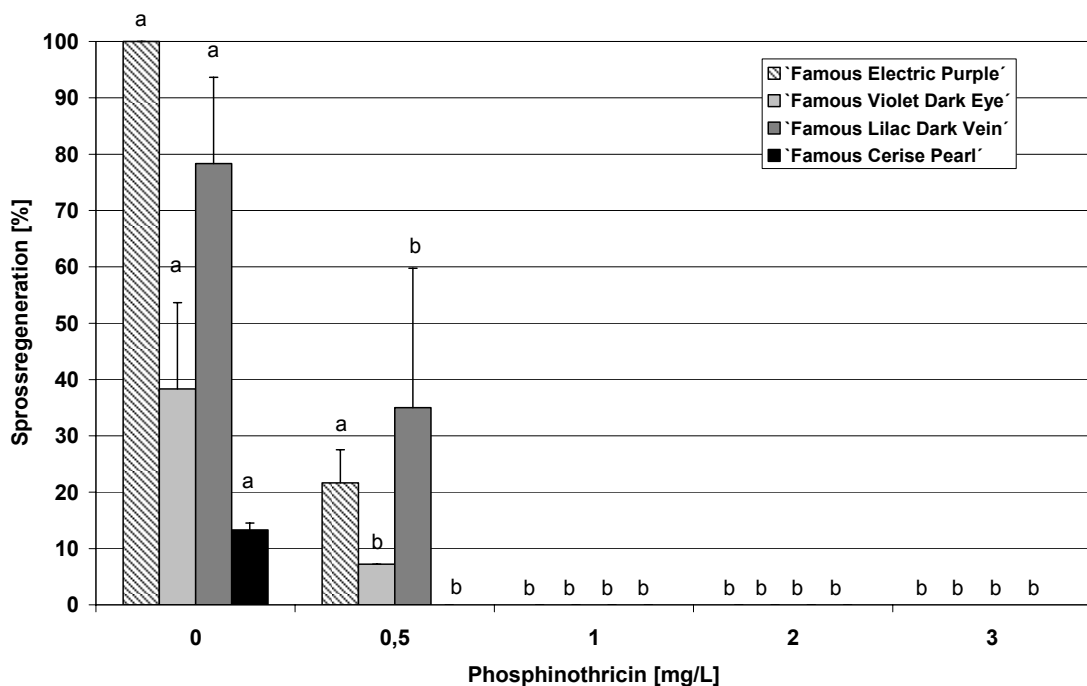


Abbildung 3.5: Wirkung von Phosphinothricin (PPT) auf die Sprossregeneration nach drei Wochen bei vier *Petunia* Genotypen

Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit jeweils 50 Explantaten

Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant über einseitig getestete 95 % profile-likelihood Konfidenzintervalle für die Odds-Ratio von der Kontrollbehandlung. Zur Einhaltung des globalen Fehler-Niveaus wurde das Bonferroni-Verfahren angewandt.

Die Abbildungen 3.6 und 3.7 visualisieren den Effekt steigender Konzentrationen von PPT auf die Sprossregeneration von nicht-transformierten Blattexplantaten bei *Petunia*. In den Kontrollvarianten kam es in den vier Genotypen bereits zu einer stark unterschiedlich ausgeprägten Sprossregeneration. Die Genotypen 'Famous Electric Purple' und 'Famous Lilac Dark Vein' zeichneten sich im Gegensatz zu 'Famous Lilac Dark Eye' und 'Famous Cerise Pearl' durch Sprossregeneration aus.

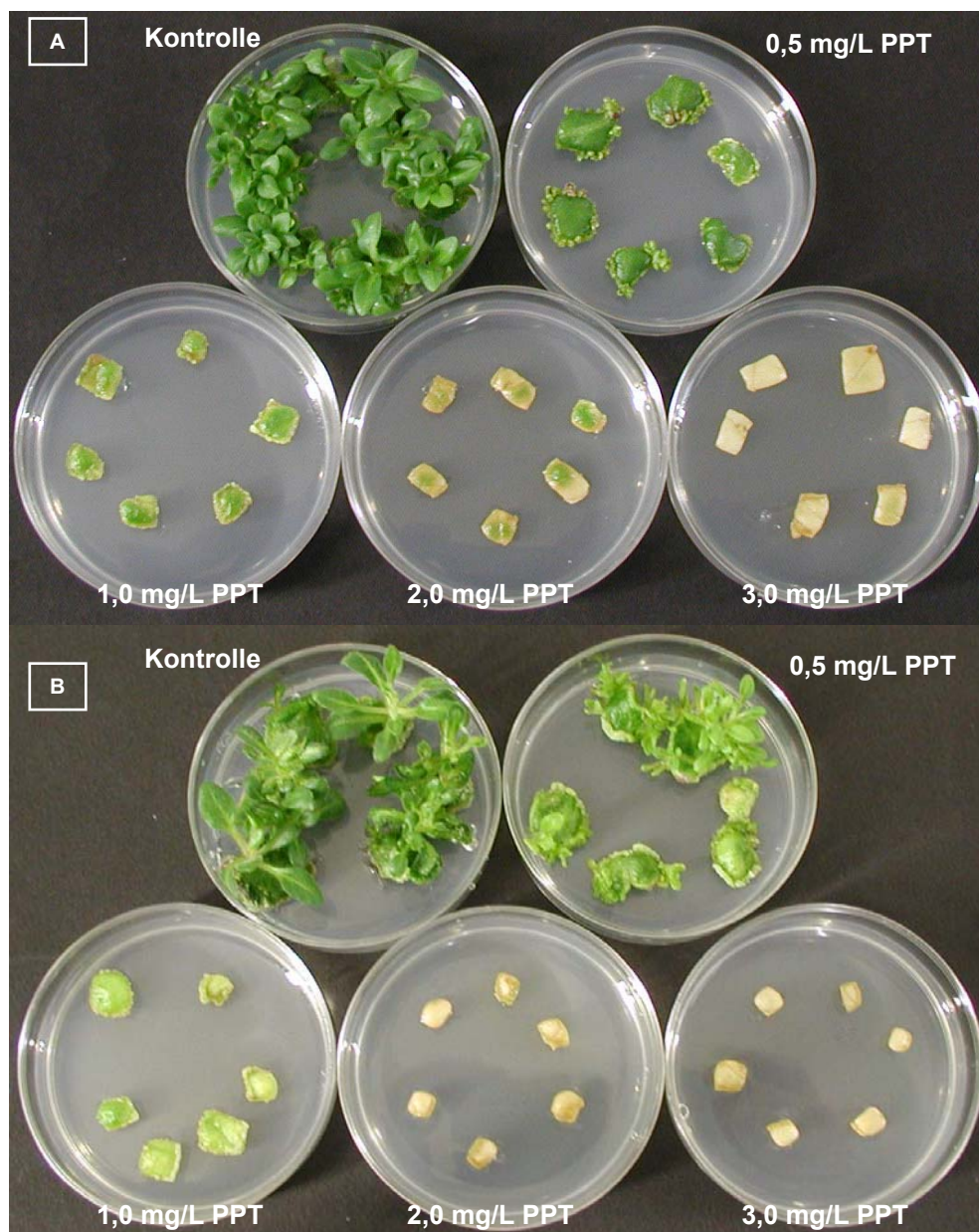


Abbildung 3.6: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) auf die Regeneration von nicht-transformierten Blattexplantaten bei *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' (A) und 'Famous Lilac Dark Vein' (B) in 6 cm Petrischalen nach dreiwöchiger Kultur

Ansteigende Konzentrationen von PPT standen deutlich mit einer zunehmenden Nekrotisierung der Blattexplantate in Verbindung. Während die Genotypen 'Famous Electric Purple' und 'Famous Lilac Dark Vein' bei einer Konzentration von 0,5 mg/L PPT noch eine Vielzahl an Sprossregeneration oder Sprossanlagen zeigten (Abb. 3.6), kam es im Genotyp 'Famous Violet Dark Eye' nur vereinzelt zu Sprossbildung und Kallusbildung (Abb. 3.7). Der Genotyp 'Famous Cerise Pearl' regenerierte keinerlei Sprosse in der Kontrollvariante und zeigte bereits bei einer Konzentration von 0,5 mg/L eine hohe Sensitivität gegenüber Phosphinothricin.



Abbildung 3.7: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) auf die Regeneration von nicht-transformierten Blattexplantaten bei *Petunia* Cultivars und 'Famous Violet Dark Eye' (A) 'Famous Cerise Pearl' (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für die Genotypen 'Famous Electric Purple' und 'Famous Lilac Dark Vein' eine Konzentration von 1,0 mg/L Phosphinothricin als ausreichend ermittelt (Abbildung 3.6), während für 'Famous Violet Dark Eye' und 'Famous Cerise Pearl' bereits eine Konzentration von 0,5 mg/L zur Selektion genügend war (siehe Abbildung 3.7).

3.3.1.2 Kanamycin-Selektion

Selektion mit Kanamycin wurde bei Transformationsversuchen mit dem Vektor pMen65 durchgeführt. Erste Versuche hatten die Ermittlung der geeigneten Kanamycinkonzentration zur Selektion bei Blattexplantaten von *Petunia* Cultivars zum Ziel. Kanamycin wurde in Höhe von 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 300 mg/L und 500 mg/L dem Regenerationsmedium hinzugefügt, die Blattexplantate drei Wochen kultiviert und auf Sprossregeneration bonitiert.

Hierbei zeigte sich eine genotypisch unterschiedlich stark ausgeprägte Sensitivität gegenüber Kanamycin bei Konzentrationen von 50 mg/L und 100 mg/L (siehe Abbildung 3.8).

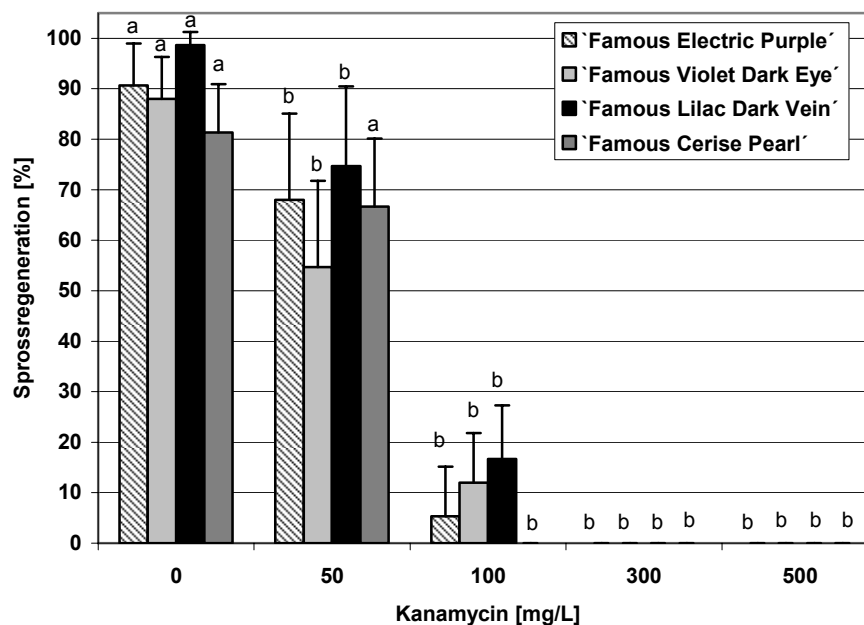


Abbildung 3.8: Wirkung von Kanamycin auf die Sprossregeneration von *Petunia* Genotypen nach drei Wochen

Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit jeweils 25 Explantaten

Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant über einseitig getestete 95 % profile-likelihood Konfidenzintervalle für die Odds-Ratio von der Kontrollbehandlung. Zur Einhaltung des globalen Fehler-Niveaus wurde das Bonferroni-Verfahren angewandt.

In der Kontrollvariante (0 mg/L) wiesen alle vier Genotypen vergleichbar gute Sprossregenerationsraten zwischen 81 % und 99 % auf. Bei einer Konzentration von 50 mg/L Kanamycin regenerierten weniger Sprosse als in der Kontrolle (0 mg/L), bei 'Famous Lilac Dark Vein' regenerierten 75 % der Blattexplantate, bei 'Famous Lilac Dark Eye' 55 %, bei 'Famous Electric Purple' 68 % und bei 'Famous Cerise Pearl' 67 %. Ab einer Konzentration von 100 mg/L Kanamycin zeigten die Genotypen 'Famous Lilac Dark Vein' (17 %) und 'Famous Electric Purple' (5 %) und 'Famous Violet Dark Eye' (12 %) eine stärkere Hemmung der Sprossregeneration, im Genotyp 'Famous Cerise Pearl' kam es zu keiner Sprossregeneration. Bei Verwendung von 300 mg/L und 500 mg/L kam es in keinem der verwendeten Genotypen mehr zu Sprossregeneration am Explantat. Abbildung 3.9 stellt die genotypisch unterschiedliche Sensitivität auf Kanamycin anhand der Genotypen 'Famous Electric Purple' und 'Famous Cerise Pearl' dar. In der Kontrollvariante kam es bereits zu Unterschieden im Sprossregenerationsverhalten. 'Famous Electric Purple' ist ein Genotyp mit hoher Sprossregeneration im Gegensatz zu 'Famous Cerise Pearl'. Während es bei 'Famous Electric Purple' erst ab einer Konzentration von 300 mg/L Kanamycin zur Nekrotisierung der Explantate aufgrund von Kanamycin kam, trat dies bei 'Famous Cerise Pearl' bereits bei einer Konzentration von 100 mg/L auf.

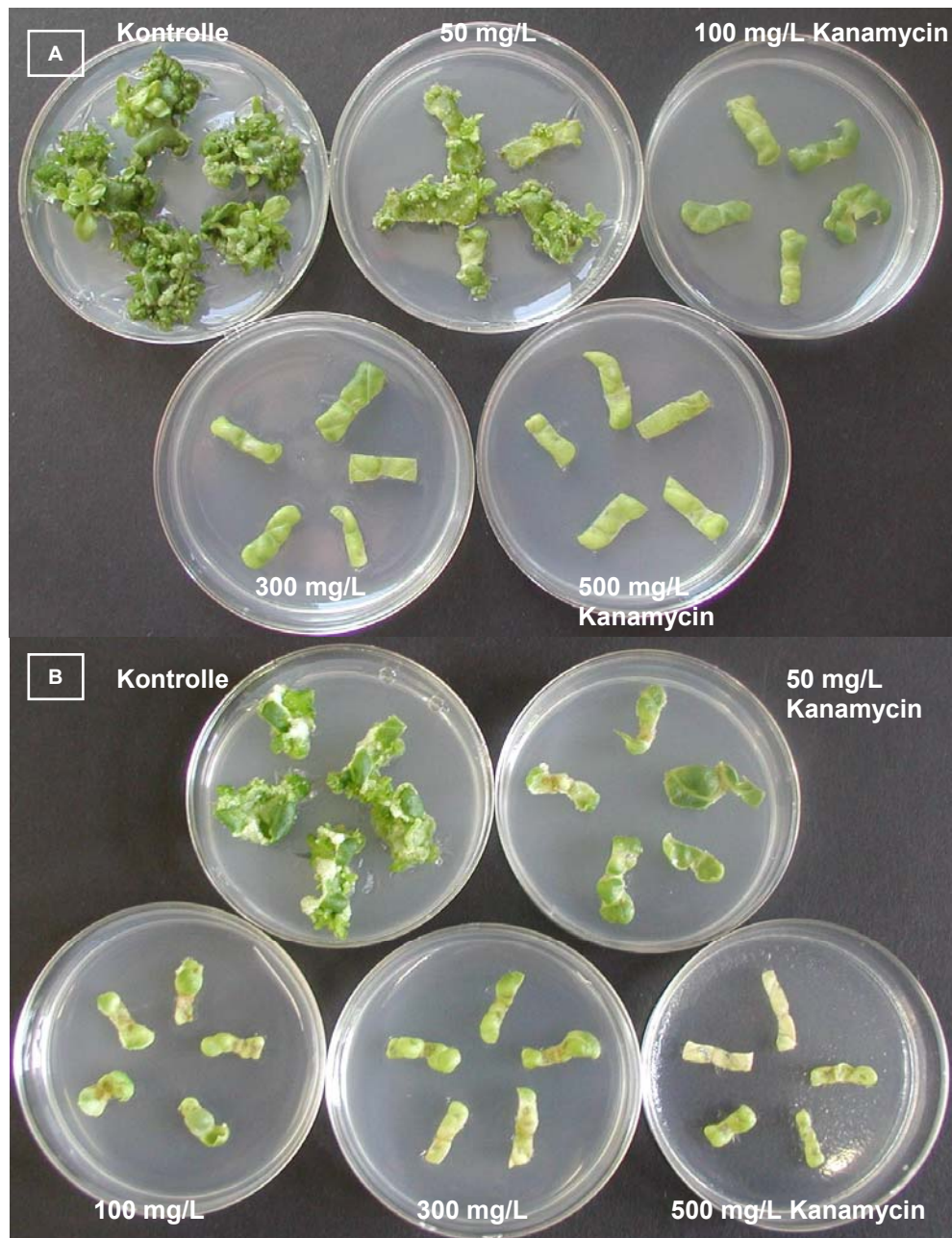


Abbildung 3.9: Effekt steigender Konzentrationen von Kanamycin auf die Regeneration von nicht-transformierten Blattexplantaten bei *Petunia* 'Famous Electric Purple' (A) 'Famous Cerise Pearl' (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen

In späteren Transformationsversuchen wurde für die Genotypen 'Famous Electric Purple', 'Famous Violet Dark Eye' und 'Famous Lilac Dark Vein' eine Konzentration von 100 mg/L Kanamycin im Regenerationsmedium zur Selektion verwendet. Bei 'Famous Cerise Pearl' wurde eine Konzentration von 50 mg/L Kanamycin eingesetzt.

3.3.2 Einfluss des *A. tumefaciens*-Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin

Erste Transformationsversuche mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP bei *Petunia* Cultivars führten zu starker Sprossregeneration, unter denen jedoch keine transgenen Sprosse identifiziert werden konnten (siehe 3.3.3.1). Dies ließ Zweifel an der Selektionswirkung von PPT zu. Eine starke Sprossregeneration bei einer zuvor getesteten PPT-Konzentration von 1 mg/L war in Transformationsversuchen mit unterschiedlichen *A. tumefaciens*-Stämmen zu beobachten. Daher wurde der Effekt verschiedener *A. tumefaciens*-Stämme auf die Selektionswirkung des herbiziden Wirkstoffs Phosphinothricin und die Sprossregeneration von Blattexplantaten bei *Petunia* Cultivars ‚Famous Electric Purple‘ in den nachfolgend beschriebenen Versuchen untersucht.

Ausgewählte *A. tumefaciens*-Stämme zur Versuchsdurchführung waren LBA4404, GV2260, GV3101 und EHA105. Alle Bakterienstämme beinhalteten das binäre Vektorsystem pGreenII0229 mit *bar*-Gen und *smRS-GFP* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promoters. Phosphinothricin wurde in einer zuvor für Petunien als letal getesteten Dosis von 3 mg/L angewendet (siehe 3.3.1.1).

Die Versuchsreihe umfasste drei Versuche. Der erste Versuch untersuchte die Wirkung von Phosphinothricin und verschiedenen *Agrobacterium*-Stämmen während Übernachtskultur (ÜNK) auf die Sprossregeneration. Versuch 2 hatte zum Ziel den Effekt einer Phosphinothricingabe nach Übernachtskultur von *Agrobacterium*-Stämmen auf die Sprossregeneration zu dokumentieren. Der dritte Versuch sollte alleinig den Effekt, den die *Agrobacterium*-Stämme gegebenenfalls durch Veränderung von Medienkomponenten ausüben, auf die Sprossregeneration dokumentieren. Der grundlegende Versuchsaufbau ist Kapitel 2.14 zu entnehmen.

Versuch 1: Effekt von Phosphinothricin und verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen während Übernachtskultur auf die Sprossregeneration

Versuch 1 ging von flüssigem Regenerationsmedium aus und beinhaltete folgende Varianten: Kontrolle 1 Medium ohne Zusätze, Kontrolle 2 Medium mit 3 mg/L Phosphinothricin und Varianten 1 bis 4 mit Phosphinothricin und verschiedenen *Agrobacterium*-Suspensionen (LBA4404, GV2260, GV3101 oder EHA105; $OD_{600} = 0,01$).

Hierbei zeigte die Kontrolle 1 ohne Zusätze im Medium eine mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendes Explantat von drei Sprossen (Abbildung 3.10). Die Kontrolle 2 mit Phosphinothricin (3 mg/L) zeigte keinerlei Regeneration. Die Varianten eins bis vier mit Phosphinothricinzusatz (3 mg/L) und den *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen GV3101 (7,8) und EHA105 (6,85) zeigten signifikant eine höhere mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendes Explantat als die Kontrolle 1 und 2. Bei der Inkubation mit LBA4404 und GV2260 konnte eine mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendes Explantat von 0,2 bzw. 0,7 beobachtet werden. Dieser Wert lag ebenfalls über dem der Kontrolle 2 Medium mit 3 mg/L PPT (siehe Abbildung 3.10 und 3.11). Die Sprossregeneration (%) lag in den Varianten eins bis vier bei 75 bis 100 %, im Vergleich zeigte Kontrolle 1 Medium ohne Zusätze 85 % und Kontrolle 2 Medium mit 3 mg/L PPT 0 % Sprossregeneration.

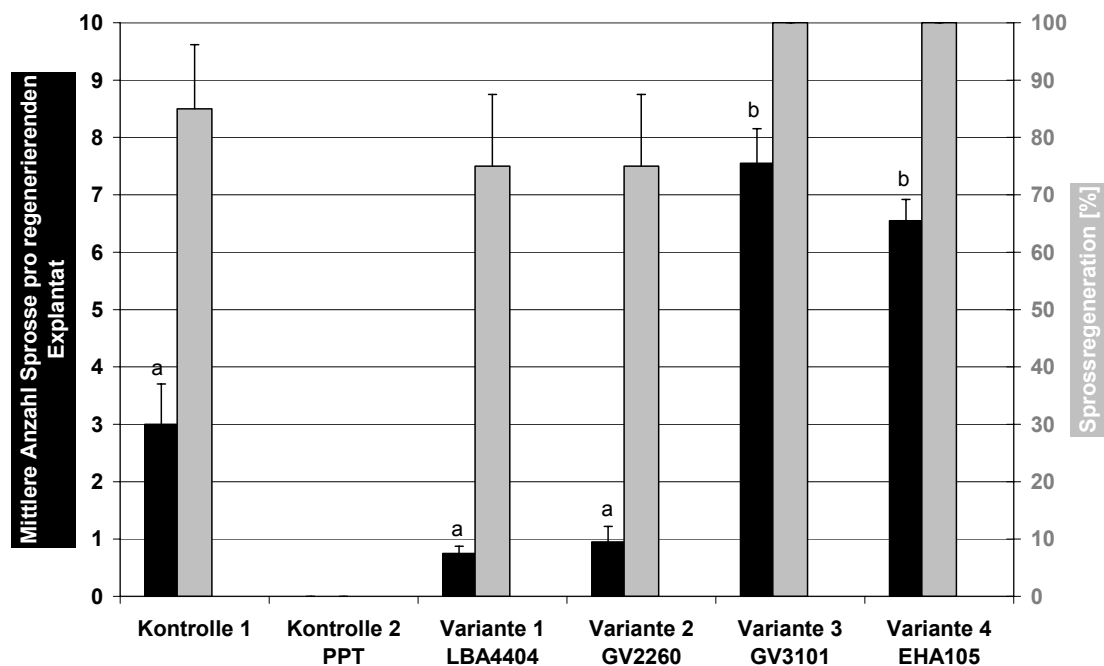


Abbildung 3.10: Effekt von Phosphinothricin (3 mg/L) und verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen nach Übernachtkultur auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat und Sprossregeneration von *Petunia Cultivars* 'Famous Electric Purple' nach drei Wochen (Versuch 1)

Werte über den Säulen: Sprossregenerationsrate in %, Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit jeweils 40 Explantaten

Kontrolle 1: Medium ohne Zusätze

Kontrolle 2: Medium mit 3 mg/L Phosphinothricin

Variante 1: Medium mit 3 mg/L Phosphinothricin + *Agrobacterium*-Stamm LBA4404

Variante 2: Medium mit 3 mg/L Phosphinothricin + *Agrobacterium*-Stamm GV2260

Variante 3: Medium mit 3 mg/L Phosphinothricin + *Agrobacterium*-Stamm GV3101

Variante 4: Medium mit 3 mg/L Phosphinothricin + *Agrobacterium*-Stamm EHA105

Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant über einseitig getestete 95 % profile-likelihood Konfidenzintervalle für die Odds-Ratio von der Kontrollbehandlung. Zur Einhaltung des globalen Fehler-Niveaus wurde das Bonferroni-Verfahren angewandt.

Abbildung 3.11 zeigt die gesteigerte Sprossregeneration in der Variante 3 und 4 mit Phosphinothricin während der Übernachtskultur. Die Varianten 1 und 2 waren im Vergleich zur Kontrolle 2 vitaler und zeigten Sprossanlagen.

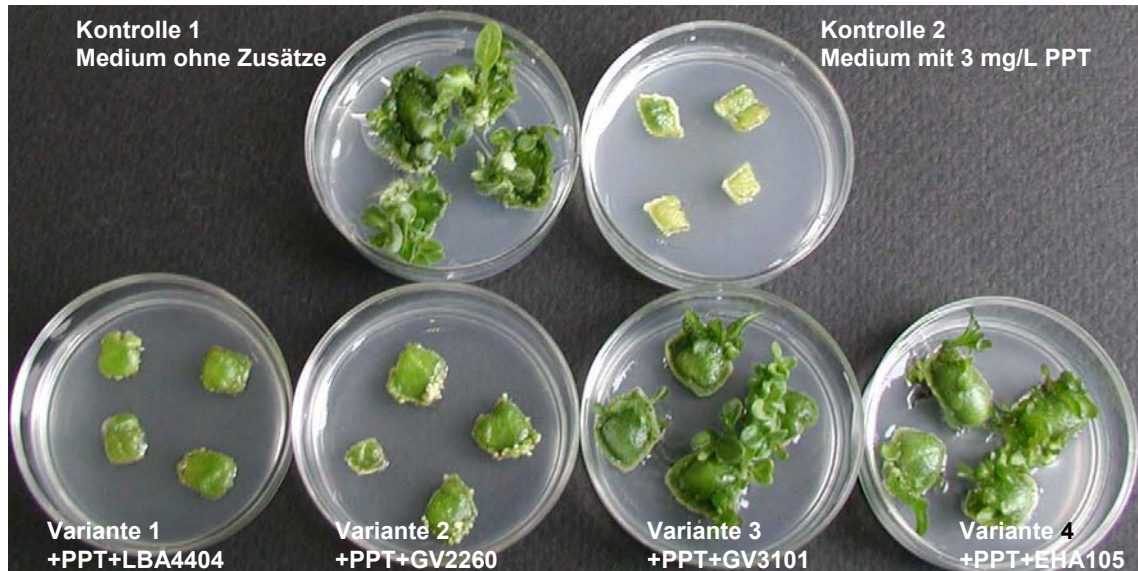


Abbildung 3.11: Effekt von Phosphinothricin (3 mg/L) während Übernachtskultur mit vier verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen auf die Sprossregeneration von *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' in 3,5 cm Petrischalen nach drei Wochen (Versuch 1)

Versuch 2: Effekt der Phosphinothricingabe nach Übernachtskultur mit verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen

In Versuch 2 wurden die *Agrobacterium*-Stämme in Regenerationsmedium ohne Phosphinothricin über Nacht kultiviert und erst nach der Übernachtskultur 3 mg/L Phosphinothricin dem Medium zugegeben.

Nach drei Wochen Kultur regenerierten an den Blattexplantaten der Kontrolle 1 drei Sprosse je Explantat, in der Kontrolle 2 Medium mit PPT nach der Übernachtskultur regenerierten keine Sprosse und in den Varianten mit Vorkultur mit den *A. tumefaciens*-Stämmen LBA4404 (Variante 1), GV2260 (Variante 2), GV3101 (Variante 3) und EHA105 (Variante 4) mit Zugabe von 3 mg/L PPT nach Übernachtskultur zeigte sich ebenfalls keinerlei Sprossregeneration (Abbildung 3.12).

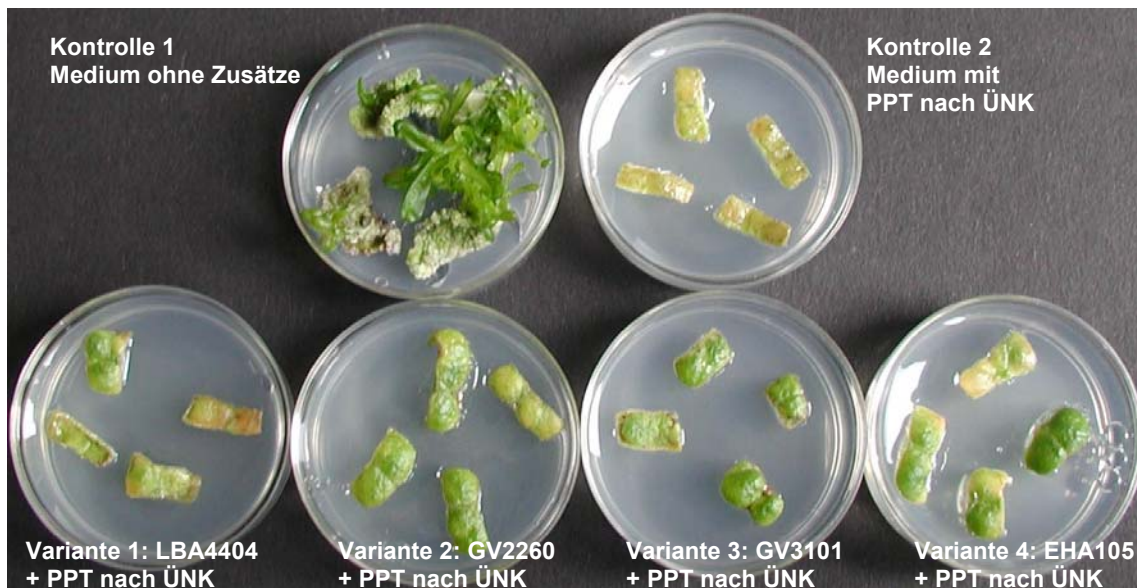


Abbildung 3.12:Wirkung der Phosphinothricingabe (3 mg/L zum Regenerationsmedium) nach Übernachtkultur (ÜNK) mit vier verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen bei *Petunia Cultivars* 'Famous Electric Purple' in 3,5 cm Petrischalen nach drei Wochen (Versuch 2)

In den Varianten eins bis vier kam es in diesem Versuch nicht zu Sprossregeneration, trotzdem sahen die Explantate in den vier Varianten vitaler und grüner aus als in der Kontrolle 2 Medium mit PPT.

Versuch 3: Effekt von unterschiedlichen *A. tumefaciens*-Stämmen auf die Sprossregeneration

Nachdem in Versuch 1 der Effekt von PPT in Kombination mit unterschiedlichen *Agrobacterium*-Stämmen untersucht und in Versuch 2 die Wirkung einer Applizierung von PPT nach Übernachtkultur der *Agrobacterium*-Stämme bestimmt wurde, sollte in Versuch 3 der alleinige Effekt unterschiedlicher *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme auf die Sprossregeneration untersucht werden.

In diesem Versuch zeigte die Kontrolle 1 eine mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendes Explantat von vier Sprossen nach drei Wochen (Abb. 3.13). In den Varianten eins bis vier mit dem *A. tumefaciens*-Stämmen LBA4404 (4,38) und GV2260 (3,11) konnte eine vergleichbare mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat wie in der Kontrolle 1 beobachtet werden, allerdings lag die Sprossregeneration (%) in den Varianten 1 und 2 mit 91 % und 100 % höher als in der Kontrolle 1 (85%). Die Übernachtkultur mit dem *A. tumefaciens*-Stämmen GV3101

(7,58) und EHA 105 (6,8) führte hingegen zu einer deutlichen Steigerung in der Regeneration (Abbildung 3.13).

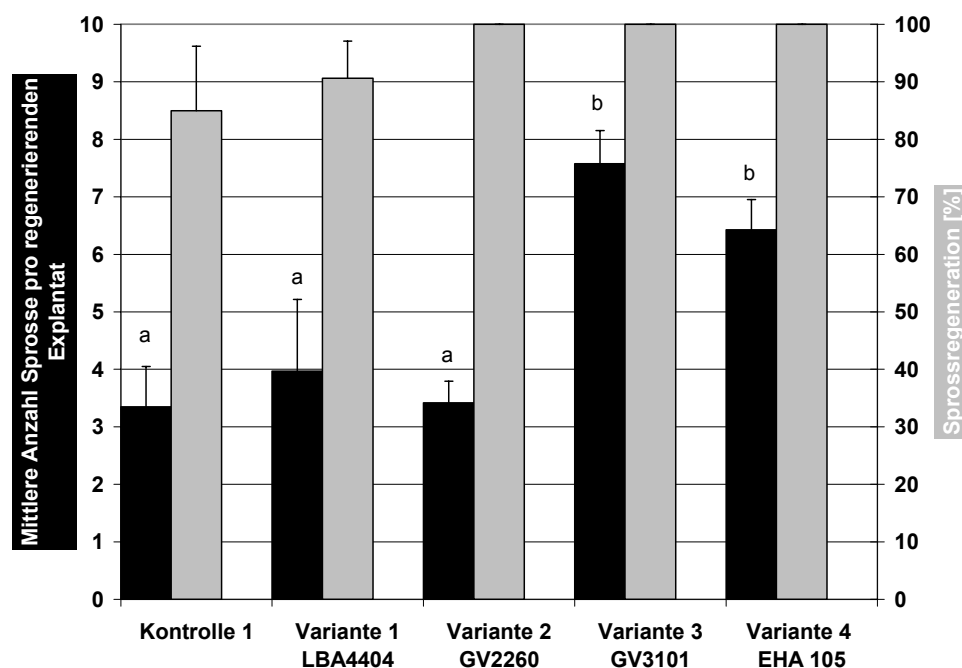


Abbildung 3.13: Effekt von verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen ohne Phosphinothricin-Selektion auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat von *Petunia Cultivars* 'Famous Electric Purple' nach drei Wochen (Versuch 3)

Werte über den Säulen: Sprossregenerationsrate in %

Kontrolle 1: Medium ohne Zusätze

Variante 1: + *Agrobacterium*-Stamm LBA4404

Variante 2: + *Agrobacterium*-Stamm GV2260

Variante 3: + *Agrobacterium*-Stamm GV3101

Variante 4: + *Agrobacterium*-Stamm EHA105

Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant über einseitig getestete 95 % profile-likelihood Konfidenzintervalle für die Odds-Ratio von der Kontrollbehandlung. Zur Einhaltung des globalen Fehler-Niveaus wurde das Bonferroni-Verfahren angewandt.

In Versuch 3 ließ sich eine starke Förderung der Regeneration nach Übernachtskultur mit zwei der vier untersuchten *A. tumefaciens*-Stämme feststellen. Bei Inkubation des Mediums mit den Stämmen LBA4404 und GV2260 war kein fördernder Einfluss auf die Regeneration zu beobachten, jedoch kam es nach Vorkultur der Stämme GV3101 und EHA105 im Regenerationsmedium zur doppelten mittleren Anzahl an Sprossen pro regenerierendem Explantat im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.3 Einfluss des Vektorsystems auf das Transformationsergebnis

Zur Etablierung eines Transformationssystems für *Petunia* Cultivars wurde zu Beginn das Vektorsystem pGreenII und in späteren Versuchen das Vektorsystem pMen verwendet. Im Folgenden werden die Transformationsergebnisse mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP und pMen65smRS-GFP bei *Petunia* Cultivars dargestellt und diese in ihrer Transformationseffizienz verglichen. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Transformationseffizienz, wie beispielsweise *A. tumefaciens*-Stamm, Kokulturbedingungen und Dauer sowie die Vorkultur. Besonderer Wert wurde auf die Effizienzsteigerung des Transformationsergebnisses durch Auswahl des *A. tumefaciens*-Stamms gelegt.

Ziele waren, die *A. tumefaciens*-vermittelte Pflanzentransformation bei *Petunia* zu etablieren und zu optimieren und durch die fortlaufende Beobachtung der GFP-Expression Einblicke in frühe Ereignisse im Transformationsprozess zu bekommen.

3.3.3.1 Transformationseffizienz von pGreenII0229smRS-GFP

Mit den ersten Transformationsversuchen sollte der effektivste *A. tumefaciens*-Stamm im Hinblick auf die Transformationseffizienz bei *Petunia* ausgewählt werden.

Nach erfolgreicher Klonierung des *smRS-GFP*-Gens in das pGreenII0229-Vektorsystem und darauffolgender Sequenzierung (siehe 2.19) zur Überprüfung der Klonierung, wurde dieses Konstrukt mittels Elektroporation (2.7) in vier *A. tumefaciens*-Stämme transformiert. Die daraus erstellten Glycerindauerkulturen wurden jeweils für die Transformationen neu angezogen. Hierfür wurden die *A. tumefaciens*-Stämme LBA4404, GV2260, GV3101 und EHA105 ausgewählt. Als Basis für die Transformationsversuche wurde wie in 2.13 beschrieben vorgegangen.

Abbildung 3.14 zeigt die Transformationsraten (%) für die vier verwendeten *Petunia* Genotypen bei Transformationen mit vier verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen. Die Daten sind Mittelwerte der Transformationsraten von bis zu drei Wiederholungen mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP.

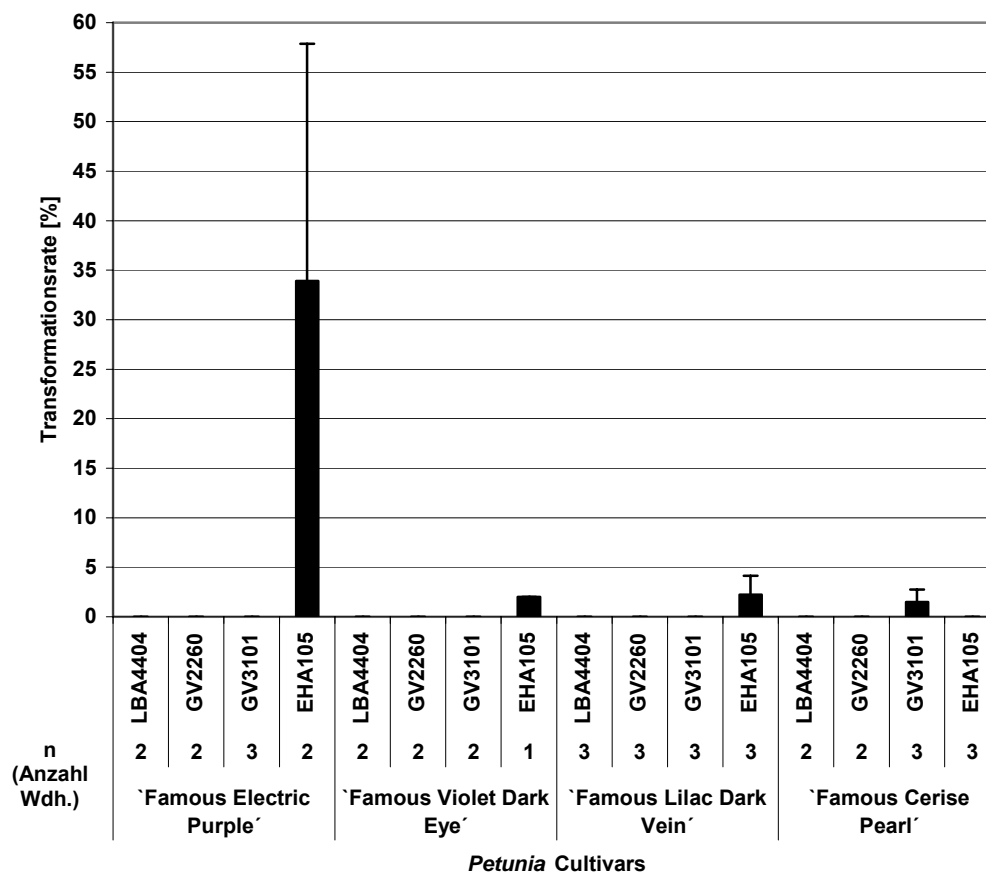


Abbildung 3.14: Transformationsraten (%) erzielt mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP mit unterschiedlichen *A. tumefaciens*-Stämmen bei vier *Petunia* Cultivars Genotypen; Anzahl Versuchswiederholungen

Mittelwerte und Standardabweichungen aus n Wiederholungen mit jeweils 50 Explantaten

Bei Verwendung des *Agrobacterium tumefaciens*-Stamms EHA105 regenerierten in drei von vier *Petunia*-Genotypen PCR positiv getestete transgene Sprosse, während LBA4404 und GV2260 nicht zu Transformationsereignissen führten. Der Genotyp 'Famous Electric Purple' erreichte mit EHA105 in zwei Wiederholungen eine mittlere Transformationsrate von 34 %, 'Famous Violet Dark Eye' von 2 % und bei 'Famous Lilac Dark Vein' ebenfalls 2 % (Mittelwert aus drei Wiederholungen). In Transformationen mit 'Famous Cerise Pearl' resultierten aus drei Wiederholungen keine transgenen Pflanzen. In Transformationsversuchen mit dem *Agrobacterium*-Stamm GV3101 und dem Genotyp 'Famous Cerise Pearl' ergab sich eine mittlere Transformationsrate von 1,5 % (Mittelwert von drei Transformationsversuchen). In Versuchen mit *A. tumefaciens* GV3101 und EHA105 wurden keine reproduzierbar hohen Transformationsraten erzielt, vielmehr wurden alle transgenen Pflanzen nur aus

jeweils einem Transformationsversuch gewonnen. Darüber hinaus erwies sich die GFP-Detektion an den Blattexplantaten als sehr schwierig, da die vereinzelt auftretende Fluoreszenz so schwach war, dass sie nicht fotografisch dokumentiert werden konnte, zudem war diese nur vorübergehend exprimiert.

Nachdem die Ergebnisse mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP und verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen nicht als befriedigend bewertet werden konnten, wurde in den folgenden Versuchen mit dem neu erstellten Vektor pMen65smRS-GFP sowie pMenGUS im Vergleich gearbeitet.

3.3.3.2 Vergleich der Transformationseffizienz von pGreenII0229 mit pMen65

Mit diesem Versuch wurde der neu erstellte Vektor pMen65smRS-GFP mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP verglichen. Hierzu wurde pMen65smRS-GFP (siehe 3.2.2) und pMen65GUS im *A. tumefaciens*-Stamm ABI mit dem zuvor genutzten Vektor pGreenII0229smRS-GFP in EHA105 und GV3101 verglichen. Ein Vergleich der Vektorsysteme mit einem identischen *A. tumefaciens*-Stamm war nicht möglich, da der Stamm ABI chromosomal nicht in den Vektor pGreenII mit Resistenz gegenüber Kanamycin eingebracht werden konnte. Daraufhin sollte der Vektor pMen65smRS-GFP mit Spectinomycin- und Streptomycinresistenz in die *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme GV3101 und EHA105 transformiert werden. Nach Elektroporation in GV3101 und EHA105 kam es nach Selektion mit Spectinomycin und Streptomycin zu Bakterienkoloniewachstum sowohl in der Wasserkontrolle als auch in der Plasmid-DNA Variante, dies auch nach mehrmaligen Wiederholungen. Aufgrund dieser Ergebnisse musste auf die Verwendung von identischen *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen zum Vergleich der Vektoren verzichtet und auf die bereits erwähnten Stamm-Vektor-Kombinationen zurückgegriffen werden.

Der Vektor pMen65 überträgt auf der T-DNA das *nptII*-Gen für eine Kanamycinresistenz im Gegensatz zu pGreenII0229, welcher das *bar*-Gen für Phosphinothricinresistenz überträgt.

Im Vergleich zeigten die verwendeten Selektionsagenzien eine unterschiedliche Effizienz bei *Petunia* 'Famous Lilac Dark Vein' (siehe Abbildung 3.15 und 3.16). Hier wurden zur Selektion 3 mg/L Phosphinothricin bei pGreenII0229smRS-GFP (in zwei *A. tumefaciens*-Stämmen GV3101 und EHA105) und 100 mg/L Kanamycin bei pMen65

(in ABI) verwendet. Die verwendete Konzentration von 3 mg/L Phosphinothricin gründete auf den Ergebnissen (siehe 3.3.2) zum Einfluss des *A. tumefaciens*-Stammes auf die Selektionswirkung von PPT und Ergebnissen aus vorherigen Transformationsversuchen (3.3.3.1), in denen eine Konzentration von 1 mg/L zur Selektion als nicht ausreichend aufgrund hoher Zahlen an Escapes angesehen werden konnte.

Abbildung 3.15 stellt die Selektionswirkung von phosphinothricin in Transformationsversuchen mit pGreenII0229smRS-GFP dar. Hier kam es zu geförderter Sprossregeneration auf phosphinothricinhaltigem Medium bei Verwendung der *Agrobacterium*-Stämme GV3101 und EHA105 im Vergleich zur Kontrolle.



Abbildung 3.15: Effekt von Phosphinothricin (3 mg/L) in Transformationsversuchen mit pGreenII0229smRS-GFP in zwei *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen bei *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen



Abbildung 3.16: Effekt von Kanamycin (100 mg/L) in Transformationsversuchen mit pMen65GUS und pMen65smRS-GFP in *A. tumefaciens* ABI bei *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen

Abbildung 3.16 zeigt den Effekt von Kanamycin in einen Transformationsversuch mit dem Vektor pMen65smRS-GFP und pMen65GUS im *Agrobacterium*-Stamm ABI.

Hierbei kam es zu einer vergleichbaren Reaktion an Blattexplantaten von *Petunia* mit der Kontrolle. In dem Versuch mit dem Vektorsystem pMen65 setzte an transformierten Explantaten nach vier Wochen Sprossregeneration auf kanamycinhaltigem Medium ein. Einen Vergleich der Transformationsraten in Abhängigkeit vom verwendeten *A. tumefaciens*-Stamm und Vektorsystem zeigt Tabelle 3.1. In Transformationen mit dem Vektor pMen65GUS in ABI regenerierten 25 transgene Sprosse aus 25 eingesetzten Blattexplantaten (100 %). Der Vektor pMen65smRS-GFP in ABI wies eine Transformationsrate von 48 % auf, pGreenII0229smRS-GFP in EHA105 16 % und bei Transformationen mit pGreenII0229smRS-GFP in GV3101 regenerierten keinerlei Sprosse (0 %). Pro eingesetzten Explantat wurde nur ein Spross geerntet. Die Transformationsrate berechnete sich wie folgt:

$$\text{Transformationsrate [\%]} = \frac{(\text{Anzahl PCR positiver Sprosse} \times 100)}{\text{Anzahl eingesetzter Explantate}}$$

Tabelle 3.1: Transformationsraten in Abhängigkeit vom *A. tumefaciens*-Stamm und verwendeten Vektor bei *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein'

Pro eingesetzten Explantat wurde ein Spross geerntet.

Vektorsystem	<i>A. tumefaciens</i> -Stamm	Transgene Sprosse/Anzahl Explantate	Transformationsrate [%]
pGreenII0229smRS-GFP	GV3101	0/25	0
pGreenII0229smRS-GFP	EHA105	4/25	16
pMen65smRS-GFP	ABI	12/25	48
pMen65GUS	ABI	25/25	100

Im histochemischen GUS-Assay nach drei und vier Wochen zeigten *Petunia* Cultivars transformiert mit dem Vektor pMen65GUS eindeutig GUS-positive Bereiche am Explantat (siehe Abbildung 3.17). In Abbildung 3.18 zeigt einen GUS-positiven Spross sechs Wochen nach Transformation.

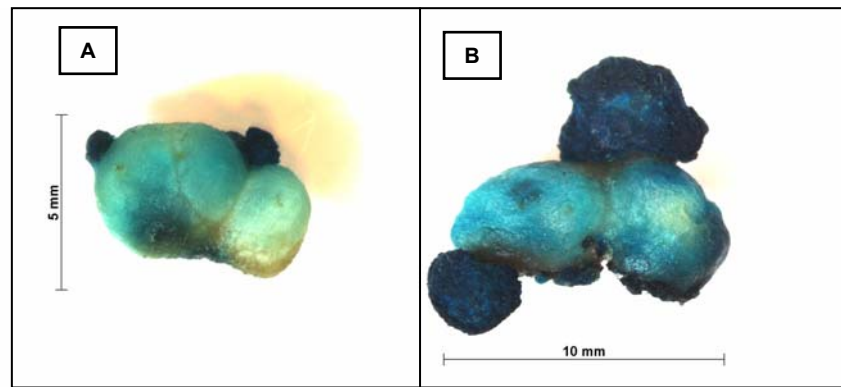


Abbildung 3.17: GUS-Expression an Blattexplantaten von *Petunia* Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' drei (A) und vier Wochen (B) nach Transformation mit pMen65GUS in ABI

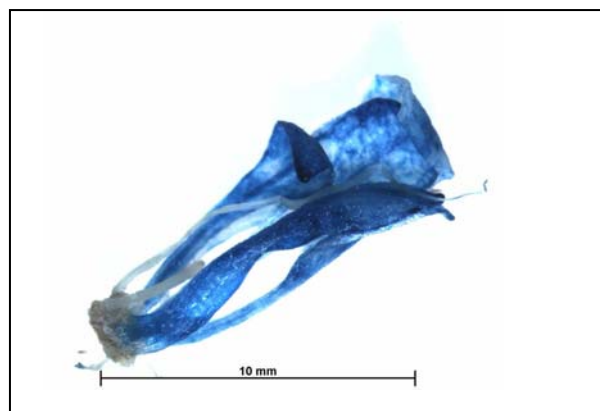


Abbildung 3.18: Histochemischer GUS-Assay: GUS-positiver Spross sechs Wochen nach Transformation von *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' mit pMen65GUS in ABI

Beim Vergleich der Vektoren pMen65 und pGreenII0229 konnten Unterschiede in der Selektionseffektivität der beiden verwendeten Selektionsagenzien und in der Stärke der smRS-GFP-Expression ermittelt werden. Während mit pGreenII0229smRS-GFP in EHA105 und GV3101 transformierten *Petunia*-Blattexplantaten nur vereinzelte Zellen mit smRS-GFP-Expression unter UV-Licht mikroskopisch nachzuweisen waren (siehe Abbildung 3.19, A), zeigten sich bei mit pMen65smRS-GFP transformierten Blattexplantaten klar zu detektierende, intensiv fluoreszierende Zellcluster *smRS-GFP* exprimierender Zellen am Explantat (siehe Abbildung 3.19, B).

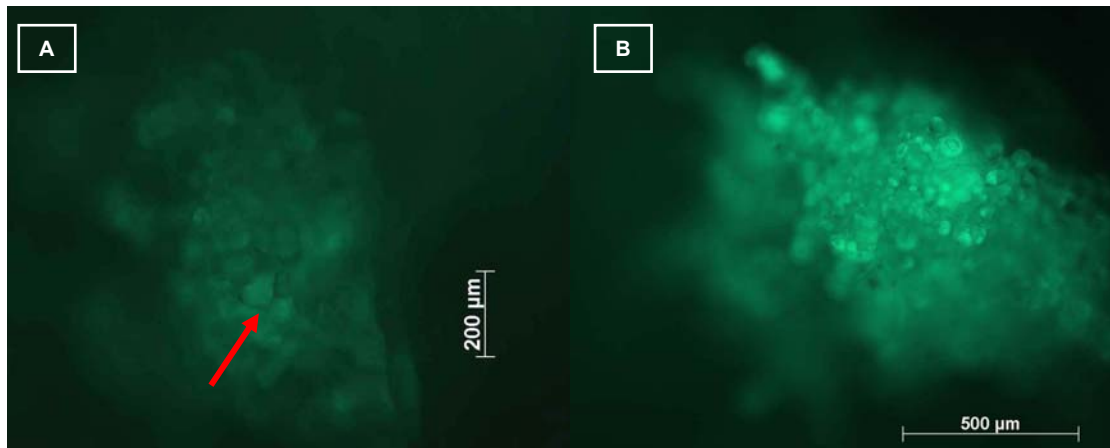


Abbildung 3.19: Vergleich der smRS-GFP-Expression an Blattexplantaten von *Petunia Cultivars* 'Famous Lilac Dark Vein' transformiert mit pGreenII0229smRS-GFP in EHA105 (A) und transformiert mit pMen65smRS-GFP in ABI (B) 10 Tage nach Kokultur

Die nur sehr vereinzelt auftretende smRS-GFP-Expression in Zellen bei Transformationen mit pGreenII0229smRS-GFP in EHA105 sowie GV3101 war teilweise sehr schwach und konnte nach einigen Tagen nicht mehr festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung von pMen65smRS-GFP in ABI, eine intensive, stabil exprimierte Expression des *smRS-GFP* beobachtet werden.

In folgenden Transformationsversuchen kam daher ausschließlich der Vektor pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm ABI zum Einsatz.

3.3.4 Vergleich der Transformationseffizienz bei Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP

Folgende Transformationsversuche hatten das Ziel, die Transformationseffizienz bei Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP (Kan+GFP) mit der bei alleiniger Selektion über die Expression von smRS-GFP (GFP) bei Verwendung des Vektors pMen65smRS-GFP im *A. tumefaciens*-Stamm ABI zu vergleichen. In diesen Versuchen wurde wie unter 2.13 beschrieben vorgegangen.

Für die Transformationen wurden vier sich in ihrer Regenerationsfähigkeit unterscheidende *Petunia* Genotypen verwendet. Der *Petunia* Genotyp 'Famous Electric Purple' wies bei alleiniger Selektion über GFP eine Transformationseffizienz von 0,4 % auf, mit Kanamycin-Selektion lag die Transformationseffizienz bei 9,4 %. Ein ähnliches Ergebnis zeigte der Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein', der in 0,8 % Transformationseffizienz bei GFP-Selektion und 5,5 % bei Kanamycin-Selektion resultierte. Die Transformationseffizienz bei 'Famous Violet Dark Eye' betrug bei

alleiniger Selektion über GFP 0,4 % und in Kombination mit Kanamycin-Selektion ebenfalls 0,4 %. Der Genotyp 'Famous Cerise Pearl' hatte eine Transformationsrate von 0,2 % bei alleiniger Selektion über GFP, bei Kanamycin-Selektion konnten in Transformationsversuchen keine transgenen Sprosse regeneriert werden. Die Abbildung 3.20 soll hier nur eine Tendenz der Werte angeben.

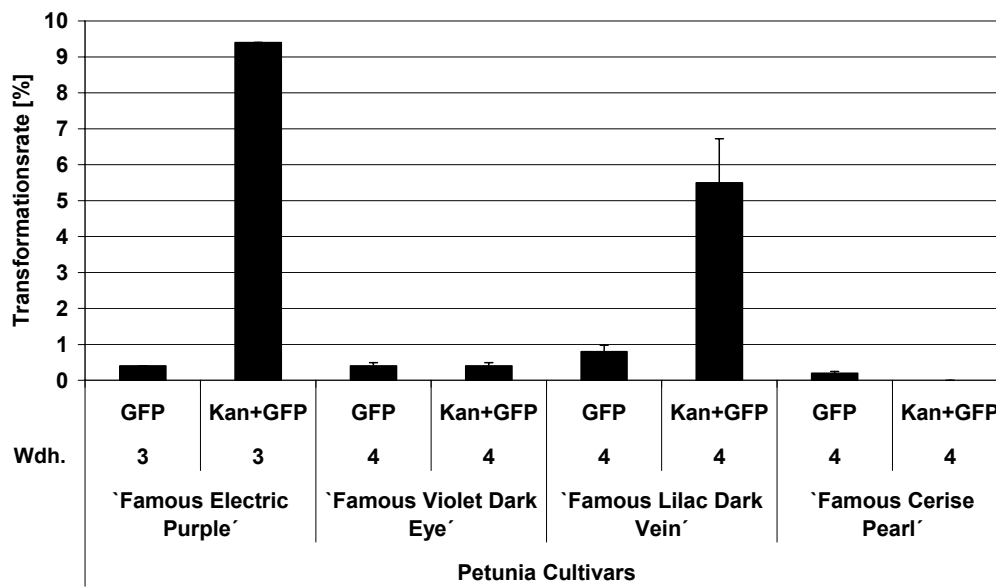


Abbildung 3.20: Transformationsraten (%) für vier *Petunia* Genotypen (pMen65smRS-GFP im *A. tumefaciens*-Stamm ABI) mit Selektion alleinig über smRS-GFP (GFP) oder über GFP in Kombination mit Kanamycin (Kan+GFP)

Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei bis vier Versuchswiederholungen. Die gewerteten Pflanzen wurden auf Anwesenheit des Transgens über PCR getestet.

In den Tabellen 3.2 bis 3.5 werden die Unterschiede in den Varianten mit Kanamycin-Selektion und smRS-GFP (Kan+GFP) zu den Varianten mit alleiniger Selektion über smRS-GFP (GFP) in den vier untersuchten *Petunia* Cultivars klar herausgestellt. (Die Tabellen gehen dabei auf die Anzahl eingesetzter Explantate, Gesamtzahl regenerierter Sprosse, Sprosse mit GFP-Expression, PCR positiv getestete Sprosse entweder auf *smRS-GFP* oder *nptII*, Anzahl resultierender Escapes, sowie die resultierende Transformationsrate (%) ein.) Als Escapes werden nicht transformierte Sprosse, die trotz Selektionsdruck wachsen oder GFP-Expression zeigen, bezeichnet. Die Anzahl Sprosse gesamt resultiert aus der Gesamtzahl regenerierter Sprosse aus vier Bonituren. Hierbei wurde die erste Bonitur nach drei Wochen vorgenommen und nur die GFP positiven Sprosse geerntet und die verbleibenden Sprosse entfernt, nach weiteren zwei Wochen erfolgte die nächste Bonitur und so weiter.

In den Varianten ohne Kanamycin-Selektion (GFP) zeigte sich eine hohe Gesamtzahl an Sprossen im Gegensatz zur Variante mit Kanamycin-Selektion (Kan+GFP). Die Gesamtzahl regenerierter Sprosse ohne Kanamycin-Selektion (GFP) variierte sehr stark zwischen den unterschiedlichen Genotypen: Bei 'Famous Electric Purple' regenerierten ohne Kanamycin-Selektion (GFP) in drei Transformationsversuchen insgesamt 6571 Sprosse, ähnlich wie bei 'Famous Lilac Dark Vein' mit 5387 Sprossen in vier Transformationsversuchen. Im Gegensatz dazu regenerierten 'Famous Cerise Pearl' 555 Sprosse und bei 'Famous Violet Dark Vein' 1132 Sprosse in vier Transformationsversuchen (Tabelle 3.2 und 3.3). Mit Kanamycin-Selektion (Kan+GFP) zeigte sich ein ähnliches Verhältnis dieser Genotypen: 'Famous Electric Purple' regenerierte 690 Sprosse (drei Transformationsversuche), 'Famous Lilac Dark Vein' 695 Sprosse, 'Famous Violet Dark Vein' 462 Sprosse und 'Famous Cerise Pearl' jedoch nur 70 Sprosse insgesamt (vier Transformationsversuche). Die Anzahl der Sprosse mit GFP-Expression, die anhand dieser Expression selektiert wurden, lag in den Varianten ohne Selektion (GFP) in allen vier *Petunia* Genotypen sehr hoch. GFP-positive Sprosse, die anhand ihrer GFP-Expression selektiert wurden, machten bei 'Famous Electric Purple' 5 % ohne Selektion aus und mit Kanamycin-Selektion 10 %. Für 'Famous Lilac Dark Vein' konnten in vier Transformationsversuchen 11 % Sprosse mit GFP-Expression in der Variante ohne Kanamycin-Selektion ermittelt werden, im Gegensatz zu der Variante Kan+GFP mit 12 %. Ähnlich verhielt es sich bei den Genotyp 'Famous Violet Dark Vein' mit 4 % Sprosse mit GFP-Expression in der Variante GFP und 6 % bei Kan+GFP. 'Famous Cerise Pearl' wies 10 % Sprosse mit GFP-Expression ohne Selektion (GFP) und 2 % Sprosse in der Variante mit Kanamycin-Selektion (Kan+GFP) auf. Ein Großteil dieser GFP-positiven, selektierten Sprosse in den Varianten GFP und Kan+GFP bestand nach Überprüfung über PCR (*smRS-GFP* und *nptII*) sowie Kultur der Sprosse auf kanamycinhaltigem Sprosskulturmedium in Escapes, d. h. nicht transformierten Sprossen. So konnten für den Genotypen 'Famous Electric Purple' 90 % Escapes in der Variante GFP und 77 % Escapes in der Variante Kan+GFP in drei Transformationsversuchen festgestellt werden. 'Famous Lilac Dark Vein' zeigte in der Variante GFP 93 % Escapes und in der Variante Kan+GFP 54 % Escapes, 'Famous Violet Dark Eye' in der Variante GFP 89 % Escapes und in der Variante Kan+GFP 93 %. Der Genotyp 'Famous Cerise Pearl', welcher im Vergleich mit den drei anderen Genotypen weniger Sprosse regenerierte und weniger Sprosse mit GFP-Expression hervorbrachte, wies in vier Transformationsversuchen 91 % Escapes in der Variante

GFP und 100 % in der Variante Kan+GFP auf. Nach PCR-Überprüfung aller über GFP-Expression selektierten Sprosse konnte die Transformationsrate berechnet werden. Die Transformationsrate wurde hierbei errechnet indem die Anzahl PCR positiver Sprosse in Beziehung zu der Anzahl Sprosse gesamt nahm. Hier wies die Variante Kan+GFP in zwei Genotypen eine höhere Transformationsrate auf als die Variante GFP. Allerdings kam es erneut, wie schon bei Verwendung des Vektors pGreenII0229smRS-GFP (3.3.3.1) zu großen Unterschieden zwischen den einzelnen Wiederholungen. In drei bis vier Wiederholungen pro Genotyp kam es lediglich in ein bis zwei Transformationsversuchen zu transgenen Pflanzen. Der Genotyp 'Famous Electric Purple' konnte im ersten Transformationsversuch 1 % transgene in der Variante GFP und 2 % transgene Pflanzen in der Variante Kan+GFP hervorbringen. Folgende Transformationsversuche resultierten in keinerlei Transgenen und der dritte Transformationsversuch in 2 % transgenen Sprossen in der Variante Kan+GFP. Ähnliches zeigte sich im Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein', der erste Transformationsversuch erbrachte 1% transgene Sprosse bei alleiniger Selektion über GFP (GFP) und 5 % mit Selektion (Kan+GFP). Zwei weitere Transformationsversuche zeigten keine Transgenen, der vierte Versuch 9% in der Variante Kan+GFP und 0 % in der Variante GFP. Der Genotyp 'Famous Violet Dark Eye' konnte im vierten Transformationsversuch 2 % in der Variante GFP und 1 % in der Variante Kan+GFP hervorbringen sowie 1 % im zweiten Transformationsversuch der Variante Kan+GFP, während der Genotyp 'Famous Cerise Pearl' lediglich in einem Transformationsversuch 0,4 % transgene Sprosse hervorbrachte.

Tabelle 3.2: Vergleich der Transformationsraten [%] bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion bei *Petunia* Genotyp 'Famous Electric Purple' (pMen65smRS-GFP in ABI)

`Famous Electric Purple`																		
	Eingesetzte Explantate		Sprosse gesamt		GFP positive Sprosse				PCR positive Sprosse				Escapes				Transformationsrate [%]	
	GFP	Kan+GFP	GFP	Kan+GFP	GFP	%	Kan+GFP	%	gfp positiv		npfl positiv		GFP	%	Kan+GFP	%	GFP	Kan+GFP
									GFP	Kan+GFP	GFP	Kan+GFP						
1	33	39	4247	473	270	6	53	11	28	11	30	11	240	89	42	79	0,7	2,3
2	25	30	338	2	5	1	0	0	0	0	0	0	5	100	0	0	0	0
3	96	54	1986	215	24	1	15	7	0	5	0	5	24	100	10	67	0	2,3
Σ	154	123	6571	690	299	Ø 5	68	Ø 10	28	16	30	16	269	Ø 90	52	Ø 77	Ø 0,4	Ø 9,4

Tabelle 3.3: Vergleich der Transformationsraten [%] bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion bei *Petunia* Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI)

`Famous Lilac Dark Vein`																		
	Eingesetzte Explantate		Sprosse gesamt		GFP positive Sprosse				PCR positive Sprosse				Escapes				Transformationsrate [%]	
	GFP	Kan+GFP	GFP	Kan+GFP	GFP	%	Kan+GFP	%	gfp positiv		npfl positiv		GFP	%	Kan+GFP	%	GFP	Kan+GFP
									GFP	Kan+GFP	GFP	Kan+GFP						
1	46	33	3369	420	507	15	56	13	43	21	45	24	464	92	35	63	1,3	5,0
2	25	25	457	10	28	6	2	20	0	0	0	0	28	100	2	100	0	0
3	18	20	180	83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	95	73	1381	182	76	6	24	13	2	17	2	17	74	97	7	29	0	9,3
Σ	184	151	5387	695	611	Ø 11	82	Ø 12	45	38	47	41	566	Ø 93	44	Ø 54	Ø 0,8	Ø 5,5

Die errechnete Transformationsrate in %:
$$\text{Transformationsrate [\%]} = \frac{(\text{Anzahl PCR positiver Sprosse} \times 100)}{\text{Sprosse gesamt}}$$

Je eingesetztes Explantat wurden alle fluoreszierenden Sprosse auf Selektionsmedium weiterkultiviert und über PCR getestet.

Tabelle 3.4: Vergleich der Transformationsraten [%] bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion bei *Petunia* Genotyp 'Famous Violet Dark Eye' (pMen65smRS-GFP in ABI)

`Famous Violet Dark Eye`																			
	Eingesetzte Explantate		Sprosse gesamt		GFP positive Sprosse				PCR positive Sprosse				Escapes				Transformationsrate [%]		
									gfp positiv		npdl positiv								
	GFP	Kan+GFP	GFP	Kan+GFP	GFP	%	Kan+GFP	%	GFP	Kan+GFP	GFP	Kan+GFP	GFP	%	Kan+GFP	%	GFP	Kan+GFP	
1	25	25	154	114	5	3	2	2	0	0	0	0	5	100	2	100	0	0	
2	40	40	497	117	13	3	15	13	0	1	0	1	13	100	14	93	0	0,9	
3	52	51	189	74	2	1	1	1	0	0	0	0	2	100	1	100	0	0	
4	25	29	292	157	25	9	9	6	5	1	5	1	20	80	8	89	1,7	0,6	
Σ	142	145	1132	462	45	Ø 4	27	Ø 6	5	2	5	2	40	Ø 89	25	Ø 93	Ø 0,4	Ø 0,4	

Tabelle 3.5: Vergleich der Transformationsraten [%] bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion bei *Petunia* Genotyp 'Famous Cerise Pearl' (pMen65smRS-GFP in ABI)

`Famous Cerise Pearl`																			
	Eingesetzte Explantate		Sprosse gesamt		GFP positive Sprosse				PCR positive Sprosse				Escapes				Transformationsrate [%]		
									gfp positiv		npdl positiv								
	GFP	Kan+GFP	GFP	Kan+GFP	GFP	%	Kan+GFP	%	GFP	Kan+GFP	GFP	Kan+GFP	GFP	%	Kan+GFP	%	GFP	Kan+GFP	
1	25	25	33	52	5	15	7	13	0	0	0	0	5	100	7	100	0	0	
2	25	30	11	0	1	9	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	
3	68	70	275	13	1	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	
4	50	49	236	5	4	2	0	0	1	0	1	0	3	75	0	0	0,4	0	
Σ	168	174	555	70	11	Ø 2	7	Ø 10	1	0	1	0	10	Ø 91	7	Ø 100	Ø 0,1	Ø 0	

Die errechnete Transformationsrate in %:
$$Transformationsrate [\%] = \frac{(Anzahl\ PCR\ positiver\ Sprosse \times 100)}{Sprosse\ gesamt}$$

Je eingesetztes Explantat wurden alle fluoreszierenden Sprosse auf Selektionsmedium weiterkultiviert und über PCR getestet.

In der Variante GFP traten in der hohen Anzahl Escapes in den Genotypen 'Famous Electric Purple' und 'Famous Lilac Dark Vein' einige wenige Sprosse mit fasciierter Wuchsform (Cristata-Form) auf, bei der der Vegetationspunkt zu einem Vegetationsscheitel verbreitert war (Abb. 3.21). Diese wurden nicht weiterkultiviert.

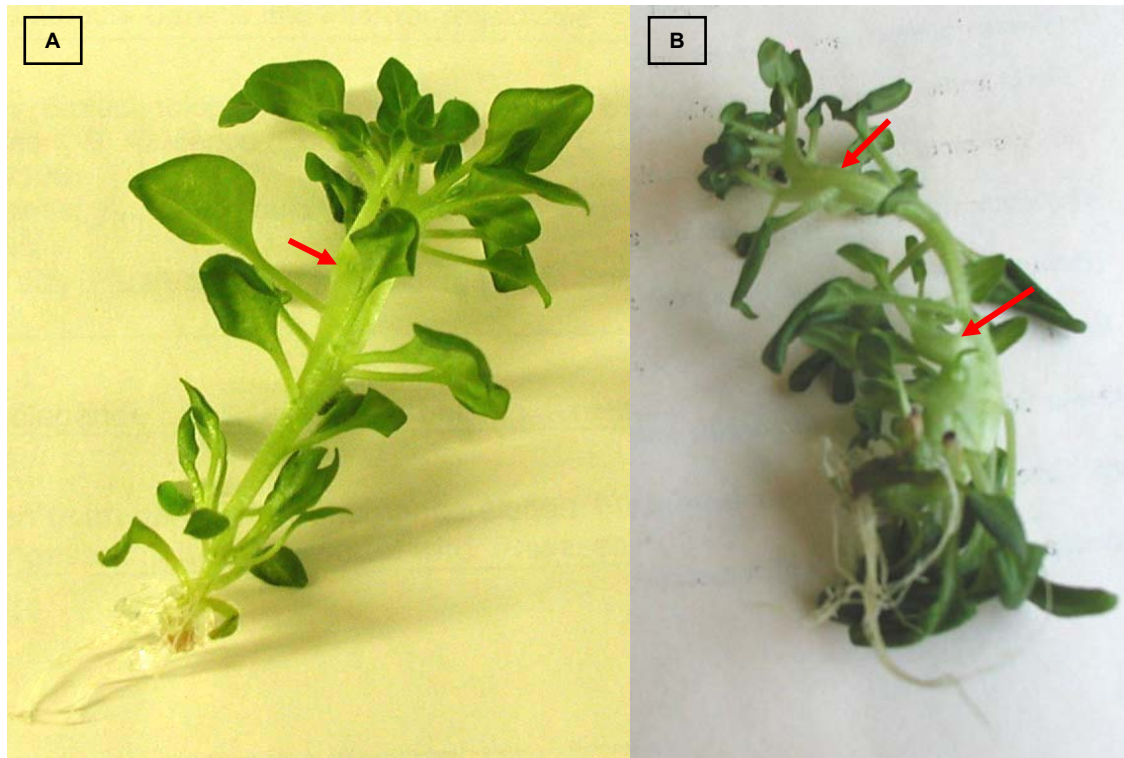


Abbildung 3.21: Auftreten von fasciertem Wuchs (roter Pfeil) bei *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' (A) und 'Famous Lilac Dark Vein' (B) transformiert mit pMen65smRS-GFP in der Variante GFP

3.3.5 Nachweis der Integration und Expression von Transgenen

3.3.5.1 Vergleich von drei DNA-Extraktionsmethoden

In Hinblick auf die Selektion transgener Zierpflanzen mittels PCR, ist die Isolierung von DNA aus pflanzlichem Gewebe in geringen Mengen notwendig. Es wurden drei verschiedene DNA-Extraktionsmethoden auf ihre Durchführbarkeit und den Kosten- und Zeitbedarf pro zehn Isolationen verglichen:

1. DNA-Schnellisolation für PCR nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) (siehe 2.17.2.3)
2. DNA-Extraktion mit CTAB Precipitation (siehe 2.17.2.2)
3. kommerzielles DNA-Isolationskit DNeasy[®] PlantMini von QIAGEN (2.17.2.1).

Die drei DNA-Extraktionsmethoden unterscheiden sich grundlegend in der Zusammensetzung ihrer Extraktionspuffer (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der Extraktionspuffer aus drei unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden

	DOROKHOV UND KLOCKE	CTAB Precipitation	DNeasy® PlantMini (QIAGEN)
Extraktionspuffer	200 mM Tris-HCl 250 mM NaCl 25 mM EDTA 0,5 % SDS	1% CTAB 1 M Tris-HCL 5 M NaCl 0,5 M EDTA 0,1 % β -Mercaptoethanol	nicht angegeben

Die drei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden wurden an *Petunia* Cultivars hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und Effektivität in der DNA-Ausbeute verglichen. Vorab wurden alle drei Methoden an *Petunia* Cultivars 'Famous Violet Dark Eye' erprobt. Bei der DNA-Extraktionsmethode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) (siehe auch 2.17.2.3) wurde hierbei frisches In-vitro-Blattmaterial verwendet, wenn nicht anders beschrieben. In Abbildung 3.22 sind die jeweiligen Ausbeuten bei Verwendung der DOROKHOV UND KLOCKE (1997) Extraktionsmethode laut Protokoll mit Mikropistill per Hand aufbereitet (Variante: DOROKHOV UND KLOCKE), mit getrocknetem Blattmaterial ebenfalls per Hand aufbereitet (Variante: DOROKHOV UND KLOCKE, trocken) und DNA-Extraktion von frischem Blattmaterial mit einem Mikropistill eingespannt in ein Laborrührwerk und CTAB-Fällung (Variante: CTAB) dargestellt. In der Variante DOROKHOV UND KLOCKE, N₂ erfolgte die Aufbereitung des frischen In-vitro-Blattmaterials abweichend vom Protokoll mit flüssigem Stickstoff, ebenso wie bei der Verwendung des kommerziellen DNA-Isolationskits DNeasy® PlantMini von QIAGEN (Variante: QIAGEN). Mit der DNA-Schnellisolation für PCR nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) konnten unter Verwendung von frischem In-vitro-Blattmaterial 84 μ g DNA/g FM aus *Petunia* Cultivars 'Famous Violet Dark Eye' extrahiert werden. Die CTAB-Precipitation erbrachte 22 μ g DNA/g FM und das QIAGEN DNA-Isolationskit 47 μ g DNA/g FM.

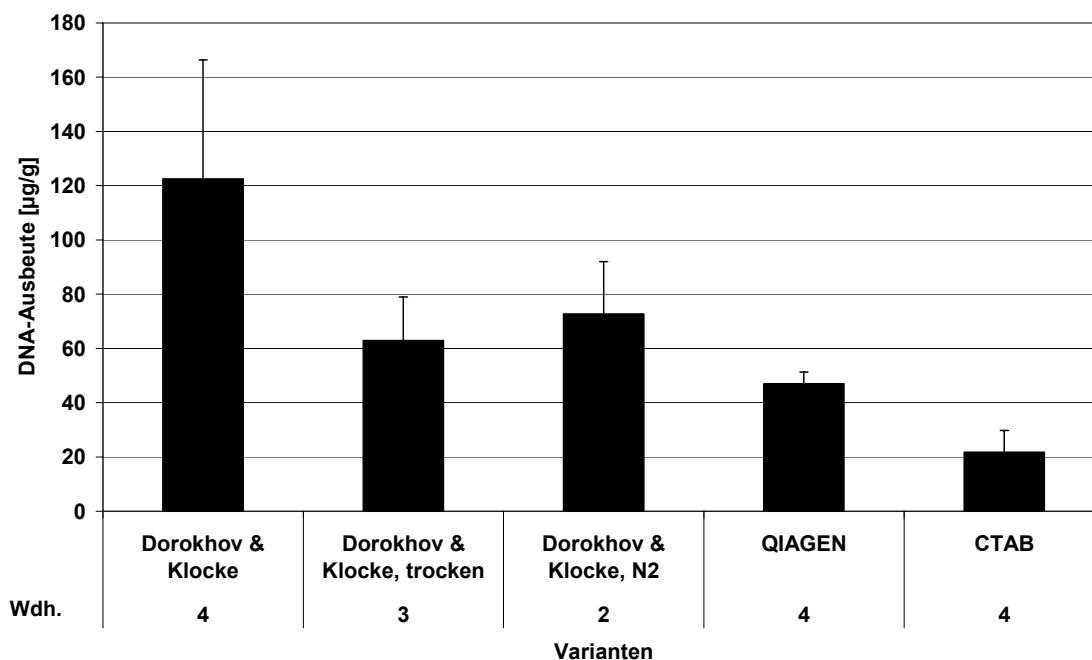


Abbildung 3.22: Vergleich der DNA-Ausbeute bei *Petunia* Cultivars 'Famous Violet Dark Eye' unter Verwendung der Extraktionsmethode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997), QIAGEN und CTAB-Fällung

Mittelwerte und Standardabweichungen aus bis zu vier Versuchswiederholungen

Dorokhov & Klocke: Extraktionsmethode laut Protokoll mit Mikropistill per Hand aufbereitet

Dorokhov & Klocke: trocken: mit getrocknetem Blattmaterial per Hand aufbereitet

Dorokhov & Klocke, N₂: mit Aufbereitung des frischen In-vitro-Blattmaterials abweichend vom Protokoll mit flüssigem Stickstoff

Qiagen: kommerzielles DNA-Isolationskits DNeasy®PlantMini von QIAGEN unter Verwendung von frischem Blattmaterial mit flüssigem Stickstoff aufbereitet

CTAB: DNA-Extraktion von frischem Blattmaterial mit einem Mikropistill eingespannt in ein Laborrührwerk und CTAB-Fällung

Weitere Versuche hatten zum Ziel, das Protokoll zur DNA-Extraktion nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) auf die Anwendbarkeit in für Petunie zu testen und DNA-Ausbeuten weiter zu erhöhen. Hierbei wurde das Ausgangsmaterial in Blattmaterial: frisch/trocken, Art der Aufbereitung: per Hand/Laborrührwerk und das Volumen des Reaktionsgefäßes: 1,5 mL/2,0 mL verglichen. Die unter 2.17.2 beschriebenen Varianten (siehe Tabelle 3.7) kamen unter Verwendung von *Petunia* Genotyp 'Famous Violet Dark Eye' zur Anwendung.

Tabelle 3.7: Beschreibung der Versuchsvarianten zur Optimierung der DNA-Extraktion nach DORORKHOV UND KLOCKE (1997)

Varianten	Blattmaterial	Art der Aufbereitung	Volumen des Reaktionsgefäßes
V1	frisch	per Hand	1,5 mL
V2	frisch	per Hand	2,0 mL
V3	frisch	Laborrührwerk	1,5 mL
V4	frisch	Laborrührwerk	2,0 mL
V5	trocken	Optimale Aufbereitungsart	Optimales Reaktionsgefäß

Abbildung 3.23 zeigt die DNA-Ausbeute ($\mu\text{g/g}$ FM) von Variante V1 bis V5 bei *Petunia* Cultivars 'Famous Violet Dark Eye' unter Verwendung der DNA-Schnellisolation für PCR nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997).

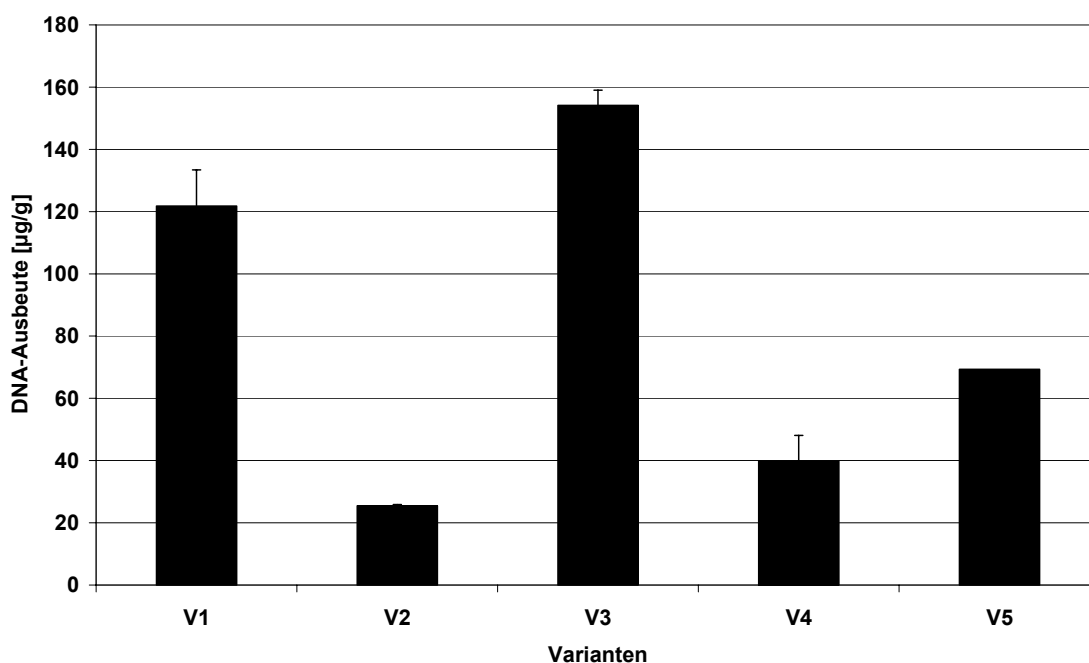


Abbildung 3.23: DNA-Ausbeute bei *Petunia* Cultivars 'Famous Violet Dark Eye' unter Verwendung der Extraktionsmethode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) bei Variation von Reaktionsgefäß, Aufbereitungsart und Ausgangsmaterial

Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchswiederholungen
Beschreibung der Versuchsvarianten siehe Tabelle 3.7

Aus Variante V3 (frisches Blattmaterial; Aufbereitung mit einem Mikropistill, eingespannt in ein Laborrührwerk; 1,5 mL Reaktionsgefäß) konnte hierbei mit $154 \mu\text{g DNA/g FM}$ mit Abstand die höchste Ausbeute erreicht werden. Variante V1 ($121 \mu\text{g/g}$), V2 ($24 \mu\text{g/g}$), V3 ($154 \mu\text{g/g}$), V4 ($40 \mu\text{g/g}$) und V5 ($69 \mu\text{g/g}$) resultierte der Variante mit der höchsten DNA-Ausbeute (Variante V3). Bei Variante V5 sollte die

optimale Aufbereitungsart und das optimale Reaktionsgefäß unter Verwendung von getrocknetem Blattmaterial getestet werden, hierfür wurde zum Aufbereiten ein 1,5 mL Reaktionsgefäß und ein Mikropistill, eingespannt in ein Laborrührwerk, verwendet (V3). Variante V5 resultierte in einer DNA-Ausbeute von 69 µg/g FM, welches ein geringerer Wert als bei der Verwendung von frischem In-vitro-Blattmaterial der Variante 3 war. Die Varianten mit der Verwendung von 1,5 mL Reaktionsgefäßen und frischem Blattmaterial (V1, V3) erzielten höhere DNA-Ausbeuten im Vergleich zur Verwendung von 2,0 mL Reaktionsgefäßen (V2, V4). Die Aufbereitung über einen Mikropistill eingespannt in ein Laborrührwerk (V3, V4) resultierte in höheren DNA-Mengen als die Aufbereitung per Hand (V1, V2) und war die am besten geeignete Aufbereitungsart.

Ein Vergleich der drei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden in Bezug auf Zeit- und Kostenkalkulation zeigt Tabelle 3.8.

Tabelle 3.8: Zeit- und Kostenvergleich von drei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden

	DOROKHOV UND KLOCKE	CTAB-Fällung	DNeasy®PlantMini (QIAGEN)
Material für 1 Probe [€]	0,10 €	0,25 €	2,52 €
Zeit für 10 Proben [min]	120 min	110 min	50 min

Bei diesem Vergleich der DNA-Extraktionsmethoden in Bezug auf Zeitaufwand und Materialkosten wurde für die Zeitkalkulation ein Durchsatz von zehn Proben zugrunde gelegt. Für die Berechnung der Materialkosten pro Probe wurde für die Extraktionsmethoden nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) sowie mit CTAB-Fällung jeweils die Kosten für Verbrauchsmaterialien zum Ansetzen der entsprechenden Puffer und Lösungen für eine Probe kalkuliert. Bei der Kostenkalkulation für das QIAGEN DNeasy®PlantMini wurde der Anschaffungspreis auf eine Isolierung heruntergerechnet. Der Einsatz von Flüssigstickstoff oder Anschaffung von Mikropistills, genauso wie Personalkosten etc. wurden jeweils nicht berücksichtigt.

Die DNA-Aufbereitung mit dem kommerziellen QIAGEN DNeasy®PlantMini erzeugte zwar hohe Verbrauchskosten, stellte sich aber im Zeitaufwand von 50 Minuten für 10 Proben als schnellste Methode heraus. Die DNA-Extraktionsmethoden nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) und die CTAB-Fällung benötigten jeweils zwei Stunden zum Aufbereiten von zehn Proben. Bei diesen zwei Methoden entstanden pro

Probe allerdings nur Kosten in Höhe von 0,10 € (DOROKHOV UND KLOCKE) und 0,25 € für CTAB-Fällung.

3.3.5.2 Überprüfung transgener Integrationen über Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Integration der Transgene wurde zunächst durch PCR-Analysen überprüft. Als Template für die Amplifikation der Genfragmente wurde isolierte genomische DNA eingesetzt. Zum Nachweis der Integration des *smRS-GFP*-Gens diente das vom kodierenden Bereich des *smRS-GFP*-Gens abgeleitete Primerpaar GFP neu (siehe Tabelle 2.13). Das Primerpaar GFP neu führte zu einer Amplifikation eines Fragments der Größe 696 bp.

Mittels PCR wurde auf die Amplifizierung des erwarteten Fragments in allen potentiell transgenen Pflanzen untersucht. Exemplarisch wird hier der Nachweis für die später im Southern Blot analysierten Pflanzen gezeigt.

3.3.5.2.1 Transformationen mit pGreenII0229smRS-GFP

Die Abbildung 3.24 zeigt ausgewählte transformierte Pflanzen, die aus einem Transformationsversuch mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP im *A. tumefaciens*-Stamm EHA105 bei *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' hervorgegangen waren. Jede Spur des Agarosegel kennzeichnet unterschiedliche transformierte Pflanzen (T1 bis T15), rot unterlegte Buchstaben-Zahlenkombinationen charakterisieren die im Southern Blot analysierten Pflanzen. Hierbei zeigen die später im Southern Blot analysierten Pflanzen T1, T2, T4, T6, und T12 eine klare Bande bei 696 bp, T3 und T8 hingegen eine schwach ausgeprägte Bande.

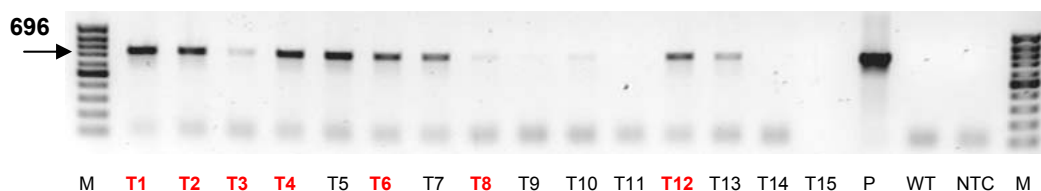


Abbildung 3.24: PCR-Amplifikation des *smRS-GFP*-Gens bei putativ transgenen *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105)

Die Amplifizierung erfolgte mit dem Primerpaar GFP neu (M = 100bp Marker; P = pGreenII0229smRS-GFP; NTC = No Template Control; Wasserkontrolle; WT = Wild Type; nicht transgene Kontrolle). Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T12) kennzeichnen die einzelnen Transformanden.

3.3.5.2.2 Transformationen mit pMen65smRS-GFP

Ausgewählte potentielle transgene Sprosse aus dem Transformationsversuch von *Petunia* Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' und dem Vektor pMen65smRS-GFP im *A. tumefaciens*-Stamm ABI wurden ebenfalls über PCR analysiert. Hierbei wurden insgesamt 17 transformierte Sprosse, die über Kanamycin und GFP oder alleinig über smRS-GFP-Expression selektiert wurden, untersucht. Abbildung 3.25 zeigt den PCR-Nachweis unter Verwendung des Primerpaars GFP neu bei ausgewählten transformierten Pflanzen alleinig über GFP-Expression selektiert, Abbildung 3.26 über Kanamycin und GFP. Jede Spur des Agarosegel kennzeichnet unterschiedliche transformierte Pflanzen (T16 bis T50), rot unterlegte Buchstaben-Zahlenkombinationen charakterisieren die später im Southern Blot analysierten Pflanzen. Hierbei zeigen die später im Southern Blot analysierten 17 Pflanzen T19, T21, T22, T23, T26, T30, T32, T33, T34, T36, T37, T39, T40 T42, T44, T46 und T49 eine Bande bei 696 bp.

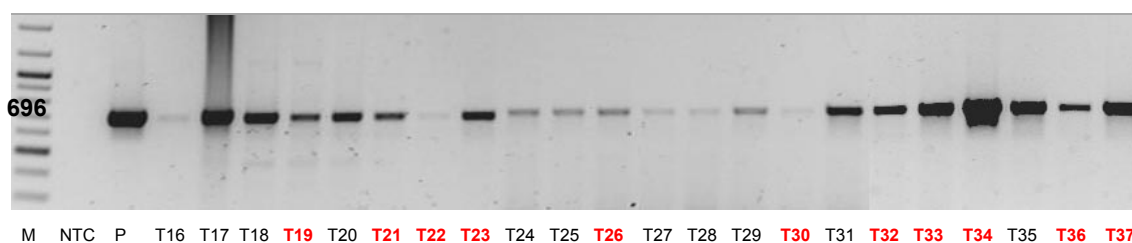


Abbildung 3.25: PCR-Amplifikation des *smRS-GFP*-Gens bei putativ transgenen *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) selektiert alleinig über GFP

Die Amplifizierung erfolgte mit dem Primerpaar GFP neu (M = 100bp Marker; P = pMen65smRS-GFP; NTC = No Template Control; Wasserkontrolle). Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T26) kennzeichnen die einzelnen Transformanden

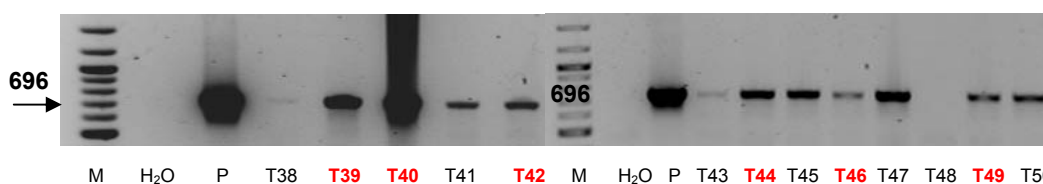


Abbildung 3.26: PCR-Amplifikation des *smRS-GFP*-Gens bei putativ transgenen *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) selektiert mit Kanamycin und GFP

Die Amplifizierung erfolgte mit dem Primerpaar GFP neu (M = 100bp Marker; P = pMen65smRS-GFP; NTC = No Template Control; Wasserkontrolle)
Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T42) kennzeichnen die einzelnen Transformanden

Das *nptII*-Gen und das daraus abgeleitete Primerpaar *nptII* wurde zum PCR-Amplifikation verwendet, welches zu einem Amplifikationsprodukt von 512 bp führte und bei Transformationen mit pMen65smRS-GFP als Selektionsmarker übertragen

wurde. Abbildungen 3.27 und 3.28 zeigen PCR-Amplifikationen mit dem Primerpaar *nptII* bei über Kanamycin und GFP selektierten Sprossen, die teilweise zuvor GFP-positiv getestet waren. Jede Spur des Agarosegel kennzeichnet unterschiedliche transformierte Pflanzen, rot unterlegte Buchstaben-Zahlenkombinationen charakterisieren die später im Southern Blot analysierten Pflanzen. Hierbei konnte für die später im Southern Blot analysierten 17 Pflanzen auch ein klarer Nachweis für das *nptII*-Gen erbracht werden, diese Pflanzen hatten eine klare Bande bei 512 bp.

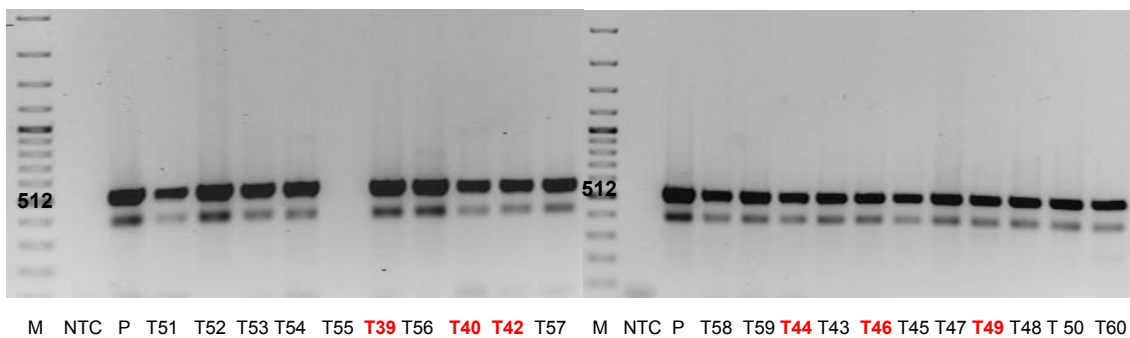


Abbildung 3.27: PCR-Amplifikation des *nptII*-Gens bei putativ transgenen *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) selektiert mit Kanamycin und GFP

Die Amplifizierung erfolgte mit dem Primerpaar *nptII* (M=100bp Marker; P = pMen65smRS-GFP; NTC = No Template Control; Wasserkontrolle)

Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T42) kennzeichnen die einzelnen Transformanden

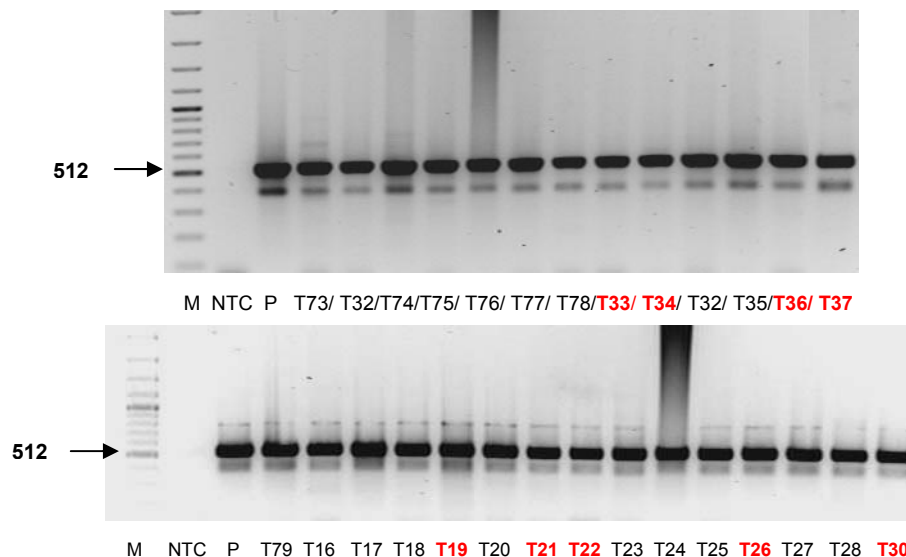


Abbildung 3.28: PCR-Amplifikation des *nptII*-Gens bei putativ transgenen *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) selektiert allein über die Expression von GFP

Die Amplifizierung erfolgte mit dem Primerpaar *nptII* (M=100bp Marker; P = pMen65smRS-GFP; NTC = No Template Control; Wasserkontrolle)

Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T19) kennzeichnen die einzelnen Transformanden

3.3.5.3 Southern Hybridisierung zum Nachweis der Integration von *smRS-GFP*

Die transgenen Pflanzen wurden hinsichtlich der Integration des eingeführten *smRS-GFP*-Gens ins Pflanzengenom und der Anzahl integrierter Genkopien mit Hilfe von Southern Hybridisierung untersucht. Das Restriktionsenzym *HindIII* besitzt eine singuläre Erkennungssequenz in der T-DNA des Vektors pGreenII0229smRS-GFP und pMen65smRS-GFP. Der Nachweis des *smRS-GFP*-Gens erfolgte daher nach vorheriger Restriktionsspaltung der pflanzlichen DNA mit dem genannten Enzym. Das Restriktionsenzym zur Restriktion der genomischen Pflanzen-DNA wurde so gewählt, dass es nicht in der Zielsequenz des *smRS-GFP* schneidet. Jedes nach Southern Hybridisierung sichtbare Fragment repräsentierte somit eine Integrationsstelle des Transgens im Pflanzengenom.

3.3.5.3.1 Transformationen mit pGreenII0229*smRS-GFP*

Eine Auswahl von sieben transgenen über PCR positiv auf *smRS-GFP* getesteten (siehe Abb. 3.24) und auf phosphinothricinhaltigem Medium gewachsenen Petunien-Sprossen des Genotyps 'Famous Electric Purple' wurde anhand von Southern Hybridisierung auf die Integration und Kopienzahl des *smRS-GFP* untersucht. Das Restriktionsenzym *HindIII* wurde zur Restriktionsspaltung der DNA verwendet. Die Mindestgröße des Signals betrug 1420 bp. Es wurde wie in 2.22 beschrieben vorgegangen. Die ausgewählten Transformanten sind aus einem Transformationsereignis pGreenII0229 im *A. tumefaciens*-Stamm EHA105 hervorgegangen.

Das Ergebnis der Southern Hybridisierung von sieben unabhängig transgenen *Petunia* Cultivars-Sprossen der Sorte 'Famous Electric Purple' zeigt Abbildung 3.29 und Tabelle 3.9.

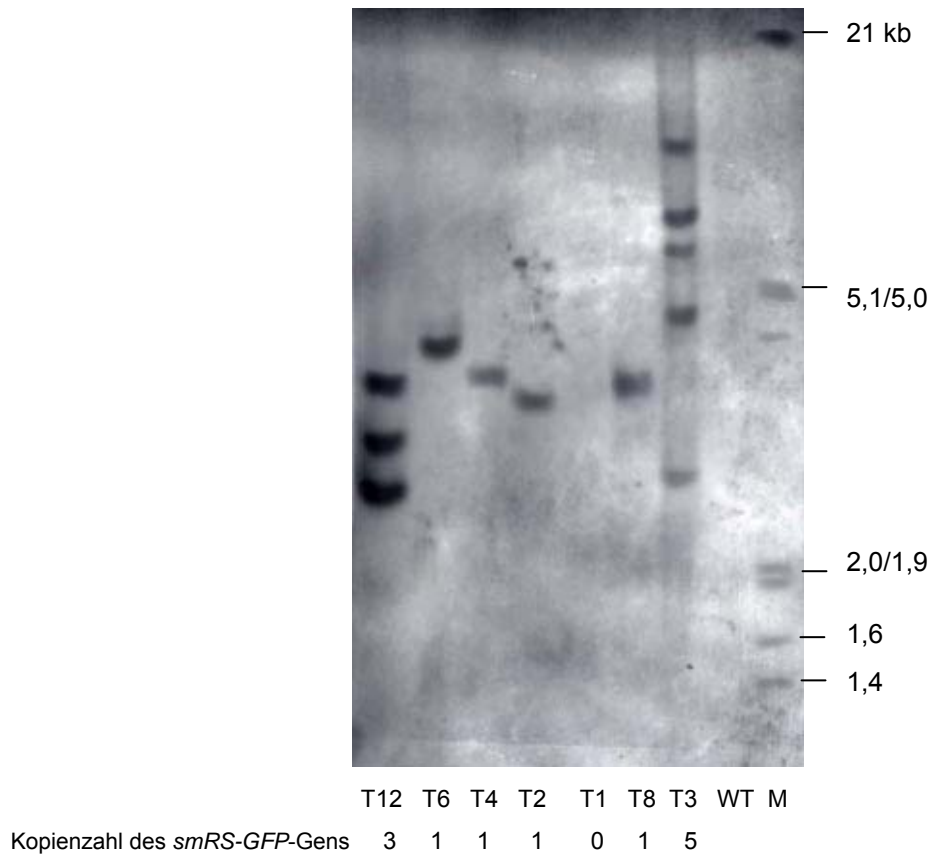


Abbildung 3.29: Autoradiogramm zum Nachweis der Integration und Kopienzahl des *smRS-GFP*-Gens in sieben *smRS-GFP* putativ transgenen *Petunia*-Sprossen der Sorte 'Famous Electric Purple' transformiert mit pGreenII0229*smRS-GFP* in EHA105 mittels Southern Hybridisierung (*smRS-GFP*-Sonde/*Hind*III)

Die Buchstaben-Zahlenkombinationen kennzeichnen die einzelnen Transformanten (z. B. T12), M = DIG-markierter Weight Marker III (Roche), WT = Kontrollpflanze 'Famous Electric Purple'

Tabelle 3.9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Southern Hybridisierung der PCR positiven *Petunia* 'Famous Electric Purple' (pGreenII0229*smRS-GFP* in EHA105)

Pflanze	Kopienzahl des <i>smRS-GFP</i> -Gens
T12	3
T6	1
T4	1
T2	1
T1	0
T8	1
T3	5
WT	0

Das Ergebnis der Southern Hybridisierung wies in den unabhängigen, getesteten Pflanzen eine unterschiedliche Anzahl an Kopien des *smRS-GFP*-Gens auf, hierbei variierte die Anzahl von keiner Integration, obwohl PCR positiv, bis zu fünf Kopien. Von den sieben untersuchten Pflanzen zeigten vier Pflanzen eine Kopie (T6, T4, T2 und T8), eine Pflanze (T12) drei Kopien. Die Pflanze T3 zeigte fünf Kopien und T1 keinerlei Integration des *smRS-GFP*.

3.3.5.3.2 Transformationen mit pMen65smRS-GFP

Eine Auswahl von 17 transgenen, PCR positiven (siehe Abbildung 3.25 bis 3.28) und auf kanamycinhaltigem Sprosskulturmedium gewachsenen Petunien-Sprossen des Genotyps 'Famous Lilac Dark Vein' wurden anhand von Southern Hybridisierung auf die Integration von *smRS-GFP* untersucht (Abb. 3.30). Die Mindestgröße des Signals betrug hierfür 3200 bp. Diese Sprosse stammten aus einem Transformationsversuch mit pMen65smRS-GFP im *A. tumefaciens*-Stamm ABI und wurden auf Kanamycin und GFP selektiert oder alleinig über die Expression von smRS-GFP selektiert. Anhand der Southern Hybridisierung wurden sechs Sprosse, die über Kanamycin und GFP und elf Sprosse, die alleinig über die Expression von GFP selektiert wurden, auf die Integration von *smRS-GFP* untersucht. Das Ergebnis nach Southern Hybridisierung von 'Famous Lilac Dark Vein' transformiert mit dem Vektor pMen65smRS-GFP zeigt Abbildung 3.30 und Tabelle 3.10.

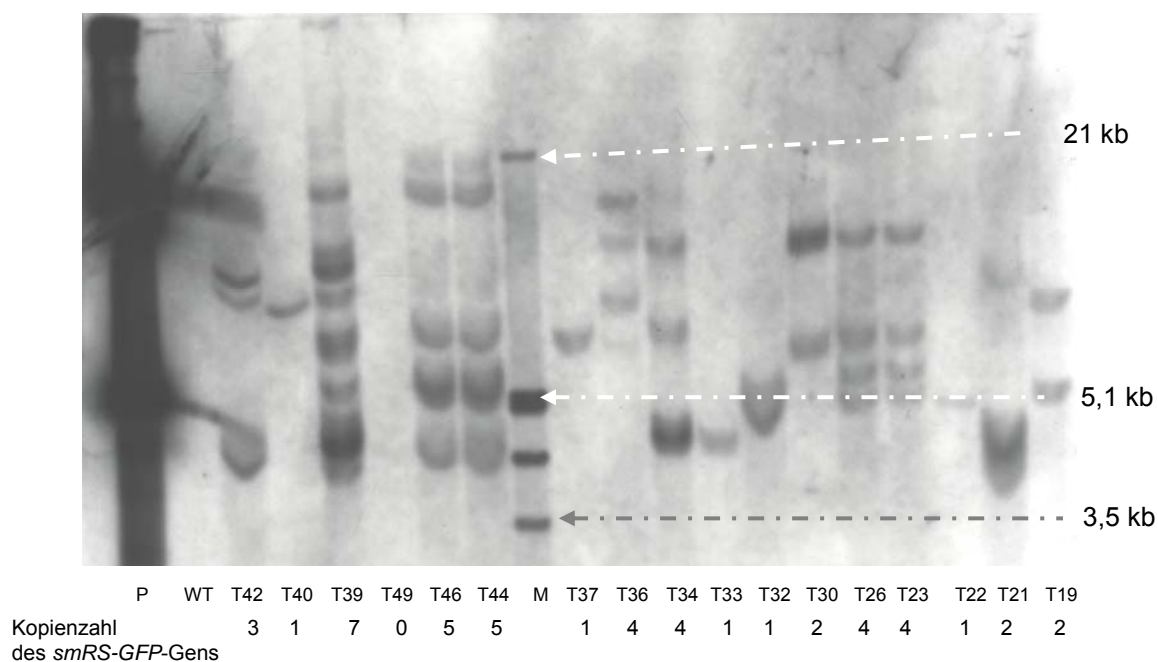


Abbildung 3.30: Autoradiogramm zum Nachweis der Integration des *smRS-GFP*-Gens in die genomische DNA transgener *Petunia* 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) mittels Southern Hybridisierung (*smRS-GFP*-Sonde/*Hind*III)

Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T42) kennzeichnen die einzelnen Transformanten, M = DIG-markierter Weight Marker III (Roche), WT = Kontrollpflanze 'Famous Lilac Dark Vein', P = pMen65smRS-GFP

Tabelle 3.10: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Southern Hybridisierung auf die Integration von *smRS-GFP* der PCR positiven *Petunia* 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI)

Pflanze	Selektion	Kopienzahl des <i>smRS-GFP</i> -Gens
WT	-	0
T42	Kan+GFP	3
T40	Kan+GFP	1
T39	Kan+GFP	7
T49	Kan+GFP	0
T46	Kan+GFP	5
T44	Kan+GFP	5
T37	GFP	1
T36	GFP	4
T34	GFP	4
T33	GFP	1
T32	GFP	1
T30	GFP	2
T26	GFP	4
T23	GFP	4
T22	GFP	1
T21	GFP	2
T19	GFP	2

Die Negativ-Kontrolle in Form einer nicht transgenen *Petunia*-Pflanze (WT) zeigte nach Hybridisierung mit der DIG-markierten *smRS-GFP*-Sonde kein Signal. Die transgenen Pflanzen (T42, T40, T39, T49, T46 und T44) wurden mit Kanamycin und GFP (Kan+GFP) selektiert, während die Transgenen T37, T36, T34, T33, T32, T30, T26, T23, T22, T21 und T19 alleinig über die Expression von *smRS-GFP* (GFP) selektiert wurden. Hierbei zeigte sich bei Pflanzen über Kanamycin und GFP sowie alleinig über GFP selektiert eine Variation der Kopienzahl des *smRS-GFP* von null bis sieben. In der Variante Kan+GFP zeigte die Pflanze T40 einen singulären Integrationsort, T39 dagegen sieben Integrationen des *smRS-GFP*-Gens, T49 keine Integration und die Pflanzen T46 und T44 fünf Integrationen mit identischem Bandenmuster. Pflanze T49 zeigte nicht das erwartete Signal, da diese Pflanze aber über PCR positiv auf *smRS-GFP* und *nptII* getestet wurde und aufgrund ihrer GFP-Expression vereinzelt wurde, sind zumindest Teile des Vektors integriert. In der Variante GFP wiesen die Pflanzen T37, T33, T32 und T22 eine Kopie des *smRS-GFP*-Gens auf, Pflanzen T30, T21, T19 zwei Kopien und die T36, T34, T26 und T23 vier Kopien. T26 und T23 wiesen dabei ein identisches Bandenmuster auf. Beim Auftreten von identischen Bandenmustern handelt es sich offenbar um denselben Klon.

Anhand einer weiteren Southern Hybridisierung mit transformierten Sprossen (pMen65smRS-GFP in *A. tumefaciens* ABI) des Petunien-Genotyp 'Famous Electric Purple' sollte geklärt werden, ob die Vielzahl an multiplen Integrationen und identischen Bandenmustern der vorangegangenen Hybridisierung verworfen oder bestätigt werden konnten. Eine Auswahl von 17 transgenen, PCR positiv getesteten und auf kanamycinhaltigem Sprosskulturmedium gewachsenen Petunien-Sprosse des Genotyps 'Famous Electric Purple', transformiert mit dem Vektor pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm ABI, wurde ebenfalls auf die Integration von *smRS-GFP* über Southern Hybridisierung untersucht. Die hierbei getesteten Sprossen wurden wieder entweder über Kanamycin und GFP (Kan+GFP) oder alleinig über GFP-Expression (GFP) selektiert. Die Restriktion genomischer DNA der Transformanden sowie der Kontrolle 'Famous Electric Purple' wurde mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* durchgeführt. Abbildung 3.31 zeigt die Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für das *smRS-GFP*-Gen. Die Probenbeschriftung und Zusammenfassung der Ergebnisse nach Southern Hybridisierung kann Tabelle 3.11 entnommen werden.

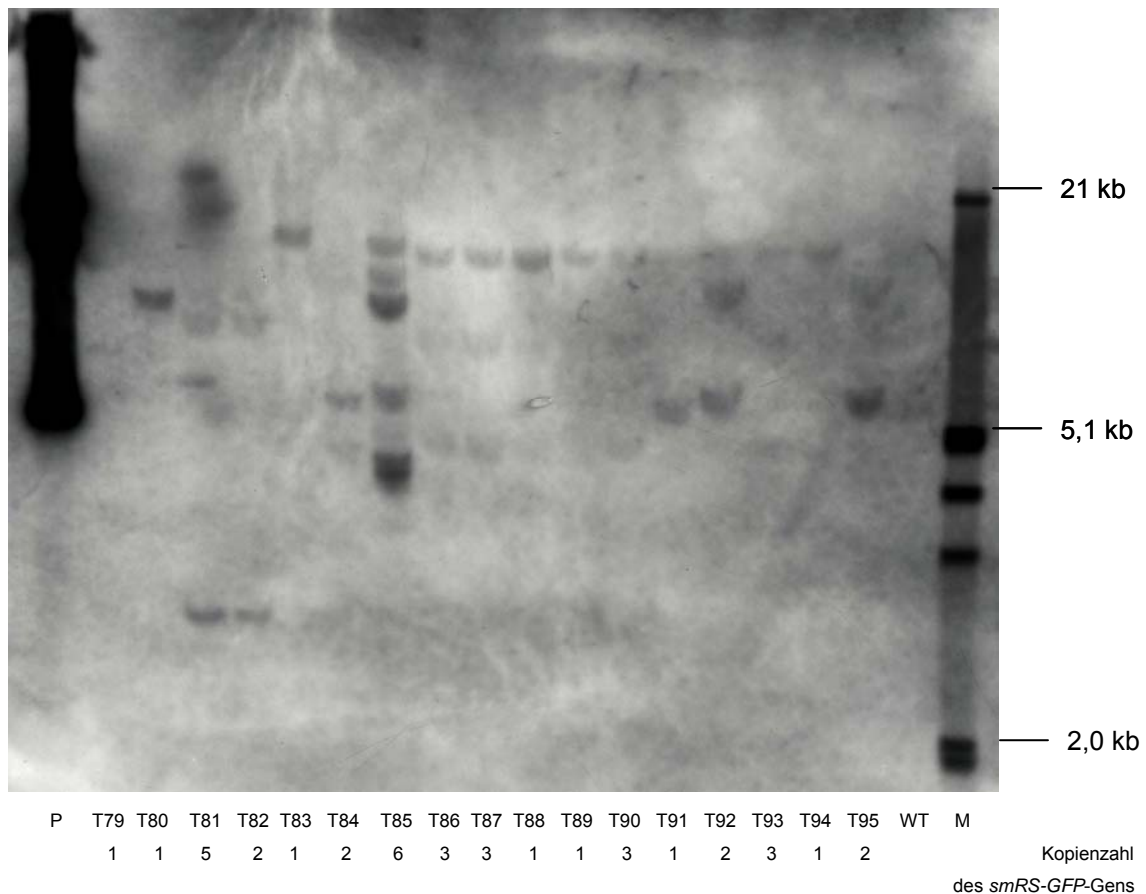


Abbildung 3.31: Autoradiogramm zum Nachweis der Integration des *smRS-GFP*-Gens in die genomische DNA putativ transgener *Petunia* 'Famous Electric Purple' (pMen65smRS-GFP in ABI) mittels Southern Hybridisierung (*smRS-GFP*-Sonde/*HindIII*)

Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T79) kennzeichnen die einzelnen Transformanten, M = DIG-markierter Weight Marker III (Roche), WT = Kontrollpflanze 'Famous Electric Purple', P = pMen65smRS-GFP

Die Variante Kan+GFP wies nach Hybridisierung drei transgene Sprosse mit einer singulären Integration (T79, T80, T83), zwei (T82, T84) mit zwei Integrationen und zwei Sprosse (T81 und T85) mit fünf und mehr Integrationen auf. In der Variante GFP konnten vier Sprosse (T88, T89, T91, T94) mit einer Kopie des *smRS-GFP*, zwei (T92, T95) mit zwei Kopien und vier transgene Sprosse (T86, T87, T90, T93) mit drei Kopien identifiziert werden. Allerdings trat in dieser Variante vermehrt das Vorkommen von identischen Bandenmustern auf. Identische Bandenmuster wiesen vier Transformanten (T86=T87, T92=T95) mit zwei Kopien, drei Sprosse (T88=T89=T94) mit einer singulären Integration auf. Unabhängige transgene Sprosse waren lediglich T91 (eine Kopie), T93 (drei Kopien) und T90 (drei Kopien). Die Negativ-Kontrolle einer nicht transgenen *Petunia* 'Famous Electric Purple' (WT) zeigte nach Southern Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde kein Signal.

Tabelle 3.11: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Southern Hybridisierung bezüglich der Integration von *smRS-GFP* der PCR positiven *Petunia* 'Famous Electric Purple' (pMen65smRS-GFP in ABI)

Pflanze	Selektion	Kopienzahl des <i>smRS-GFP</i> -Gens
T79	Kan+GFP	1
T80	Kan+GFP	1
T81	Kan+GFP	5
T82	Kan+GFP	2
T83	Kan+GFP	1
T84	Kan+GFP	1
T85	Kan+GFP	6
T86	GFP	3
T87	GFP	3
T88	GFP	1
T89	GFP	1
T90	GFP	3
T91	GFP	1
T92	GFP	2
T93	GFP	3
T94	GFP	1
T95	GFP	2
WT	-	0

3.3.5.4 GFP-Expression

3.3.5.4.1 Transformationen mit pGreenII0229smRS-GFP

Nach Vorliegen der Informationen aus der Southern Hybridisierung wurden die In-vitro-Petuniensprosse fluoreszenzmikroskopisch auf *smRS-GFP*-Expression untersucht. Abbildung 3.32 zeigt einen Petunienspross mit drei Kopien des *smRS-GFP*-Gens (T12; siehe Tabelle 3.9), Abbildung 3.33 einen mit einer Kopie (T6, siehe Tabelle 3.9) und Abbildung 3.34 einen ohne Integration (T1, siehe Tabelle 3.9) des *smRS-GFP*-Gens.

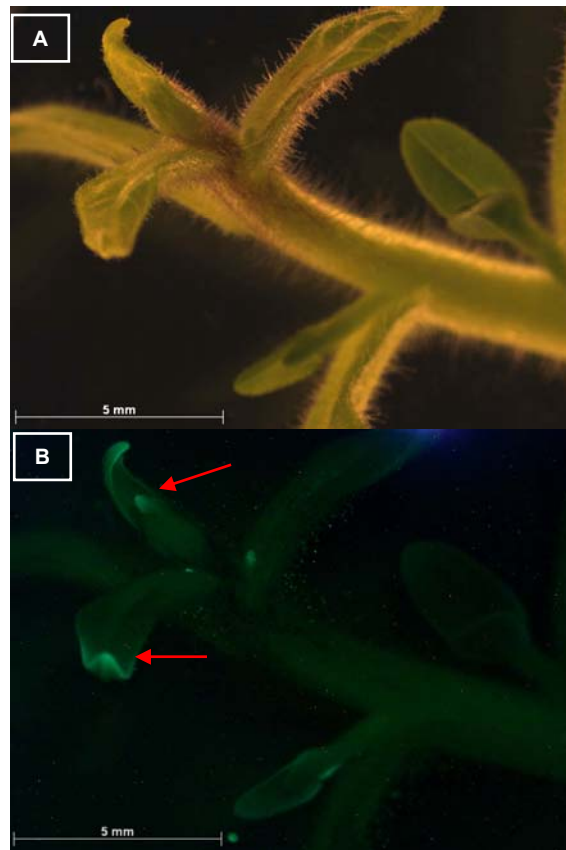


Abbildung 3.32: GFP-Expression von *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' (T12) (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) mit drei Kopien von *smRS-GFP* (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht)

Die Kopienzahl des *smRS-GFP* in der Pflanze hatte einen deutlichen Effekt auf die Expression des Gens. Mit zunehmender Kopienzahl in den Pflanzen nahm die Expression deutlich ab und wurde nur noch am Blattrand partiell ausgeprägt (Abb. 3.32). Petuniensprosse mit einer Kopie (Abb. 3.33) des *smRS-GFP* zeigten besonders stark in jungen Blättern und Seitenknospen exprimierte Fluoreszenz.

Die Pflanze T1 zeigte keine Integration des *smRS-GFP* nach Southern Hybridisierung, obwohl diese PCR positiv getestet wurde. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen dieses Sprosses zeigten fleckenartige GFP-Expression (Abbildung 3.34).

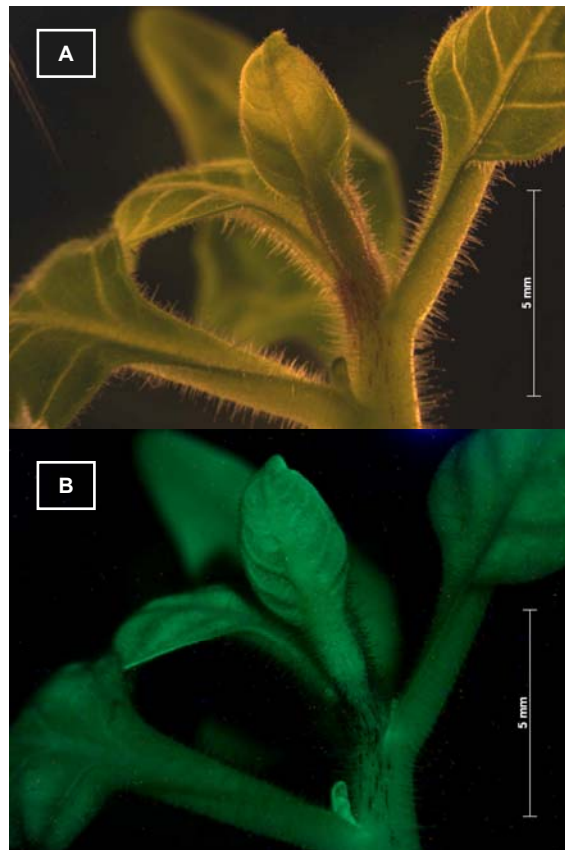


Abbildung 3.33: GFP-Expression von *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' (T6) (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) mit einer Kopie von *smRS-GFP* (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht)

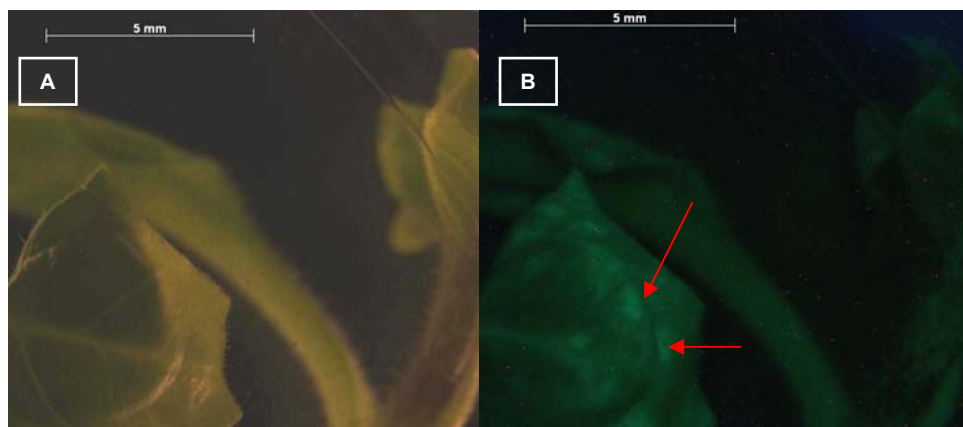


Abbildung 3.34: GFP-Expression einer Pflanze von *Petunia* Genotyp 'Famous Electric Purple' (T1) (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) für die im Southern Hybridisierungen keine Integration des *smRS-GFP* (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht) nachweisbar war

Die *in vitro* bewurzelten transgenen Pflanzen sowie Kontrollpflanzen konnten erfolgreich ins Gewächshaus überführt werden und entwickelten sich zu morphologisch normalen Pflanzen (Abbildung 3.35). Jedoch konnte alleinig an der transgenen Petunie mit einer Kopie (T6) auch unter Gewächshausbedingungen smRS-GFP-Fluoreszenz mikroskopisch detektiert werden.



Abbildung 3.35: Phänotypischer Vergleich transgener Pflanzen (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) mit unterschiedlicher Kopienzahl des *smRS-GFP* (A: eine Kopie, T6; B: drei Kopien, T12) und der Kontrollpflanze *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' (C)

3.3.5.4.2 Transformationen mit pMen65smRS-GFP

Nach 3, 7, 10, 14 und 21 Tagen wurden die transformierten Blattexplantate auf GFP-Expression unter einem Fluoreszenzmikroskop bonitiert. Hierbei konnten für alle vier Petunien Genotypen putativ transgene Sprosse sowohl in der Variante Kan+GFP als auch ohne Kanamycin-Selektion GFP detektiert werden (siehe Tabelle 3.2 bis 3.5). Abbildung 3.36 (A) zeigt ein *Petunia*-Explantat von 'Famous Lilac Dark Vein' zehn Tage nach Transformation (pMen65smRS-GFP) im Durchlicht. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte klar GFP-Expression in dem gebildeten Kallus nachgewiesen werden (Abbildung 3.36, B).

Abbildung 3.37 und 3.38 legen die klare Erkennbarkeit von GFP exprimierenden (potentiell transgenen) Sprossen gegenüber nicht GFP exprimierenden Sprossen dar. Eine eindeutige Detektion potentiell transgener Sprosse ohne Selektion mit Hilfe von Herbizid- oder Kanamycinresistenzgenen ist bei Petunien über GFP möglich.

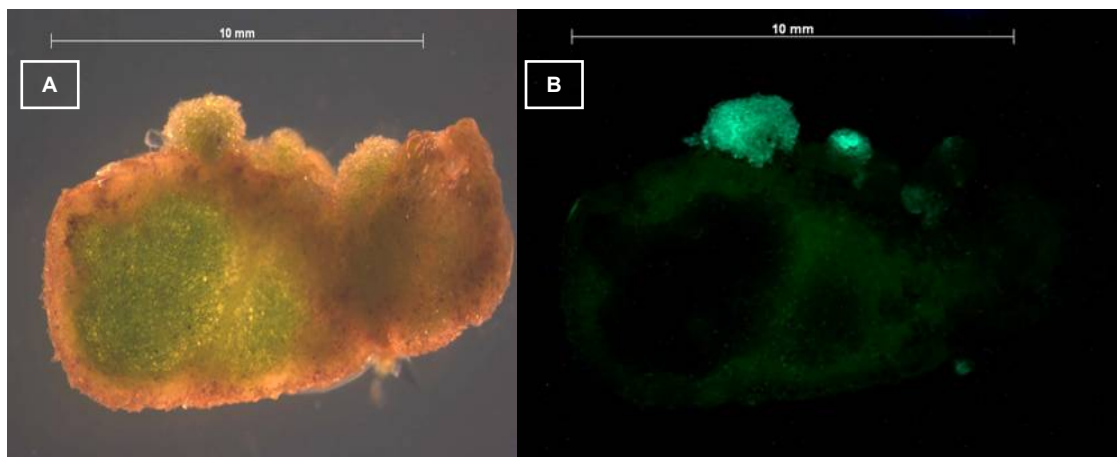


Abbildung 3.36: Transformiertes Petunien-Explantat 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) ohne Kanamycinselektion zehn Tage nach Kokultur (Durchlichtaufnahme (A), Fluoreszenzaufnahme (B))

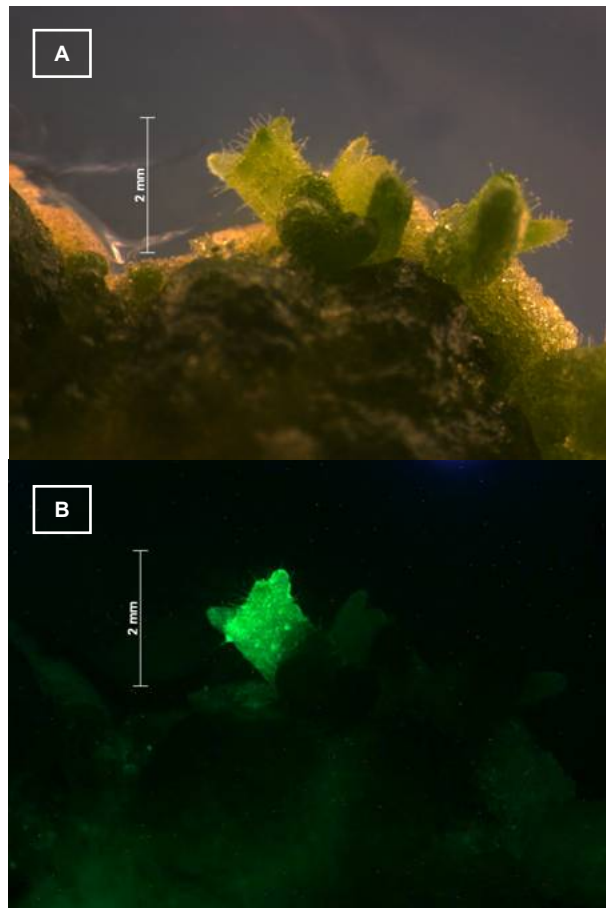


Abbildung 3.37: SmRS-GFP-Expression eines regenerierten *Petunia* 'Famous Lilac Dark Vein' Sprosses drei Wochen nach Kokultur (pMen65smRS-GFP in ABI) ohne Kanamycinselektion (Durchlicht (A); Fluoreszenzaufnahme (B))

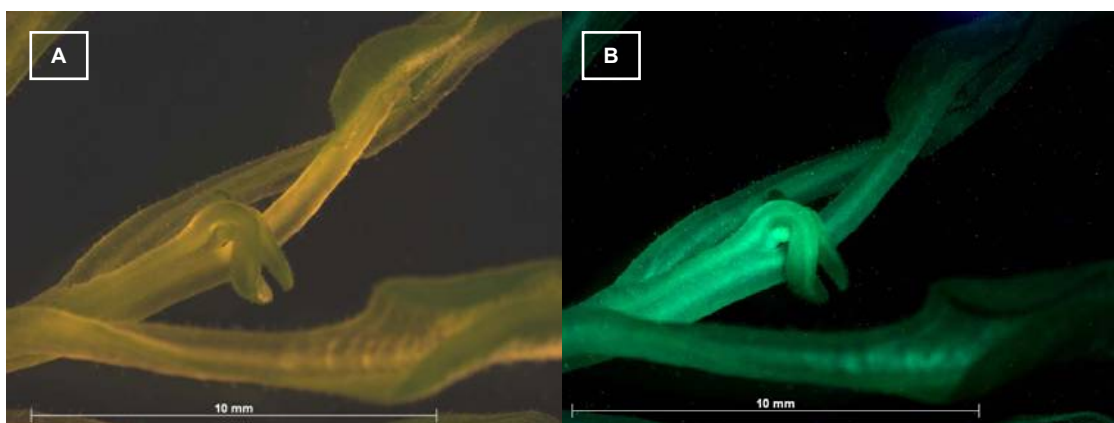


Abbildung 3.38: SmRS-GFP-Expression eines *Petunia* Sprosses ('Famous Electric Purple', transformiert mit pMen65smRS-GFP in ABI) ohne Kanamycinselektion (Durchlicht (A); Fluoreszenzaufnahme (B))

Die Kopienzahl des *smRS-GFP* hatte wie bereits für die Transformationsversuche mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm EHA105 erwähnt, bei *Petunia* Genotyp 'Famous Electric Purple' einen deutlichen Effekt auf die Expression

des Gens. In Transformationsversuchen mit dem Vektor pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm ABI bei *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' zeigte sich in Pflanzen mit einer Kopie des *smRS-GFP* durchgängig exprimierte Fluoreszenz, die in den jungen Blättern besonders stark war (Abb. 3.39). Pflanzen mit zwei oder mehr Kopien zeigten eine Abnahme der Expression, welche nur noch partiell am Blattrand oder in Knospen (Abb. 3.40) ausgeprägt war.

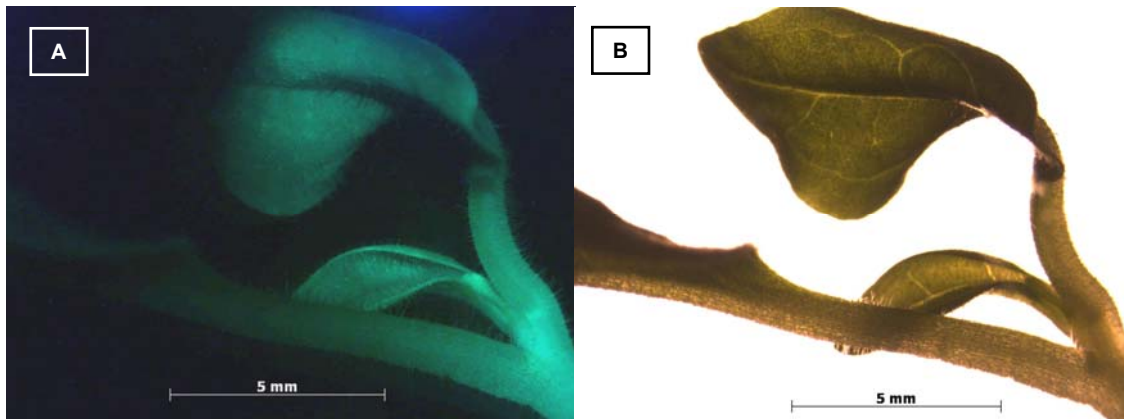


Abbildung 3.39: GFP-Expression einer Pflanze von *Petunia* Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' (T33; pMen65smRS-GFP in ABI), für die im Southern Hybridisierungen eine Kopie des *smRS-GFP* nachweisbar war (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht)

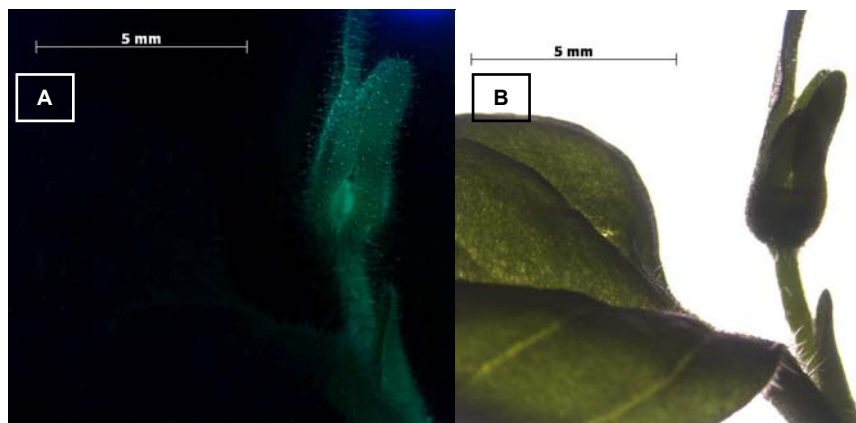


Abbildung 3.40: GFP-Expression allein in Seitenknospen von *Petunia* Genotyp 'Famous Lilac Dark Vein' (T26) transformiert mit pMen65smRS-GFP in ABI, für die in Southern Hybridisierung vier Kopien von *smRS-GFP* nachgewiesen war (A: Durchlicht; B: Fluoreszenzlicht)

Diese *in vitro* bewurzelten transgenen Pflanzen konnten erfolgreich ins Gewächshaus überführt werden und entwickelten sich zu teils morphologisch normalen Pflanzen (Abbildung 3.41, 3.42). Jedoch zeigten einige transgenen Pflanzen mit einer, zwei und vier Integrationen in der frühen Pflanzenentwicklung leichte Abweichungen zu der Kontrollpflanze (Abb. 3.43), aber auch zu transgenen Pflanzen mit der gleichen Anzahl

an Integrationen. Abbildung 3.41 zeigt zwei *Petunia* Genotypen 'Famous Lilac Dark Vein' transformiert mit dem Vektor pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm ABI mit einer nachgewiesenen singulären Integration. Hier entwickelte sich die Pflanze T33 (Abb. 3.41, A) gleich der Kontrollpflanze (Abbildung 3.43), Pflanze T22 (Abb. 3.41, B) hatte stark vergrößerte Blätter mit Blattdeformationen und Störungen in der Chlorophyllsynthese.

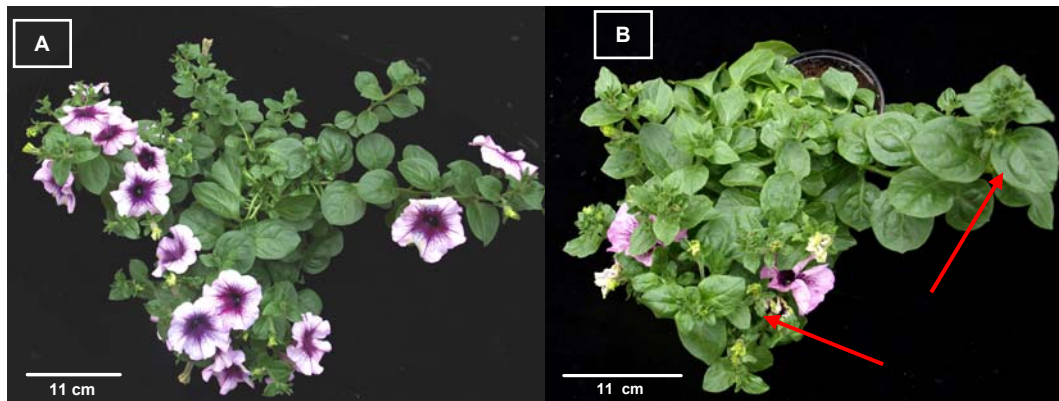


Abbildung 3.41: Phänotypischer Vergleich transgener *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) mit einer Kopie des *smRS-GFP* (A: T33; B: T22)

Vergrößerte Blätter konnten auch an Pflanze T19 mit zwei Kopien (Abbildung 3.42, B), festgestellt werden, wo hingegen die Pflanze T30 (Abb. 3.42, A) sich gleich der Kontrollpflanze (Abb. 3.43) darstellte.

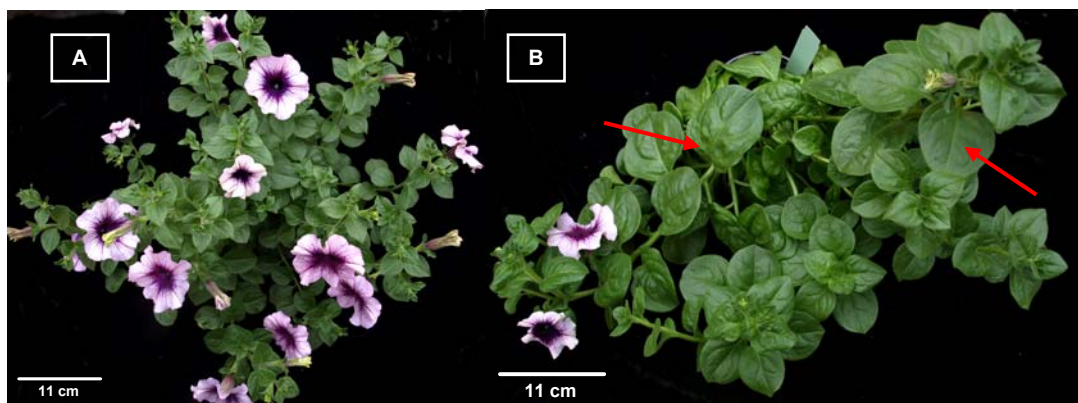


Abbildung 3.42: Phänotypischer Vergleich transgener *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' mit zwei Kopien des *smRS-GFP* (A: T30; B: T19) hervorgegangen aus Transformationsversuchen mit dem Vektor pMen65smRS-GFP in ABI



Abbildung 3.43: Nicht transgene Kontrollpflanze *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein'

3.3.5.5 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Transkription des *smRS-GFP*-Gens in transformierten Pflanzen wurde mit Hilfe der OneStep RT-PCR (siehe 2.21) nachgewiesen. Bei dieser Methode erfolgt direkt nach der reversen Transkription die spezifische Amplifikation, so dass die vollständige Reaktion in einem Ansatz stattfindet. Die vorher über Southern Hybridisierung (3.3.5.3) und GFP-Expression (3.3.5.4) getesteten *Petunia* Cultivars der Sorte 'Famous Electric Purple' (transformiert mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) und 'Famous Lilac Dark Vein' (pMen65smRS-GFP in ABI) wurden auf Transkription des *smRS-GFP* (smRS-GFP sense/antisense Primer) und der ribosomalen Untereinheit 18S (18S-Primer) analysiert. Die OneStep-RT-PCR wurde in drei Wiederholungen mit beiden Primerpaaren durchgeführt.

Abbildung 3.44 zeigt die RT-PCR Amplifikation des *smRS-GFP*-Gens. Für die hier untersuchten *smRS-GFP* transgenen Pflanzen aus zwei Transformationsversuchen mit unterschiedlichen Vektoren und *Agrobacterium*-Stämmen konnte das erwartete Fragment von 696 bp mittels OneStep RT-PCR in allen untersuchten Pflanzen amplifiziert werden. In den nicht-transgenen Kontrollen (WT) von *Petunia* Cultivars 'Famous Lilac Dark Vein' und 'Famous Electric Purple' wurde dieses 696 bp Fragment nicht amplifiziert. Expressionsunterschiede abhängig von der Kopienzahl des transgenen Sprosses konnten hier nicht nachgewiesen werden, da es sich um eine Endpunktanalyse handelte. Für die putativ transgene Pflanze T1 (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) konnte eine Transkription des *smRS-GFP* mittels RT-PCR nachgewiesen werden, genauso wie bei allen anderen untersuchten Sprossen.

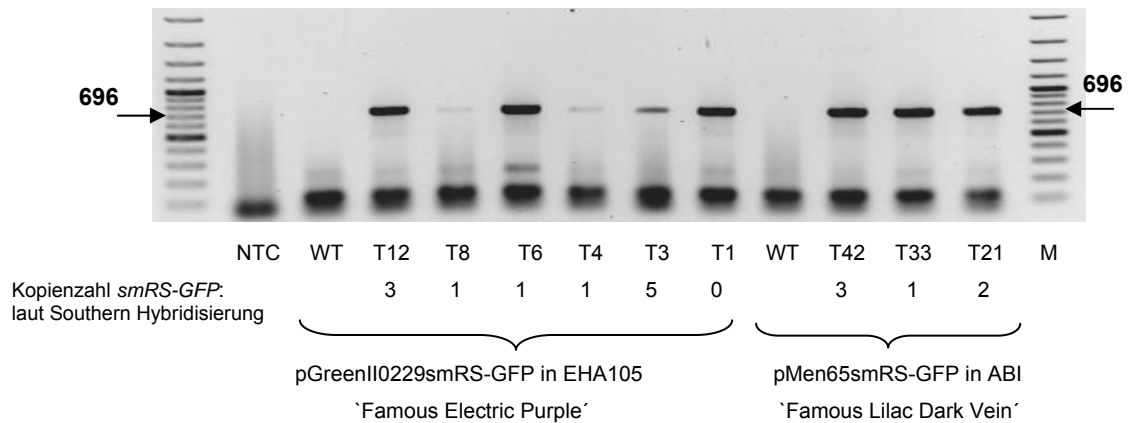


Abbildung 3.44: OneStep RT-PCR Amplifikation des *smRS-GFP*-Gens mit dem Primerpaar GFP neu bei putativ transgenen *Petunia* Cultivars

Die Amplifizierungen erfolgten mit dem Primerpaar GFP neu (M = 100bp Marker; NTC = No Template Control; Wasserkontrolle; WT = Wild Type; nicht transgene Kontrolle). Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T12) kennzeichnen die einzelnen Transformanten

Abbildung 3.45 verweist auf die zur Kontrolle durchgeführte OneStep RT-PCR mit den 18S-Primern als endogene Kontrolle, die die Expression dieses Housekeeping-Gens in transgenen- und Kontrollpflanzen in gleicher Intensität nachweisen konnte.

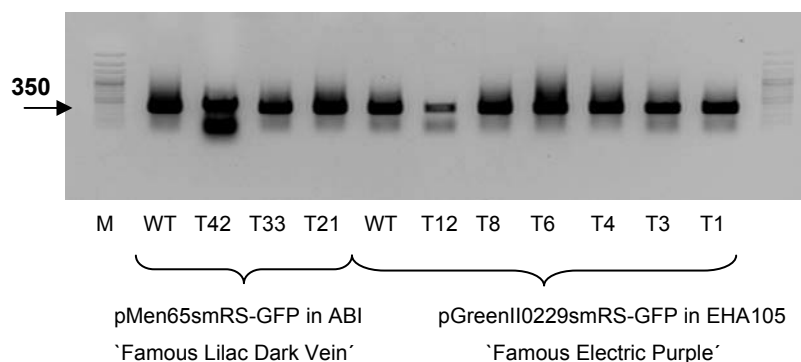


Abbildung 3.45: OneStep RT-PCR-Amplifikation mit dem 18S-Primer bei putativ transgenen *Petunia* Cultivars

Die Amplifizierungen erfolgten mit dem Primerpaar 18S; (M = 100bp Marker; WT = Wild Type; nicht transgene Kontrolle). Die Buchstaben-Zahlenkombination (z. B. T12) kennzeichnen die einzelnen Transformanten

3.4 A. *tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Pelargonium*

Der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Gentransfer wurde an Blatt- und später auch an Blattstielexplantaten von *Pelargonium zonale* Cultivars und *Pelargonium peltatum* Cultivars durchgeführt.

3.4.1 Ermittlung der geeigneten Selektionsbedingungen

3.4.1.1 Phosphinothricin-Selektion

Zur Ermittlung der geeigneten Selektionsbedingungen bei *Pelargonium* wurde Phosphinothricin in den Konzentrationen 0 mg/L, 0,5 mg/L und 1,0 mg/L dem Regenerationsmedium hinzugefügt.

Abbildung 3.46 zeigt, dass das Regenerationsverhalten der einzelnen Genotypen in der Kontrolle (0 mg/L) variierte. Der Genotyp 'Katinka' zeigte eine Sprossregeneration von 92 %, 'Royal Blue' 96 % und der Genotyp 'Sailing' lediglich 62 %. Der *Pelargonium peltatum* Genotyp 'Royal Blue' zeigte bei einer Phosphinothricinkonzentration von 0,5 mg/L im Regenerationsmedium eine Sprossregeneration von 18 %, während der *Pelargonium zonale* Genotyp 'Katinka' eine Sprossregeneration von 14 % und 'Sailing' 4 % Sprossregeneration aufwies. Eine höhere Sensitivität bei Verwendung von Blattexplantaten gegenüber Phosphinothrin (siehe Abb. 3.47) zeigte sich bei *Pelargonium zonale* Genotyp 'Sailing'.

Abbildung 3.47 zeigt, dass es ab einer Konzentration von 0,5 mg/L Phosphinothricin im Regenerationsmedium zu eingeschränkter Regeneration der Blattexplantate im Gegensatz zur Kontrolle kam und diese Konzentration als ausreichend zur Selektion bei *Pelargonium zonale* Cultivars war. Diese ermittelte Konzentration an Phosphinothricin wurde in folgenden Transformationsversuchen mit pGreenII0229smRS-GFP für *Pelargonium zonale* Cultivars und *Pelargonium peltatum* Cultivars zur Selektion verwendet.

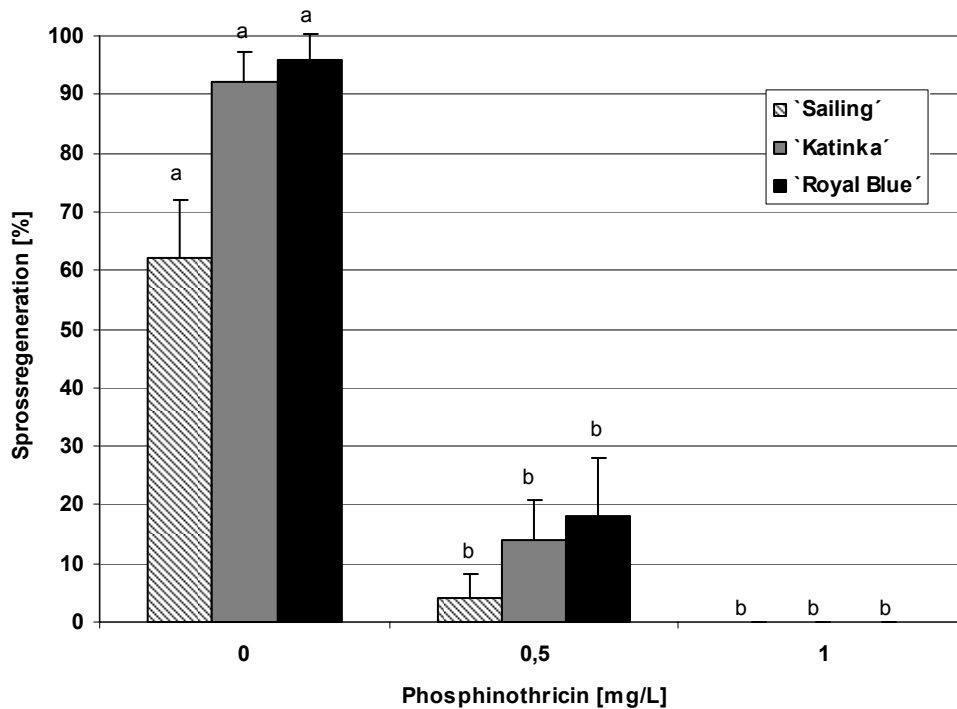


Abbildung 3.46: Wirkung von Phosphinothricin (PPT) auf die Sprossregeneration unter Verwendung von Blattexplantaten bei *Pelargonium zonale* und *Pelargonium peltatum* Cultivars nach drei Wochen

Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit jeweils 60 Explantaten

Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant über einseitig getestete 95 % profile-likelihood Konfidenzintervalle für die Odds-Ratio von der kontrollbehandlung. Zur Einhaltung des globalen Fehler-Niveaus wurde das Bonferroni-Verfahren angewandt.

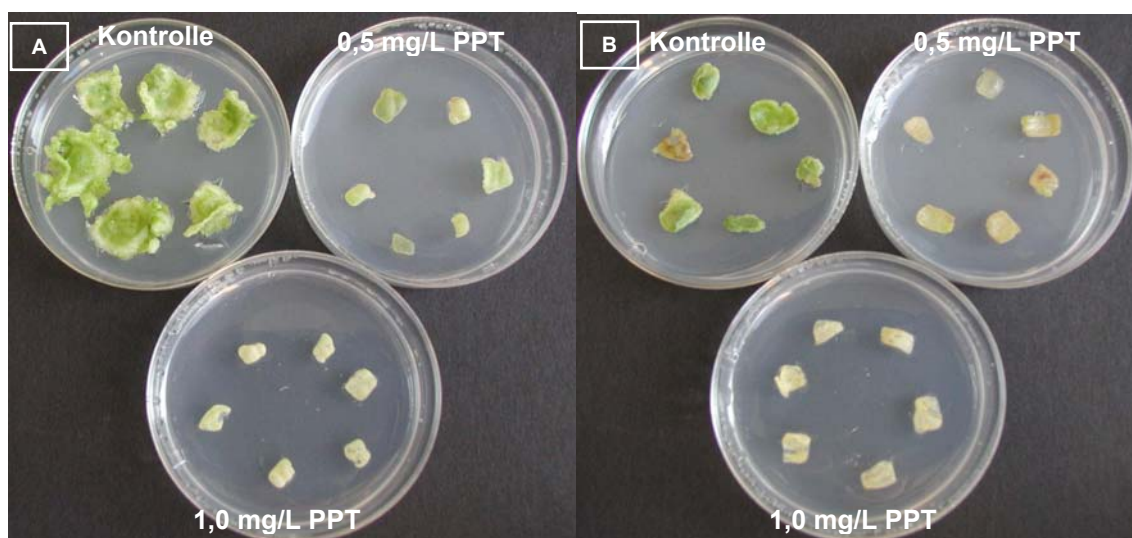


Abbildung 3.47: Effekt steigender Phosphinothricin (PPT) Konzentrationen auf die Regeneration nicht-transformierter Blattexplantate von *Pelargonium zonale* 'Katinka' (A) und 'Sailing' (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen

3.4.1.2 Kanamycin-Selektion

Zur Ermittlung der geeigneten Selektionsbedingungen bei *Pelargonium*-Blattexplantaten wurde Kanamycin in den Konzentrationen 0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L und 200 mg/L dem Regenerationsmedium hinzugefügt. *Pelargonium zonale* Cultivars und *Pelargonium peltatum* Cultivars unterschieden sich wiederum in ihrer Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin. Während Blattexplantate des *Pelargonium peltatum* Genotyps 'Royal Blue' bei einer Kanamycingabe von 50 mg/L Sprosse regenerierten, stellte sich bei *Pelargonium zonale* keine Sprossregeneration (aber Kalluswachstum) bei 50 mg/L Kanamycin ein (siehe Abbildung 3.48).

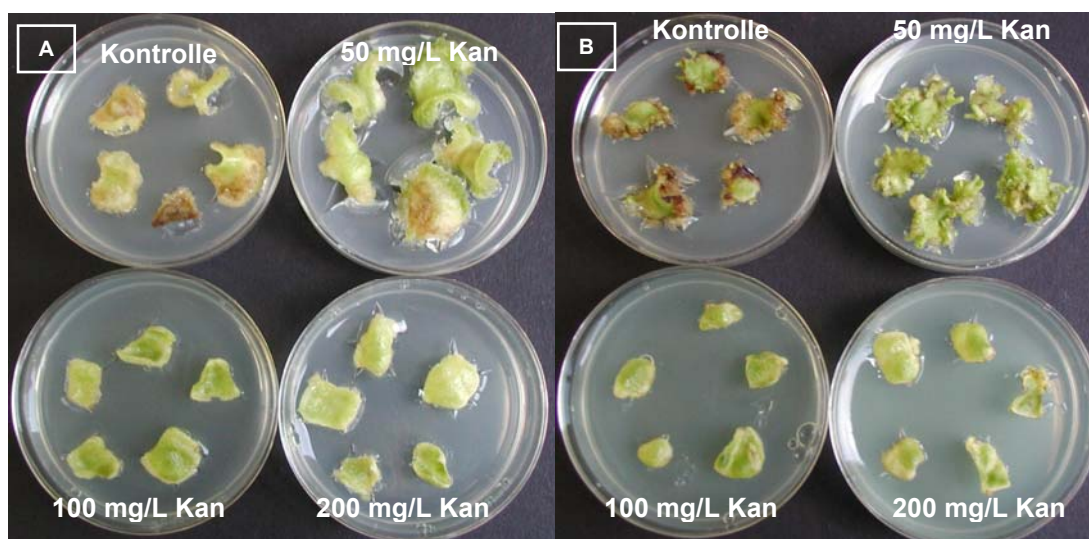


Abbildung 3.48: Ermittlung einer geeigneten Selektionsschwelle für Kanamycin bei *Pelargonium zonale* Genotyp 'Katinka' (A) und *Pelargonium peltatum* Genotyp 'Royal Blue' (B) auf nicht-transformierte Blattexplantate in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen

In folgenden Transformationen wurde für die *Pelargonium peltatum* Cultivars eine Konzentration von 50 mg/L Kanamycin und für die *Pelargonium zonale* Cultivars eine Konzentration von 30 mg/L im Regenerationsmedium wie auch im Sprosswachstumsmedium zur Selektion verwendet.

3.4.2 Vergleich der Transformationseffizienz bei Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP

3.4.2.1 Transformationsversuche mit pGreenII0229smRS-GFP

In *Pelargonien* führte die Verwendung des Vektors pGreenII0229smRS-GFP in jeweils zwei Transformationsversuchen mit jeweils 50 eingesetzten Blattexplantaten pro *Agrobacterium*-Stamm (LBA4404, GV2260, GV3101 und EHA105) nur in einem Transformationsversuch zu einem *smRS-GFP*-transgenen Spross. Dieser für *smRS-GFP* PCR positive und über mehrere Subkulturen auf Phosphinothricin gewachsene Spross, stammte aus einer Transformation des *Pelargonium peltatum* Genotyps 'Royal Blue' mit pGreenII0229smRS-GFP in EHA105. Durch die Wahl des Vektorsystems pMen65, das sich für *Petunia* als sehr effizient herausgestellt hatte, sollte die Transformationseffizienz verbessert werden.

3.4.2.2 Transformationsversuch mit pMen65smRS-GFP

Die Transformationsversuche mit dem neu erstellten Vektor pMen65smRS-GFP (siehe 3.2.2) hatten zum Ziel, den Vergleich der Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP (Kan+GFP) zur Selektion alleinig über die Expression von smRS-GFP (GFP) auch für *Pelargonium* durchzuführen. Für Transformationsversuche mit pMen65smRS-GFP wurden der *A. tumefaciens*-Stamm ABI und sowohl Blattmaterial als auch Blattstielsegmente als Explantate verwendet und wie unter 2.13.2 beschrieben vorgegangen.

Nach bis zu fünf Wiederholungen bei dem *Pelargonium peltatum* Genotyp 'Royal Blue' und *Pelargonium zonale* Genotypen 'Sailing' und 'Katinka' wiesen die einzelnen Varianten die der Abbildung 3.49 und Tabelle 3.12 bis 3.14 zu entnehmenden Transformationsraten auf.

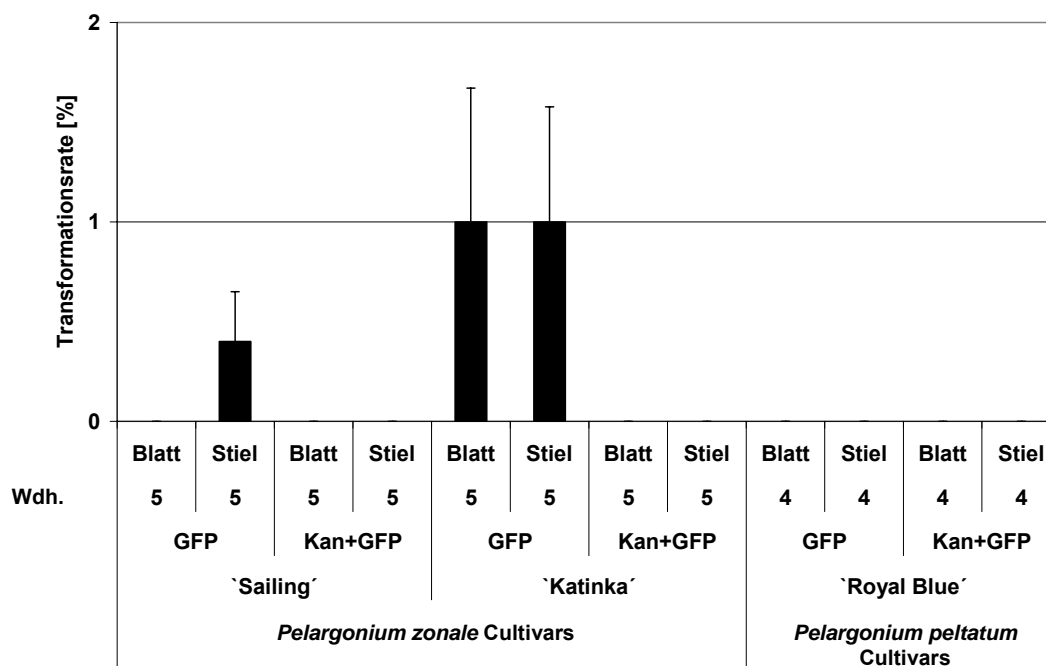


Abbildung 3.49: Transformationsraten (%) mit und ohne Selektion auf Kanamycin bei Verwendung von Blatt- oder Stielexplantaten von *Pelargonium* (pMen65smR-GFP im *Agrobacterium*-Stamm ABI)

Anzahl Versuchswiederholungen, Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier oder fünf Versuchswiederholungen. Die gewerteten Pflanzen wurden auf Anwesenheit des Transgens über PCR getestet.

Die Abbildung 3.49 zeigt, dass nur in der Variante mit alleiniger Selektion über smRS-GFP-Expression (GFP) transgene Sprosse in den zwei *Pelargonium zonale* Genotypen erzielt werden konnten. *Pelargonium zonale* Genotyp 'Sailing' wies bei alleiniger Selektion über GFP eine Transformationsrate bei Verwendung von Blattstielsegmenten (Stiel) von 0,4 % auf, *Pelargonium zonale* 'Katinka' 1 % bei Verwendung von Blattexplantaten und 1 % bei Blattstielsegmenten, während es für *Pelargonium peltatum* 'Royal Blue' nicht gelang, transformierte Sprosse zu erhalten. Bei Selektion über Kanamycin und smRS-GFP (Kan+GFP) ließen sich weder für die *Pelargonium zonale*-Genotypen 'Sailing' und 'Katinka' bei Verwendung von Blatt- oder Stielexplantaten noch für die *Pelargonium peltatum* 'Royal Blue' transformierte Sprosse heranziehen. Die Tabellen 3.12 bis 3.14 verdeutlichen die Anzahl eingesetzter Explantate, Gesamtzahl regenerierter Sprosse, Sprosse mit GFP-Expression, PCR positiv auf *smRS-GFP* und *nptII* getestete Sprosse und die daraus resultierende Transformationsrate (%). Die Gesamtzahl regenerierter Sprosse lag in der Variante GFP in allen drei Genotypen höher als in der Variante Kan+GFP. Die Variante ohne Kanamycin-Selektion (GFP) zeigte dabei in allen drei Genotypen sowohl in Blatt- als auch in Stielexplantaten GFP

positive Sprosse, während dies nur im *Pelargonium pelatum* Genotyp 'Royal Blue' in der Variante Kan+GFP zutraf. Für *Pelargonium zonale* Genotypen konnten nur bei Verwendung von Stielexplantaten GFP positive Sprosse in der Variante Kan+GFP festgestellt werden. Die Anzahl GFP positiver Sprosse variierte sehr stark von Transformationsversuch zu Transformationsversuch. Der Genotyp 'Sailing' regenerierte in der Variante GFP durchschnittlich 5 % Sprosse aus Stielsegmenten und 5 % Sprosse aus Blattmaterial, in der Variante Kan+GFP 16 % Sprosse mit GFP-Expression aus Stielsegmenten in fünf Transformationsversuchen. Die Anzahl GFP exprimierender Sprosse im Genotyp 'Royal Blue' lag bei 7 % Sprossen aus Stielsegmenten und 3 % Sprossen aus Blättern (Variante GFP), in der Variante Kan+GFP waren 26 % Sprosse aus Stiel- und 17 % aus Blattexplantaten. Der Genotyp 'Katinka' wies in fünf Transformationsversuchen eine geringere Anzahl an Sprossen mit GFP-Expression auf. In der Variante GFP exprimierten 2 % Sprosse aus Blattmaterial und 2 % Sprosse aus Stielsegmenten GFP, die Variante Kan+GFP wies 25 % Sprosse (Stiel) mit GFP-Expression im Genotyp 'Katinka' auf.

Aber ein Großteil der GFP positiv selektierten Sprosse bestand nach Überprüfung über PCR auf *smRS-GFP* und *nptII* sowie Bewurzelung auf kanamycinhaltigem Medium in Escapes, d. h. nicht transformierten Sprossen. So konnten nur für den *Pelargonium zonale* Genotyp 'Katinka' in zwei Transformationsversuchen jeweils in der Variante ohne Kanamycin-Selektion (GFP) transgene Sprosse identifiziert werden. Diese Sprosse resultierten in einem Versuch aus Blattexplantaten (drei Sprosse) und aus Stielexplantaten (ein Spross) sowie in einem weiteren Transformationsversuch nur aus Stielexplantaten (drei Sprossen) in der Variante GFP. Letztlich lag im Genotyp 'Katinka' die Transformationsrate in der Variante GFP bei Blatt- und Stielexplantaten bei jeweils 1 %. Im Genotyp 'Sailing' resultierte aus einem Transformationsversuch ein PCR positiv getesteter Spross in der Variante ohne Kanamycin-Selektion (GFP) bei Verwendung von Stielexplantaten und ergab eine durchschnittliche Transformationsrate von 0,4 %. Keinerlei transgene Sprosse brachte der *Pelargonium peltatum* Genotyp 'Royal Blue' hervor.

Tabelle 3.12: Vergleich der Transformationsraten [%] mit und ohne Selektion auf Kanamycin bei *Pelargonium zonale* Genotyp 'Sailing' (pMen65smRS-GFP in ABI)

Sprosse PCR positiv getestet auf *smRS-GFP* und *nptII*

`Sailing`																								
	Eingesetzte Explantate				Sprosse gesamt				GFP positive Sprosse								PCR positive Sprosse				Transformationsrate [%]			
	GFP		Kan+GFP		GFP		Kan+GFP		GFP				Kan+GFP				GFP		Kan+GFP		GFP		Kan+GFP	
	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	%	Stiel	%	Blatt	%	Stiel	%	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel
1	30	25	29	29	31	29	1	0	6	19	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	50	48	45	50	4	31	0	7	0	0	0	0	0	0	1	14	0	0	0	0	0	0	0	0
3	51	64	36	34	4	127	0	1	1	25	8	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	49	51	40	50	48	19	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	115	98	62	90	53	61	3	16	0	0	4	7	0	0	3	19	0	1	0	0	0	0	1,6	0
Σ	295	286	212	253	140	267	8	25	7	Ø 5	14	Ø 5	0	Ø 0	4	Ø 16	0	1	0	0	Ø 0	Ø 0,4	Ø 0	Ø 0

Tabelle 3.13: Vergleich der Transformationsraten [%] mit und ohne Selektion auf Kanamycin bei *Pelargonium zonale* Genotyp 'Katinka' (pMen65smRS-GFP in ABI)

Sprosse PCR positiv getestet auf *smRS-GFP* und *nptII*

`Katinka`																								
	Eingesetzte Explantate				Sprosse gesamt				GFP positive Sprosse								PCR positive Sprosse				Transformationsrate [%]			
	GFP		Kan+GFP		GFP		Kan+GFP		GFP				Kan+GFP				GFP		Kan+GFP		GFP		Kan+GFP	
	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	%	Stiel	%	Blatt	%	Stiel	%	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel
1	20	24	20	24	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	50	56	49	50	0	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	79	64	80	40	149	91	11	1	5	3	0	0	0	0	1	100	2	1	0	0	1,3	1,1	0	0
4	40	50	25	19	46	65	0	2	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	60	54	50	62	53	31	0	4	0	0	2	6	0	0	1	25	0	1	0	0	0	3,2	0	0
Σ	249	248	224	195	249	199	11	8	5	Ø 2	4	Ø 2	0	Ø 0	2	Ø 25	2	2	0	0	Ø 0,8	Ø 1	Ø 0	Ø 0

Die nach Transformation errechnete Transformationsrate in %: $Transformationsrate [\%] = \frac{(Anzahl\ PCR\ positiver\ Sprosse \times 100)}{Sprosse\ gesamt}$.

Je eingesetztes Explantat wurden alle fluoreszierenden Sprosse auf Selektionsmedium weiterkultiviert und über PCR getestet.

Tabelle 3.14: Vergleich der Transformationsraten [%] mit und ohne Selektion auf Kanamycin bei *Pelargonium peltatum* Genotyp 'Royal Blue' (pMen65smRS-GFP in ABI)

Sprosse PCR positiv getestet auf *smRS-GFP* und *nptII*

`Royal Blue`																								
	Eingesetzte Explantate				Sprosse gesamt				GFP positive Sprosse								PCR positive Sprosse				Transformationsrate [%]			
	GFP		Kan+GFP		GFP		Kan+GFP		GFP				Kan+GFP				GFP		Kan+GFP		GFP		Kan+GFP	
	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	%	Stiel	%	Blatt	%	Stiel	%	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel	Blatt	Stiel
1	34	34	34	34	8	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	30	18	33	19	47	128	19	62	6	13	14	11	4	21	16	26	0	0	0	0	0	0	0	0
3	20	20	20	20	31	59	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	75	43	60	19	175	151	32	26	2	1	12	8	5	16	7	27	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ	159	115	147	92	261	412	51	88	8	Ø 3	27	Ø 7	9	Ø 17	23	Ø 26	0	0	0	0	Ø 0	Ø 0	Ø 0	Ø 0

Die nach Transformation errechnete Transformationsrate in %: $Transformationsrate [\%] = \frac{(Anzahl\ PCR\ positiver\ Sprosse \times 100)}{Sprosse\ gesamt}$.

Je eingesetztes Explantat wurden alle fluoreszierenden Sprosse auf Selektionsmedium weiterkultiviert und über PCR getestet.

3.4.3 GFP-Expression

In Pelargonien zeigte sich der Unterschied in der Transformationseffizienz zwischen Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP (Kan+GFP) im Vergleich zu alleiniger Selektion über smRS-GFP (GFP) nicht so deutlich wie in Petunie. Transgene Sprosse konnten zwar nur in der Variante ohne Selektion regeneriert werden, die Transformationsrate lag aber lediglich bei 1 %.

In der Kallusphase wies die Variante mit Selektion über Kanamycin eine stärkere GFP-Expression auf, teilweise entwickelten sich aus dieser starken Expression keine weiteren Sprosse und die Regeneration stagnierte. Entstanden aus stark GFP exprimierendem Kallus aber Sprosse, so war deren GFP-Expression in der Variante mit Kanamycin-Selektion (Kan+GFP) gleich derer ohne Selektion (GFP) (Abb. 3.50, 3.51). Abbildung 3.50 zeigt zwei stark GFP exprimierende Sprosse im *Pelargonium zonale* Genotyp 'Sailing' ohne Kanamycin-Selektion regeneriert aus Stielexplantaten. GFP-Expression eines über Kanamycin selektierten Sprosses aus Blattexplantaten zeigt Abbildung 3.51, Sprosse aus der Variante Kan+GFP erwiesen sich trotz GFP-Expression als PCR negativ.

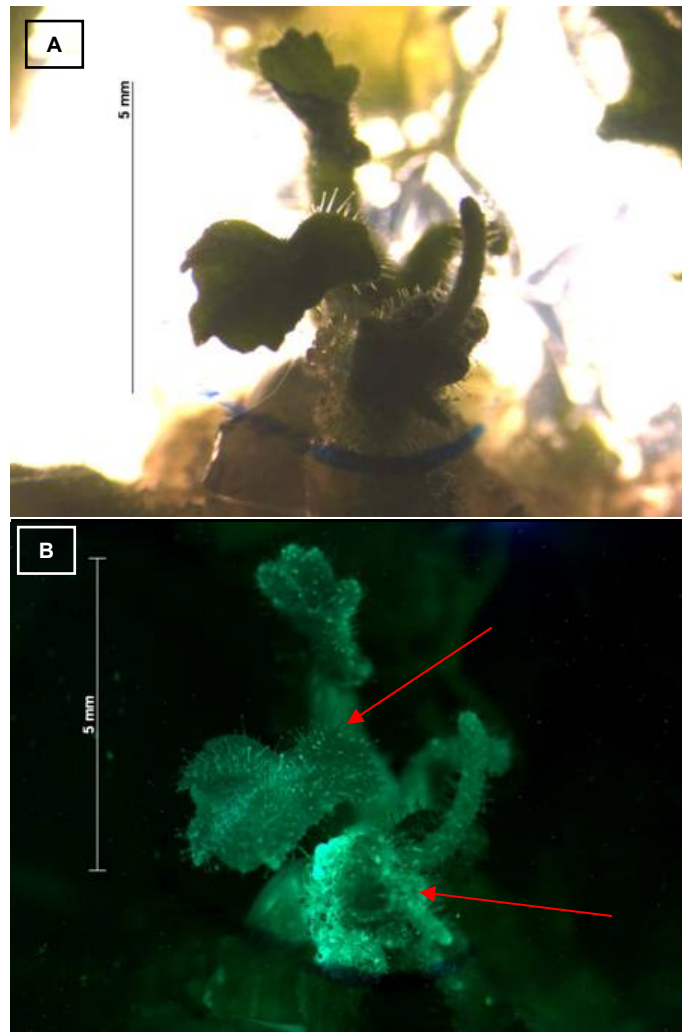


Abbildung 3.50: SmRS-GFP-Expression eines regenerierten Sprosses von *Pelargonium zonale* 'Sailing' (pMen65smRS-GFP in ABI) drei Wochen nach Kokultur ohne Kanamycin-Selektion unter Verwendung von Stielexplantaten (Durchlicht (A); Fluoreszenzlicht (B))

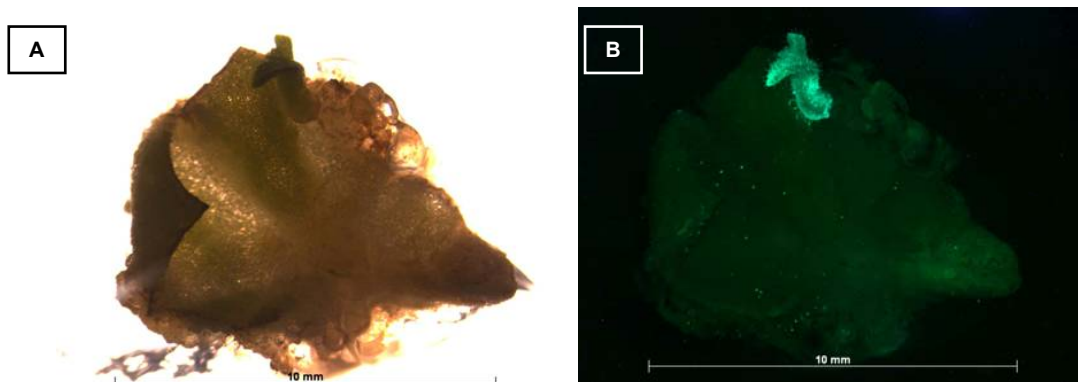


Abbildung 3.51: SmRS-GFP-Expression eines regenerierten Sprosses von der *Pelargonium peltatum* 'Royal Blue' (pMen65smRS-GFP in ABI) drei Wochen nach Kokultur mit Kanamycin-Selektion unter Verwendung von Blattexplantaten (Durchlicht(A); Fluoreszenzlicht (B))

3.4.4 Präparation von genomischer DNA aus *Pelargonium*

Für *Pelargonium* wurde die in Petunien erfolgreich etablierte DNA-Extraktionsmethode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) getestet und ihre Durchführbarkeit exemplarisch für den *Pelargonium zonale* Genotyp 'Katinka' optimiert. Hierbei wurde das Ausgangsmaterial unterschieden in Blattmaterial: frisch/trocken, die Art der Aufbereitung: per Hand/Laborrührwerk und das Volumen des Reaktionsgefäßes: 1,5 mL/2,0 mL verglichen. Die Beschreibung der Versuchsvarianten ist Tabelle 3.15 zu entnehmen.

Tabelle 3.15: Beschreibung der Versuchsvarianten zur Optimierung der DNA-Extraktion nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) bei *Pelargonium*

Varianten	Blattmaterial	Art der Aufbereitung	Volumen des Reaktionsgefäßes
V1	frisch	per Hand	1,5 mL
V2	frisch	per Hand	2,0 mL
V3	frisch	Laborrührwerk	1,5 mL
V4	frisch	Laborrührwerk	2,0 mL
V5	trocken	Optimale Aufbereitungsart	Optimales Reaktionsgefäß

Bei der DNA-Schnellisolation für PCR nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) des *Pelargonium zonale* Genotyps 'Katinka' (Abbildung 3.52) erwies sich die Variante V3 (frisches Blattmaterial; Aufbereitung mit einem Mikropistill, eingespannt in ein Laborrührwerk; 1,5 mL Reaktionsgefäß) als die Variante mit dem höchsten DNA-Gehalt von 116 µg/g FM. Die Variante V4 (mit Aufbereitung über ein Mikropistill eingespannt in ein Laborrührwerk und Verwendung eines 2,0 mL Reaktionsgefäßes) resultierte in einer ebenfalls hohen DNA-Ausbeute von 98 µg DNA/g FM bei *Pelargonien*. V1 (frisches Blattmaterial, Aufbereitung per Hand, 1,5 mL Reaktionsgefäß) erbrachte eine DNA-Ausbeute von 44 µg DNA/g FM, V2 dagegen nur in 9 µg DNA/g FM. Die Variante 3 mit der höchsten DNA-Ausbeute diente als Grundlage für die Variante 5. In dieser Variante sollte die optimale Aufbereitungsart und das optimale Reaktionsgefäß unter Verwendung von getrocknetem Blattmaterial getestet werden. Dazu wurde zum Aufbereiten ein 1,5 mL Reaktionsgefäß und ein Mikropistill, eingespannt in ein Laborrührwerk, verwendet. Bei Aufbereitung von DNA unter Bedingungen der Variante V5 (Aufbereitung in 1,5 mL Reaktionsgefäß; mit einem Mikropistill, eingespannt in ein Laborrührwerk, Verwendung von getrocknetem Ausgangsmaterial), konnte eine DNA-Menge von 9 µg DNA/g FM extrahiert werden.

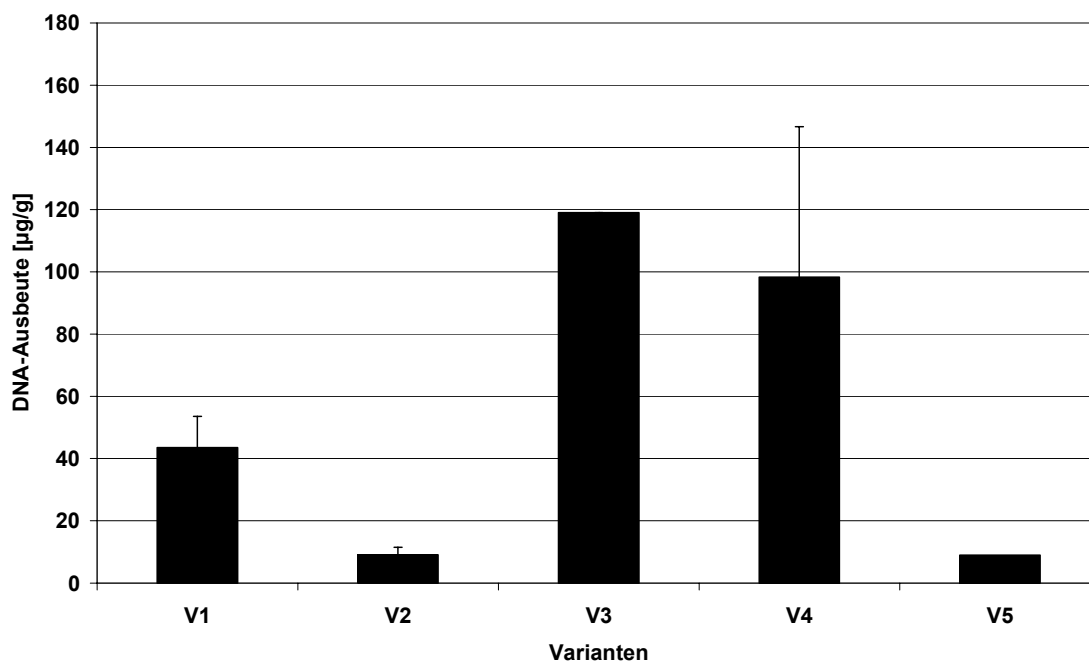


Abbildung 3.52: DNA-Ausbeute bei *Pelargonium zonale* 'Katinka' unter Verwendung der Extraktionsmethode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) bei Variation von Reaktionsgefäßen, Aufbereitungsart und Ausgangsmaterial

Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchswiederholungen

V1: frisches Blattmaterial, per Hand aufbereitet, in 1,5 mL Reaktionsgefäß

V2: frisches Blattmaterial, per Hand aufbereitet, in 2,0 mL Reaktionsgefäß

V3: frisches Blattmaterial, Mikropistill eingespannt in ein Laborrührwerk, in 1,5 mL Reaktionsgefäß

V4: frisches Blattmaterial, Mikropistill eingespannt in ein Laborrührwerk, in 2,0 mL Reaktionsgefäß

V5: getrocknetes Blattmaterial, optimale Aufbereitungsart, optimales Reaktionsgefäß

Die Varianten mit der Aufbereitung über einen Mikropistill, eingespannt in ein Laborrührwerk und Verwendung von frischem Blattmaterial (V3, V4) erzielten höhere DNA-Ausbeuten im Vergleich zur Aufbereitung per Hand (V1, V2). Die Verwendung von 1,5 mL Reaktionsgefäßen (V1, V3) resultierte im Vergleich zur Verwendung von 2,0 mL Gefäßen (V2, V4) in geringeren DNA-Ausbeuten, ausschlaggebender war aber die Aufbereitungsart.

3.5 *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.)

Zur Etablierung der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) wurden zerkleinerte meristematische Cluster verwendet.

3.5.1 Ermittlung der geeigneten Selektionsbedingungen

3.5.1.1 Phosphinothricin-Selektion

Die Selektion mit Phosphinothricin (PPT) wurde bei Transformationsversuchen mit den Vektoren pGreenII0229smRS-GFP und pIBGUS durchgeführt.

Im Gegensatz zu Petunien und Pelargonien war die Selektion mit Phosphinothricin in *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) schwieriger. Die zerkleinerten, meristematischen Cluster von Sprosskulturen zeigten auch bei Konzentrationen von bis zu 5 mg/L Phosphinothricin im Regenerationsmedium nur eine leichte Hemmung der Sprossregeneration (siehe Abbildung 3.53). Der *Impatiens* Genotyp 'CP Red' zeigte trotz 5 mg/L PPT eine Sprossbildung von 53 %, 'CP White' noch 70 %, und 'CP Violet' wies 79 % Sprossbildung auf. Daraufhin wurde eine Strategie zur Ermittlung des geeigneten Zeitpunkts des Selektionsbeginns und der -abfolge getestet.

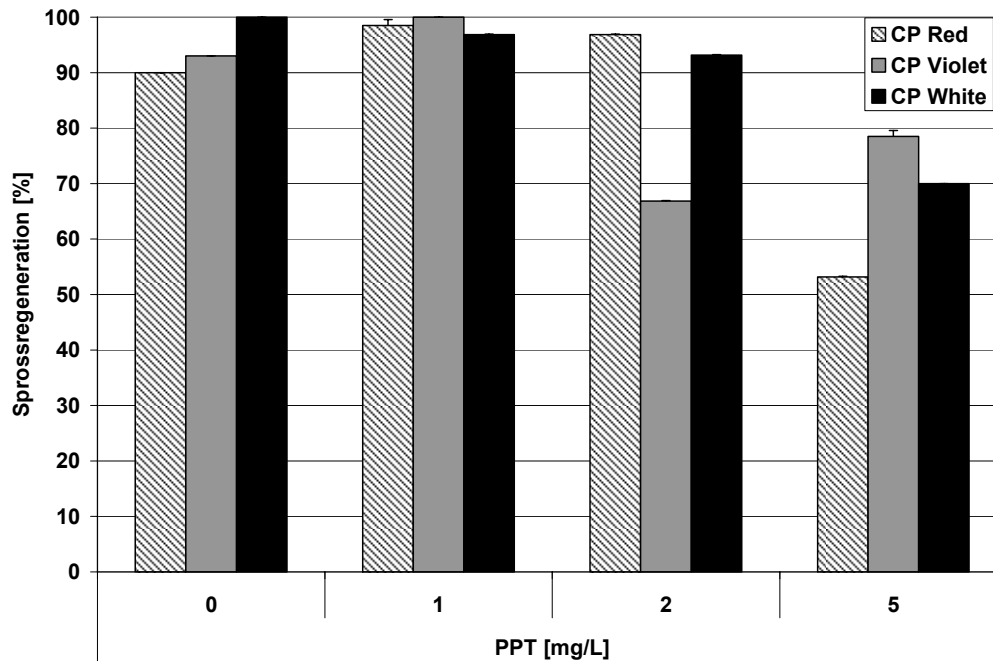


Abbildung 3.53: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) auf die Sprossregeneration von nicht-transformierten *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) nach drei Wochen

Mittelwerte aus zwei Wiederholungen mit je 30 Explantaten

Zur Etablierung dieser Selektionsstrategie wurden verschiedene Medien in verschiedener Anwendungsabfolge untersucht. Verwendete Medienvarianten waren: Regenerationsmedium für *Impatiens* als Kontrolle, sowie Regenerationsmedium mit 500 mg/L Cefotaxim (ohne Selektion) und Regenerationsmedium mit 2 mg/L PPT + 500 mg/L Cefotaxim (mit Selektion).

Bei diesem Versuch sollte der Effekt von alleiniger Cefotaxim-Applikation mit der Wirkung von PPT (2 mg/L) + Cefotaxim auf die meristematischen Cluster untersucht werden. Im Vergleich zum ersten Versuch wurden die meristematischen Cluster drei Tage auf Regenerationsmedium kultiviert (entspricht der Zeit und den Bedingungen der Kokultur) und danach auf Regenerationsmedium mit Cefotaxim weiterkultiviert. Nach sieben Tagen wurden alle gebildeten Sprosse entfernt und die meristematischen Cluster entweder auf Regenerationsmedium mit Cefotaxim erneut kultiviert oder auf Regenerationsmedium mit 2 mg/L PPT + 500 mg/L Cefotaxim überführt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die meristematischen Cluster sensibler auf PPT reagieren, wenn die neu gebildeten Sprosse am Explantat entfernt wurden und das Explantat neu aufgelegt wurde. Abbildung 3.54 zeigt den Effekt verschiedener PPT-

Konzentrationen, appliziert zehn Tagen nach Inkulturnahme und Entfernung gebildeter Sprosse auf die meristematischen Cluster bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.).

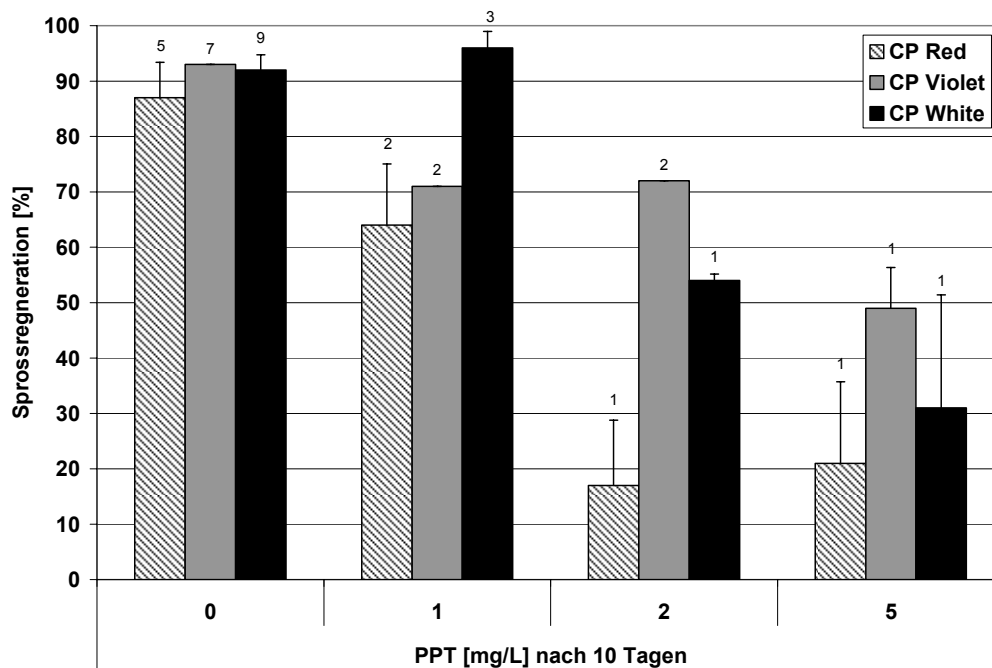


Abbildung 3.54: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) appliziert zehn Tage nach in Kulturnahme und Entfernung neugebildeter Sprosse auf die Sprossregeneration von meristematischen Clustern bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) nach drei Wochen

Mittelwerte aus zwei Wiederholungen mit je 30 Explantaten; Werte über den Säulen: Mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat

Hierbei zeigt sich ab einer Konzentration von 2 mg/L PPT eine hemmende Wirkung auf die Sprossbildung und auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierenden Explantat. Ab einer Konzentration von 5 mg/L PPT zeigte 'CP Red' eine Sprossregeneration von 21 %, 'CP White' 31 % und 'CP Violet' von 49 %. Die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat lag bei einer Konzentration von 5 mg/L PPT in allen drei Genotypen bei eins und bei 2 mg/L PPT ebenfalls bis auf den Genotyp 'CP Violet' mit zwei Sprossen. Die Effekte von verschiedenen PPT-Konzentrationen auf die Sprossregeneration und die damit einhergehende Schädigung ab einer Konzentration von 2 mg/L PPT zeigt auch Abbildung 3.55.

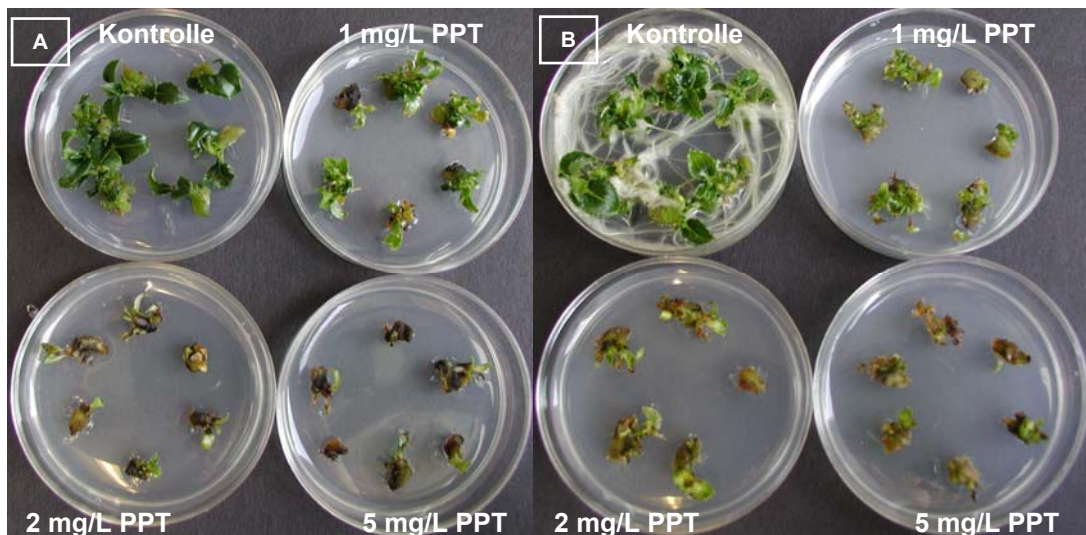


Abbildung 3.55: Effekt steigender Konzentrationen von Phosphinothricin (PPT) appliziert zehn Tage nach Inkulturnahme und Entfernung neugebildeter Sprosse auf die Sprossregeneration von nicht-transformierten meristematischen Clustern bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) 'CP Red' (A) und 'CP White' (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen

Abbildung 3.55 verdeutlicht die negativen Effekte hoher Konzentrationen des herbiziden Wirkstoffs PPT auf meristematische Cluster. Ab einer Konzentration von 2 mg/L PPT im Regenerationsmedium kam es trotz Sprossbildung zu starker Verbräunung. Aufgrund der starken Verbräunungen der meristematischen Cluster bei Applizierung von 2 mg/L bzw. 5 mg/L PPT wurde trotz der noch hohen Sprossregeneration bei 2 mg/L PPT von 17 % ('CP Red'), 72 % ('CP Violet') und 54 % ('CP White') in folgenden Versuchen eine Konzentration von 2 mg/L PPT verwendet. In folgenden Transformationsversuchen sollte überprüft werden, ob Cefotaxim einen Effekt auf die Regeneration hat. Zum Vergleich wurde eine alleinige Cefotaxim-Applikation (500 mg/L) mit der Wirkung von PPT (2 mg/L) + Cefotaxim (500 mg/L) auf die Sprossbildung meristematischer Cluster in Transformationsversuchen (pGreenII0229smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm EHA105) untersucht. Meristematische Cluster wurden transformiert und für drei Tage auf Regenerationsmedium kultiviert (Kokultur). Nach der Kokultur wurden die transformierten meristematischen Cluster auf Regenerationsmedium mit 500 mg/L Cefotaxim (Cef) für sieben Tage kultiviert. Danach wurden die neu gebildeten Sprosse entfernt und die meristematischen Cluster entweder auf Regenerationsmedium mit 500 mg/L Cefotaxim oder Regenerationsmedium mit 2 mg/L PPT + 500 mg/L Cefotaxim überführt.

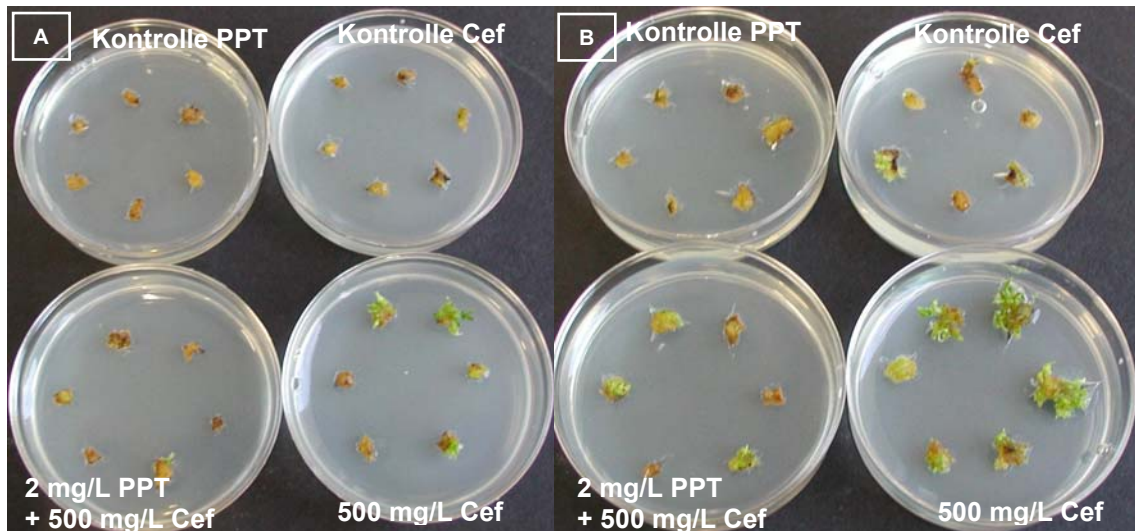


Abbildung 3.56: Effekt mit und ohne Selektion von Phosphinothricin (PPT) appliziert zehn Tage nach Entfernung neu gebildeter Sprosse auf die Sprossregeneration von transformierten und kokultivierten (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) meristematischen Cluster bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) 'CP Red' (A) und 'CP White' (B) in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen

Abbildung 3.56 zeigt den Effekt mit und ohne Selektion von PPT nach Entfernung sich neu gebildeter Sprosse (nach zehn Tagen) auf die Sprossregeneration nach Transformation (pGreenII0229smRS-GFP). Im Genotyp 'CP Red' und 'CP White' kam es auf dem Regenerationsmedium mit Selektion über PPT (2 mg/L PPT + 500 mg/L Cefotaxim) nur vereinzelt zu Sprossbildung, während es in der Variante ohne Selektion (500 mg/L Cefotaxim) zu starker Sprossbildung an jedem Explantat kam. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für folgende Transformationen die Selektionsabfolge von drei Tagen Kokultur auf Regenerationsmedium, gefolgt von sieben Tagen auf cefotaximhaltigem Regenerationsmedium und anschließender Entfernung der neugebildeten Sprosse und Überführung auf Selektionsmedium mit 2 mg/L PPT + 500 mg/L Cefotaxim gewählt (Abbildung 3.57).

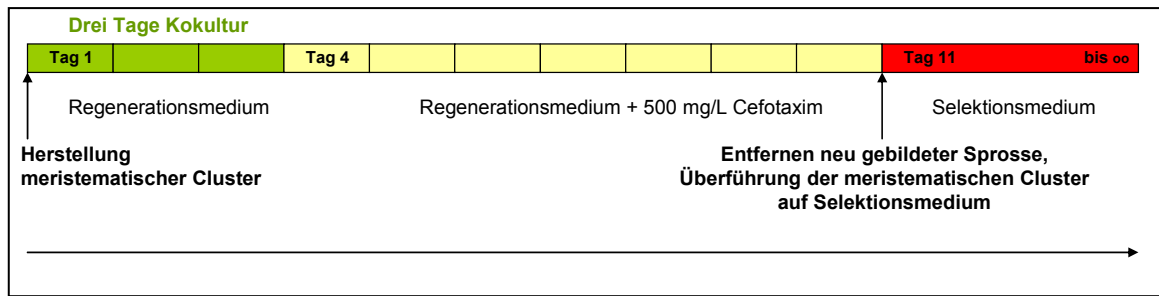


Abbildung 3.57: Zeitreihe der Selektionsabfolge für Transformationen von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.)

Rechtecke symbolisieren Tage und deren Farbgebung, die an diesen Tagen verwendeten Medien (grün = Regenerationsmedium *Impatiens*; gelb = Regenerationsmedium + 500 mg/L Cefotaxim; rot = entsprechendes Selektionsmedium (Regenerationsmedium + 500mg/L Cefotaxim + entweder 2 mg/L Phosphinothricin oder 100 mg/L Kanamycin))

Diese Strategie der Selektion wurde in einem Transformationsversuch mit pIBGUS in LBA4404 und pIBGUS in EHA101 in einem GUS-Assay getestet (Abbildung 3.58).

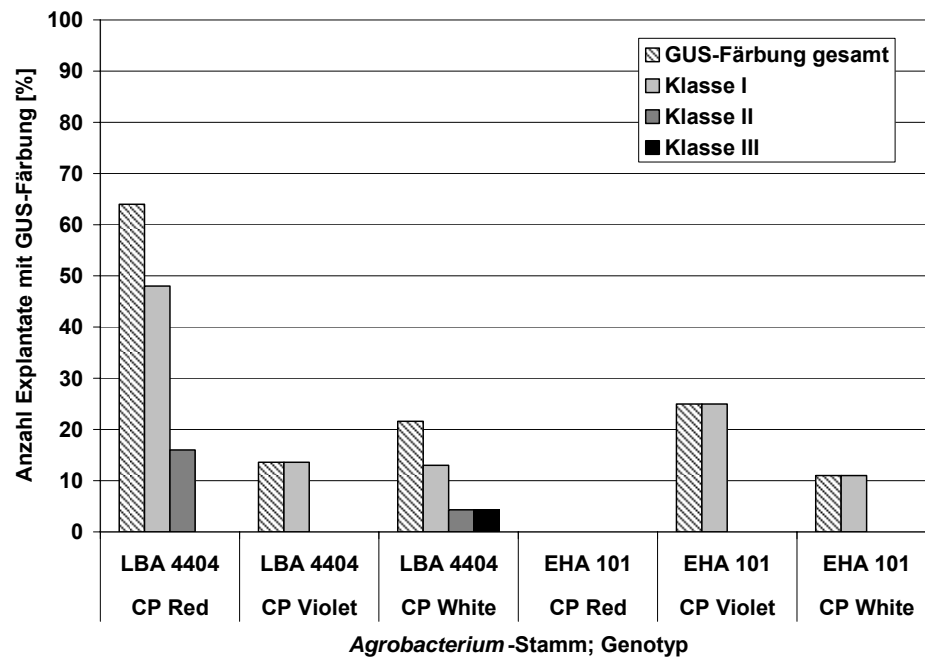


Abbildung 3.58: Prozentuale Anteil Explantate mit GUS-Färbung (pIBGUS in LBA4404/EHA101) in Abhängigkeit vom *A. tumefaciens*-Stamm bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.), ermittelt im histochemischen GUS-Assay

Mittelwerte aus einem Transformationsversuch bei Verwendung von 25 Explantaten pro Genotyp und *Agrobacterium*-Stamm

Der histochemische GUS-Assay zeigte bei Verwendung des *A. tumefaciens*-Stammes LBA4404 transgene Bereiche in den drei verwendeten *Impatiens* Genotypen (siehe Abbildung 3.58). Diese lagen prozentual bei 64 % meristematischen Clustern mit GUS-Färbung bei 'CP Red', 14 % bei 'CP Violet' und 22 % bei 'CP White'. Im Genotyp 'CP White' zeigten 4 % der Cluster große, blau gefärbte Bereiche (Klasse III) auf. Der

Agrobacterium-Stamm EHA101 führte bei Genotyp `CP White` zu 11 % Explantaten der Klasse I, bei Genotyp `CP Violet` zu 25 %. Der *Agrobacterium*-Stamm LBA4404 erbrachte eine höhere Anzahl auftretender GUS-Färbung an Explantaten und war im Vergleich zur Verwendung von EHA101 offenbar besser zur Transformation von meristematischen Clustern geeignet. Abbildungen 3.59 stellt exemplarisch die aufgetretene GUS-Färbung nach Transformation (pIBGUS in LBA4404) in den drei *Impatiens* Genotypen dar. Die GUS-Expression war hauptsächlich im Bereich der meristematischen Cluster zu detektieren, Sprosse wiesen keine oder nur vereinzelte Bereiche mit GUS-Expression auf. Das Vorhandensein von detektierbarer GUS-Expression in diesen Transformationsversuchen, besonders im *Agrobacterium*-Stamm LBA4404, ließ die zuvor ermittelte Selektionsabfolge als erfolgreich erscheinen.

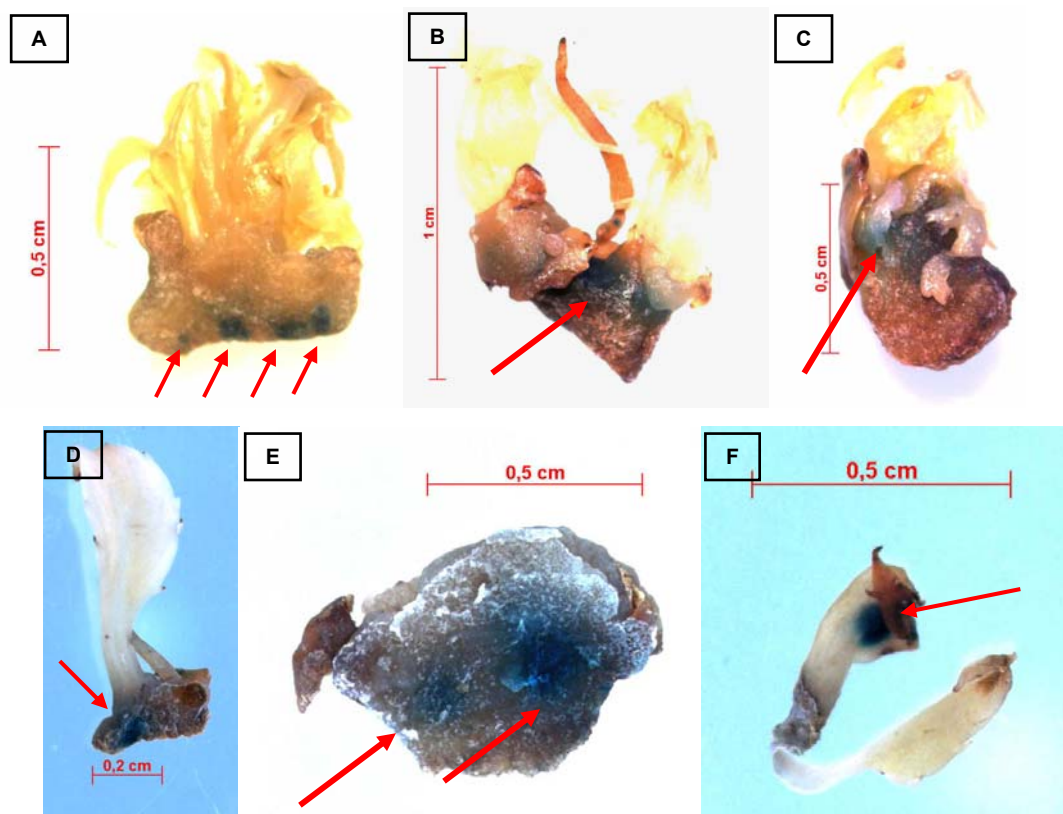


Abbildung 3.59: GUS-Expression drei Wochen nach Transformation (pIBGUS in LBA4404) bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) `CP White` (A, D, E), `CP Red` (B, F) und `CP Violet` (C)

Rote Pfeile kennzeichnen auftretende GUS-Färbung an meristematischen Clustern bei *Impatiens*

3.5.1.2 Kanamycin-Selektion

Die Selektion mit Kanamycin wurde bei Transformationsversuchen mit dem Vektor pMen65smRS-GFP durchgeführt. Hierbei fand die in 3.5.1.1 ermittelte Selektionsabfolge Anwendung. Diese Selektionsabfolge wurde mit einer bereits getesteten und geeigneten Konzentration von 100 mg/L Kanamycin getestet (persönliche Mitteilung Dr. A. Dohm). Abbildung 3.60 zeigt die Wirkung mit und ohne Selektion von Kanamycin im Genotypen 'CP White' transformiert mit pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm ABI.

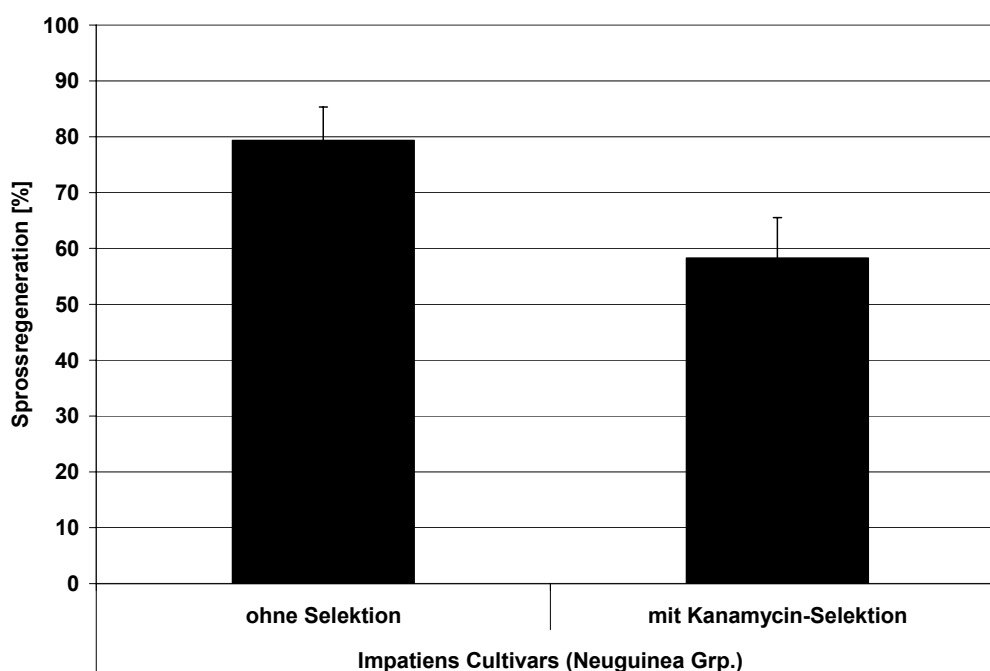


Abbildung 3.60: Wirkung der Kanamycin-Selektion (100 mg/L) auf die Sprossregeneration in Transformationsversuchen mit meristematischen Clustern (pMen65smRS-GFP in ABI) von *Impatiens Cultivars* (Neuguinea Grp.) 'CP White' nach drei Wochen

Mittelwerte aus zwei Wiederholungen mit 90 Explantaten

Die Applikation von 100 mg/L Kanamycin wirkte sich in einer Verringerung der Sprossbildung um 21 % im Gegensatz zur Kontrolle ohne Selektion aus. Mit einer Konzentration von 100 mg/L Kanamycin war somit ein leicht hemmender Effekt auf die Sprossbildung von 79 % (ohne Selektion) auf 58 % mit Kanamycin-Selektion bei Genotyp 'CP White' zu verzeichnen (Abb. 3.60).

Aus Abbildung 3.61 wird ersichtlich, dass die Kontrolle ohne Selektion und die mit *Agrobacterium* kokultivierten meristematischen Cluster ähnliche Regenerationsraten aufwiesen, dies konnte auch für die Variante mit Kanamycin-Selektion festgestellt werden.

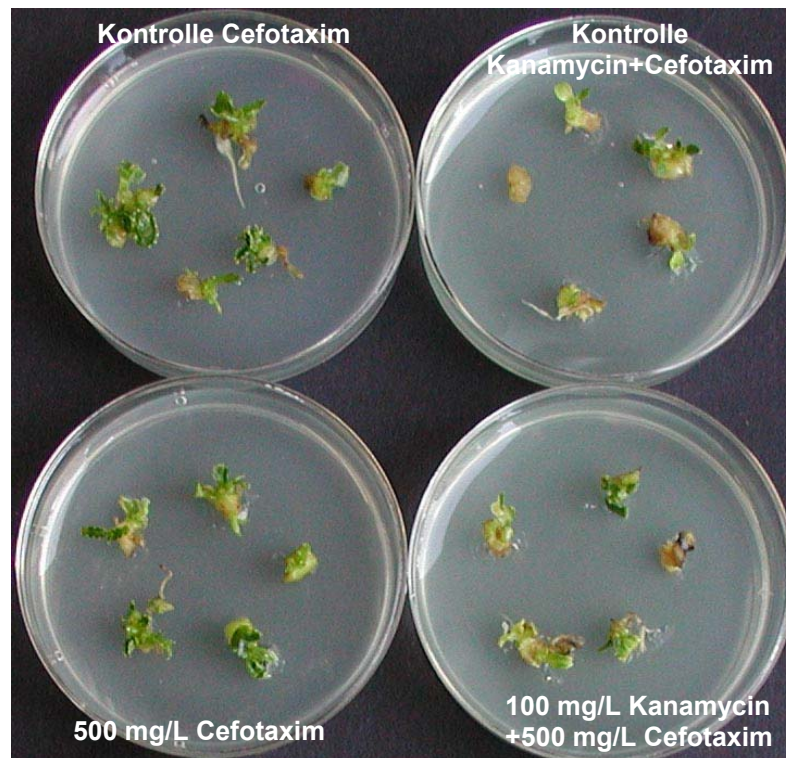


Abbildung 3.61: Effekt von Kanamycin, appliziert zehn Tage nach Inkulturnahme und Entfernung von neu gebildeten Sprossen auf die Sprossbildung von transformierten und kokultivierten (pMen65smRS-GFP) meristematischen Clustern bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) 'CP White' in 6 cm Petrischalen nach drei Wochen

Eine Konzentration von 100 mg/L Kanamycin wurde später in der Selektionsabfolge verwendet.

3.5.2 Einfluss des Vektorsystems auf das Transformationsergebnis

Zur Etablierung eines Transformationssystemes bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) wurde zu Beginn der Vektor pGreenII0229smRS-GFP im *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm EHA105 und in späteren Versuchen der Vektor pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm ABI verwendet. Weder der Vektor pGreenII0229smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm EHA105 noch der Vektor pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm ABI resultierte in den mehrfach durchgeführten Transformationsversuchen in transgenen Sprossen. Es kam zwar zu einsetzender Sprossregeneration an den meristematischen Clustern, diese Sprosse konnten auch auf Selektionsmedium überführt werden und entwickelten sich hier weiter. Versuche zum PCR-Nachweis sowohl für das *smRS-GFP* als auch für die entsprechenden Selektionsmarkergene waren in allen Fällen negativ. Zu beobachten war auch, dass an allen drei *Impatiens* Genotypen in Transformationsversuchen keinerlei GFP-Expression sichtbar war, vielmehr ging von den meristematischen Clustern eine

starke Autofluoreszenz aus. Ein erneuter Versuch zur transienten GFP-Expression an Gewächshauspflanzen zeigte ein detektierbares Fluoreszenzsignal des *smRS-GFP* und bestätigte damit wiederholt die prinzipielle Eignung als Reportergen bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.).

3.5.3 Präparation von genomischer DNA aus *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.)

Bei der Verwendung der DNA-Schnellisolation für PCR nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) für *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) `CP White` konnte in keiner Variante DNA extrahiert werden. Ebenfalls erwies sich die Methode mit CTAB-Fällung bei *Impatiens* als nicht geeignet, da keine DNA isoliert werden konnte. Lediglich mit dem kommerziellen DNA-Isolationskit DNeasy[®]PlantMini von QIAGEN konnte aus mit flüssigem Stickstoff aufbereitetem In-vitro-Blattmaterial DNA isoliert werden, mit einer Ausbeute von 50 µg DNA/g FM.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung von Methoden für eine effiziente Produktion, Detektion und weitere Analyse von gentechnisch veränderten Zierpflanzen im Segment Beet- und Balkonpflanzen mit verbesserter Verbraucherakzeptanz untersucht.

Der Einsatz von Antibiotika- oder Herbizidresistenzen gilt in der Öffentlichkeit als umstritten. Im Fokus der öffentlichen Diskussion steht das Risiko eines horizontalen Gentransfers von transgenen Pflanzen auf Bakterien oder Mikroorganismen und damit die Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen. Dieser horizontale Gentransfer wird als unwahrscheinlich eingestuft, wäre aber prinzipiell möglich (SMALLA ET AL. 2000). In den letzten Jahren wurden verstärkt experimentelle Untersuchungen in Bezug auf die Eliminierung der verfügbaren Markergene nach Identifizierung der gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) angestellt, sowie die Erweiterungen der verfügbaren Selektionsmarkergene über den Bereich der Antibiotikaresistenzgene hinaus oder deren Vermeidung beobachtet. Dies geschah vor dem Hintergrund der EU-Richtlinie 2001/18/EG (EU-RICHTLINIE 2001/18/EG), die die Freisetzung (zu Erprobungs- oder Forschungszwecken) sowie das in Verkehr bringen von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) regelt und schrittweise die Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen in GVO einzuschränken vorsieht. Diese Arbeit soll ihren Beitrag dazu leisten, indem sie das Ziel verfolgt gentechnisch veränderte Zierpflanzen, die keine Antibiotika- oder Herbizidresistenzen enthalten, zu erstellen und somit in der Öffentlichkeit eine breitere Akzeptanz finden. Dazu wurden die Effizienz bestehender Transformationssysteme optimiert und alternative Strategien für die Detektion der transgenen Pflanzen entwickelt, die den Verzicht auf umstrittene Antibiotika- oder Herbizidresistenzen als Selektionsmarker ermöglichen. Hierbei wurden transgene Zellen und Sprosse mittels des visuellen Reportergens *gfp* während der Regeneration selektiert und anschließend mit Hilfe von molekularen Verfahren analysiert.

Das visuelle Reportergen *gfp* (Green Fluorescent Protein) wurde aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert (PRASHER ET AL. 1992) und für ein Protein kodiert, das bei Anregung durch UV-Licht oder Blaulicht eine Fluoreszenz emittiert. Diese grüne Biolumineszenz von *Aequorea victoria* beruht auf einem Protein-Protein-Energietransfer des blau fluoreszierenden Proteins Aequorin, zu GFP in der

Anwesenheit von Ca^{2+} (MORISE ET AL. 1974). Das GFP-Chromophor wurde abgeleitet aus der primären Aminosäuresequenz des Proteins (CODY ET AL. 1993).

Das GFP-System benötigt keine Cofaktoren oder Substrate und ist zerstörungsfrei nachweisbar (HEIM ET AL. 1994). Diese Eigenschaften machen es zu einem idealen *in vivo* Reporter in Pflanzen (HASELOFF UND AMOS 1995, HU UND CHENG 1995, NIEDZ ET AL. 1995, PANG ET AL. 1996), in denen GFP eine kontinuierliche Beobachtung, durch stabile Fluoreszenz, Pflanzenart unabhängig und zu jedem Zeitpunkt der Kultur, erlaubt. Transgene Zellen sind unter dem Fluoreszenzmikroskop, unter Umständen sogar mit einer UV- oder Schwarzlicht-Handlampe zu erkennen (HASELOFF ET AL. 1997, DAVIS UND VIERSTRA 1998, STEWART 2001).

Der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Gentransfer stellt die am weitesten verbreitete Methode der Pflanzentransformation bei Zierpflanzen dar (DEROLES ET AL. 1997). Limitierender Faktor der *A. tumefaciens*-vermittelten Pflanzentransformation ist das Wirtsspektrum dieses Bakteriums. Viele der Unterschiede im Wirtsspektrum sind den *vir*-Genen zuzuschreiben, besonders den *virA* und *virG*, verantwortlich für die Aktivierung der übrigen *vir*-Region (LEROUX ET AL. 1987, GELVIN UND LIU 1994). Vier essentielle Faktoren sind nach DEROLES ET AL. (1997) für eine erfolgreiche *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation notwendig:

1. Eine effiziente Pflanzenregenerationsmethode wurde etabliert.
2. Die Verfügbarkeit des Regenerationssystems für die transformierten Zellen ist gegeben.
3. Die Selektionsmethode verhindert das Wachstum von nicht transgenen Zellen, während das Wachstum eines Großteils transgener Zellen ermöglicht wird.
4. Die transformierten Pflanzen besitzen eine intakte Kopie des Gens bzw. der Gene mit stabiler Genexpression und sind imstande das Gen bzw. die Gene an ihre Nachkommen weiterzugeben.

Bei der Entwicklung einer effizienten *A. tumefaciens*-vermittelten Pflanzentransformationsmethode sollten auch besonders Faktoren, wie Pflanze-Bakterium beeinflussende Umweltfaktoren, berücksichtigt werden. Zu diesen Faktoren zählen zum Beispiel phenolische Substanzen, die bei der Wundreaktion der Pflanze produziert werden (STACHEL ET AL. 1985, BOLTON ET AL. 1986, GODWIN ET AL. 1991). Außerdem Zucker (ANKENBAUER UND NESTER 1990), von *A. tumefaciens* produzierte Komponenten, wie Opine (VELUTHAMBI ET AL. 1989), Pflanzen- und Explantatart als auch die Kokultur- (MATHIS UND HINCHEE 1994) und Vorkulturbedingungen. Bezüglich

der Vorkulturbedingungen gibt es Hinweise darauf, dass Zellen, die DNA replizieren oder die Mitose durchlaufen, die größte Kompetenz für die Aufnahme von Genen beim *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer besitzen (MEYER ET AL. 1985). Dies könnte darin begründet sein, dass mit der Reaktivierung des Zellzyklus und der DNA-Replikation diejenigen Enzymkomplexe aktiviert werden, die für die Synthese des zweiten T-DNA-Stranges und dessen Integration in das Rezeptorgenom notwendig sind (DRAPER UND SCOTT 1991).

Ausgehend von einer *A. tumefaciens*-vermittelten Pflanzentransformation wurden in dieser Arbeit mehrere Faktoren berücksichtigt, die maßgeblich den Erfolg einer Transformation beeinflussen können. Diese Faktoren waren das Zielgen (*gfp*), die Selektion transgener Zellen, der verwendete *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm, der verwendete Vektor und die Explantart.

4.1 Transiente GFP-Expression

Auf Basis eines transienten Systems wurde die Funktion verschiedener *GFP*-Versionen in drei Pflanzenarten getestet. Transiente Genexpression ist eine vorübergehende, nicht dauerhafte Expression eines Gens. GHEYSEN ET AL (1998) verwiesen auf die Möglichkeit Effekte in kurzer Zeit über transiente Genexpressionen zu beobachten und zur Etablierung von Transformationsprotokollen zu verwenden.

Anhand von Versuchen zur transienten Genexpression sollte die Expression von zwei *GFP*-Varianten, des *mGFP4* (HASELOFF ET AL. 1997) und des *smRS-GFP* (DAVIS UND VIERSTRA 1998) an *Petunia* Cultivars, *Pelargonium* und *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) getestet werden. *mGFP4* besitzt die spektralen Eigenschaften des Wildtyps, allerdings wurden in die Gensequenz des Proteins zwei Mutationen (Nukleotid 380 und 463) eingeführt, die die Fluoreszenz verbessert haben (HASELOFF ET AL. 1997). Das *mGFP4* wurde unter anderen in Suspensionskulturen von Sojabohne (PLAUTZ ET AL. 1996), *Arabidopsis* (HASELOFF ET AL. 1997), Tabak (STEWART 1996) und anderen Pflanzen erfolgreich exprimiert. *smRS-GFP* stellt eine Verbesserung gegenüber *mGFP4* dar, die sich in vergleichenden Untersuchungen bei *Arabidopsis* in einer stärkeren Fluoreszenz, bedingt durch die Integration der S65T Mutation, äußerte (DAVIS UND VIERSTRA 1998).

Aus den Versuchen zur transienten GFP-Expression sollte die Eignung des *gfp* als Reportergen für stabile Transformationsversuche abgeleitet werden. Aufgrund der

hohen Fluoreszenzintensität, der Anzahl an smRS-GFP exprimierenden Bereichen und der leichteren Detektion von *smRS-GFP* im Vergleich zu *mGFP4* wurden spätere stabile Transformationsversuche ausschließlich mit dieser *smRS-GFP*-Variante durchgeführt.

PONAPPA ET AL. (1999) verglichen die vier GFP-Gene *sGFP*, *smGFP* und *smRS-GFP*, unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotor und des NOS-Terminators, in Versuchen zur transienten Genexpression in embryonalen Suspensionskulturen von Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merrill.). Hierbei resultierte das *smRS-GFP* in höherer Fluoreszenzintensität und leichterem Detektion in transienten Versuchen im Vergleich zu den anderen Genen. In späteren stabilen Transformationsversuchen zeigte *smRS-GFP* ebenfalls diese Eigenschaften. Eine gesteigerte Fluoreszenzintensität durch die S65T-Mutation in *smRS-GFP* wurde auch von DAVIS UND VIERSTRA (1998) berichtet. In *Escherichia coli* resultierte die S65T Fluorophore-Mutation von GFP in einer gesteigerten Helligkeit, schnelleren Chromophorenbildung und reduziertem Photobleaching (HEIM ET AL. 1995). In mehreren Versuchen zur transienten Expression konnte gezeigt werden, dass optimierte Bedingungen aus Versuchen zur transienten Expression auch in stabilen Transformationen zu einer höheren Anzahl transgener Pflanzen führt (CAO ET AL. 1998, KONDO ET AL. 2000, NIU ET AL. 2000, ZHANG ET AL. 2000, CHOI ET AL. 2001, TRIFONOVA ET AL. 2001, SUZUKI UND NAKANO 2002). GELVIN UND LIU (1994) testeten vorab in transienten Transformationen eine Großzahl an Kombinationen zwischen Bakterienstämmen, Transformationsprotokollen, Explantatarten und Genotypen, um die geeignete Kombination für stabile Transformationen anzuwenden.

4.2 A. *tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Petunia* Cultivars

Eine Vielzahl von *Petunia* Cultivars wurde bereits transformiert, was sich in ihrer Stellung als Modellpflanze in der pflanzlichen Molekulargenetik widerspiegelt. Petunien sind leicht über eine Vielzahl an Methoden zu transformieren und wurden bereits für die Entwicklung von Transformationsmethoden verwendet (DEROLES ET AL. 2002).

4.2.1 Selektionsbedingungen

Die Identifikation transgener Zellen erfolgt in der Regel durch den Transfer von Selektionsmarkergenen, beispielsweise Antibiotika- oder Herbizidresistenzgenen.

Selektionsmarkersysteme können in zwei Kategorien eingeteilt werden:

1. Negative Selektionssysteme, die auf Antibiotika- oder Herbizidresistenz beruhen.
2. Positive Selektionssysteme, die sich unter anderen aus dem pflanzlichen Zuckerstoffwechsel oder auch Hormonhaushalt ableiten lassen und den transformierten Zellen einen Vorteil verschaffen.

Eine weitere Kategorie stellen visuelle Reportergene dar. Diese Reportergene unterscheiden anhand visueller Genexpression transgenes von nicht transgenem Gewebe (WINK 2004). Ein visueller Reporter ist das *gfp* (Green Fluorescent Protein)-Gen aus der Qualle *Aequorea victoria*.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Selektion von transgenen Zierpflanzen ohne Herbizid- und Antibiotikaresistenzgene. Dazu sollte versucht werden, transgene Zellen und Sprosse mittels des visuellen Reporters *gfp* zu selektieren. Vor der Arbeit ohne Herbizid- oder Antibiotikaresistenzen stand jedoch die Etablierung eines erfolgreichen Transformationssystems mit Hilfe dieser Resistenzgene.

Von großer Wichtigkeit für die Transformationseffizienz ist die Selektion, da nur eine begrenzte Anzahl von Zellen transformiert wird (HALDRUP ET AL. 1998). Nicht transformierte Zellen sollten durch eine optimale Konzentration eines selektiven Agens in ihrer Regeneration inhibiert werden, die aber nicht zum Absterben der Explantate führen darf. Ist der Selektionsdruck zu hoch gewählt, kommt es zum Absterben oder zu eingeschränktem Wachstum der transgenen Zellen. Dies kann durch inhibierende Substanzen verursacht werden, die von abgestorbenen nicht-transgenen Zellen abgesondert werden oder durch die Unterbrechung des Transports essentieller

Nährstoffe durch abgestorbenes Gewebe zu transgenen Zellen (HALDRUP ET AL. 1998). Die optimale Konzentration eines Selektionsagens ist stark Pflanzenart abhängig, aber auch innerhalb einer Art variiert diese stark zwischen Genotypen.

Als Herbizidresistenz-Gen wurde das *bar*-Gen unter Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors eingesetzt. Das *bar*-Gen befähigt transgene Pflanzen zur Inaktivierung des Herbizids Phosphinothricin (PPT). In der vorliegenden Arbeit wurde anfangs mit dem *bar*-Gen gearbeitet, forciert durch die Richtlinie 2001/18/EG (EU-Richtlinie 2001/18/EG), die die schrittweise Einschränkung der Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen in GVO vorsah. In späteren Transformationsversuchen dieser Arbeit wurde mit dem *nptII*-Gen, welches eine Resistenz gegenüber Antibiotika wie Kanamycin verleiht, unter Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors gearbeitet. Bezüglich der Verwendung von Antibiotikaresistenz-Genen kam es Anfang 2007 zu einer Neueinstufung durch das Expertengremium der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit. Das Antibiotikaresistenz-Gen *nptII* wurde dabei in die Gruppe uneingeschränkt verwendbarer Antibiotikaresistenz-Gene einordnet. Begründet wurde diese Entscheidung durch die Beurteilung eines extrem unwahrscheinlichen Gentransfers von einer Pflanze auf Bakterien und der bereits weiten Verbreitung des *nptII*-Gens in der Natur (EFSA, 2007).

Nach Testung steigender Konzentrationen der selektiven Agenzien auf die Regenerationsfähigkeit nicht transformierter Blattexplantate von *Petunia* Cultivars wurde eine inhibierende Konzentration des herbiziden Selektionsagens PPT von 1,0 mg/L für die Genotypen mit hoher Regenerationsfähigkeit ('Famous Electric Purple' und 'Famous Lilac Dark Vein') und 0,5 mg/L PPT für 'Famous Violet Dark Eye' und 'Famous Cerise Pearl' verwendet (siehe Abb. 3.7). TJOKROKUSUMO ET AL. (1999) verwendeten erfolgreich 3 mg/L Phosphinothricin für *Agrobacterium tumefaciens* Vaccuuminfiltration bei *Petunia*-Sämlingen.

Bei Verwendung von Kanamycin als selektives Agens wurde für die drei Genotypen 'Famous Electric Purple', 'Famous Lilac Dark Eye' und 'Famous Lilac Dark Vein' eine inhibierende Konzentration von 100 mg/L Kanamycin verwendet. Für den weniger gut regenerierenden Genotypen 'Famous Cerise Pearl' wurde eine Konzentration von 50 mg/L Kanamycin gewählt, bei der nicht-transgene Zellen nicht regenerieren konnten. MICHALCZUK UND WAWRZYNCZAK (2004), DIETZ-PFEILSTETTER ET AL. (2003) und VAN DER MEER (1999) selektierten erfolgreich *Petunia* Cultivars Blattexplantate mit 100 mg/L Kanamycin. Im Vergleich wurde für die Selektion von Tabak

Blattexplantaten 300 mg/L (HORSCH ET AL. 1985), für *Campanula carpatica* Hypokotyl und Kotyledonen 100 mg/L (SRISKANDARAJAH ET AL. 2004) und für Blattexplantate von *Verbena hybrida* 50 mg/L (TAMURA ET AL. 2003) Kanamycin verwendet.

In Versuchen zur Ermittlung geeigneter Selektionsbedingungen von Phosphinothricin und Kanamycin stellten sich besonders große Unterschiede im Regenerationsverhalten der Genotypen in den Kontrollen von Versuch zu Versuch (Abb. 3.5 und 3.8) dar. Dieses unterschiedliche Regenerationsverhalten wird vielfach in der In-vitro-Kultur beobachtet und ist wahrscheinlich auf unterschiedliche endogene Hormongehalte oder die unterschiedliche Aufnahme von pflanzlichen Wachstumsregulatoren zurückzuführen. Einen genotypischen Einfluss auf die Cytokinin kontrollierte Sprossregeneration untersuchten SKVIRSKY ET AL. (1984) am Beispiel von zwei *Petunia* Genotypen. Hier reagierte der eine Genotyp mit hoher Sprossregeneration bei einer NAA-Konzentration von 0,1 mg/L und 0,2 mg/L BAP, während der andere Genotyp bei dieser Konzentration keine Sprosse regenerierte. In vergleichenden Untersuchungen zum BAP-Metabolismus zweier Linien von *Petunia* Cultivars stellten AUER ET AL. (1992) ebenfalls große, genotypenspezifische Unterschiede bezüglich der Cytokinin-Aufnahme fest. Dabei übten die Schnelligkeit der Aufnahme sowie die aufgenommene Menge einen starken Einfluss auf die Regenerationsdauer aus.

4.2.2 Einfluss des *A. tumefaciens*-Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin

Erste Transformationsversuche mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP bei *Petunia* Cultivars führten zu starker Sprossregeneration, aus denen keine transgenen Sprosse gewonnen werden konnten (siehe 3.3.3.1). Dies ließ Zweifel an der Selektionswirkung von PPT zu. Die Testung einer geeigneten Selektionsschwelle mit steigenden Konzentrationen eines selektiven Agens basiert allein auf der Regenerationsfähigkeit eines Genotyps und vernachlässigt den Einfluss einer *Agrobacterium*-Infektion. Daher sollte geklärt werden, ob verschiedene *A. tumefaciens*-Stämme einen Effekt auf die Selektionswirkung des herbiziden Wirkstoffs Phosphinothricin und damit auf die Sprossregeneration von Blattexplantaten bei *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' hatten.

Dieser Versuchsansatz zeigte in drei Teilversuchen den Einfluss verschiedener *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme auf die Selektionswirkung einer zuvor letal

getesteten Konzentration von PPT auf die Sprossregeneration von *Petunia*. Die Ergebnisse zeigten eine verminderte Wirksamkeit gegenüber dem Selektionsagens PPT nach Inkubation des PPT-haltigem Mediums mit *Agrobacterium*-Suspension. Es kam dabei vermutlich zu einem Abbau oder einer Detoxifizierung von Phosphinothricin durch bestimmte *Agrobacterium*-Stämme während der Inkubation über Nacht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Stoffwechselprodukte bestimmter *Agrobacterium*-Stämme oder Abbauprodukte von Medienbestandteilen die Sprossregeneration dieses Petunien-Genotyps verstärkten.

Vergleichende Arbeiten befassten sich bei *Dianthus caryophyllus* L. und *Dianthus chinensis* mit der Wirksamkeit verschiedener Selektionsagenzien (ZHANG ET AL. 2005).

ZHANG ET AL. (2005) untersuchten den Einfluss einer *Agrobacterium*-Infektion mit den *Agrobacterium*-Stämmen EHA101 und C58C51 auf die Resistenz von Blattexplantaten gegenüber Kanamycin, Phosphinothricin und Mannose. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *Agrobacterium* die Toleranz gegenüber den Selektionsagenzien verstärkt. Gründe für diese verstärkte Toleranz gegenüber den Selektionsagenzien vermuteten ZHANG ET AL. (2005) in der durch Verwundung an Blattexplantaten auftretenden Abwehrmechanismen der Pflanze und der dadurch induzierten Pathogenesis-related Proteins (PR). Höhere Pflanzen schützen sich vor verschiedenen Stressfaktoren durch Änderung ihres physiologischen Zustandes. Als PR-Proteine werden Polypeptide bezeichnet, die in der gesunden Pflanze nicht akkumulieren, sondern erst nach Pathogenbefall (Pilze, Bakterien oder Viren), durch physikalischen Stress oder durch verschiedenste Umwelteinflüsse (Kälte, Trockenheit, Ozonbelastung) synthetisiert werden (KOMBRINK UND SOMSSICH 1995). Ob die PR-Proteine wirklich der Auslöser der verstärkten Toleranz sind, bedarf es noch zu klären, zumal die Kontrollexplantate ebenfalls verwundet wurden.

Aber auch DEKEYSER ET AL. (1989) beschrieben bei der Transformation von *Oryza sativa* Protoplasten eine nicht effiziente Selektion von Kanamycin. Hier war der transgene Kallus nicht in seinem Wachstum durch kanamycinhaltiges Medium eingeschränkt, sondern der Kontrollkallus wuchs 30 % langsamer als der transgene Kallus.

Die in diesem Versuch verwendeten *Agrobacterium*-Stämme EHA105 und LBA4404 sind viel verwendete Stämme, in Transformationsansätzen in denen Phosphinothricin als Selektionsagens eingesetzt wird. Hierbei fand vor allem der *Agrobacterium*-Stamm LBA4404 Anwendung in Transformation von *Petunia*-Blattexplantaten

(MICHALCZUK UND WAWRZYNCZAK 2004, DIETZ-PFEILSTETTER ET AL. 2003, GARABAGI UND STROMMER 2000, VAN DER MEER 1999, DEROLES UND GARDNER 1988). Die *Agrobacterium*-Stämme LBA4404 und EHA105 wurden bei ZIV ET AL. (2005) zur Transformation von Blattexplantaten bei *Petunia* verwendet.

EHA105 fand beispielhaft als effektiver *Agrobacterium*-Stamm Anwendung bei erfolgreichen Transformationen von somatischen Embryonen von *Coffea canephora* P. (RIBAS ET AL. 2006) selektiert mit 2 mg/L PPT, Hypokotyl-, Kotyledonen- und Blattexplantaten von *Perilla frutescens* selektiert mit 2 mg/L PPT (LEE ET AL. 2005), Blattexplantaten von *Malus domestica* Borkh. (SZANKOWSKI ET AL. 2003). DE CLERQ ET AL. (2002) zeigten in *Phaseolus acutifolius*, dass der *Agrobacterium*-Stamm EHA105 (wie auch EHA101) in den durchgeführten Experimenten der ineffizienteste Stamm war, ähnliches beschrieben auch JIA ET AL. (1989) für *Kalanchoe* und SRIVATATAKUL ET AL. (2001) für Hibiskus. Diese Ergebnisse zeigen besonders die Wichtigkeit einer Prüfung geeigneter *Agrobacterium*-Stämme für jede Pflanzenart und jeden zu transformierenden Genotypen.

Es konnten aber keine Hinweise in der Literatur gefunden werden, in denen Erklärungsansätze für die herabgesetzte Wirksamkeit des PPT und die Regeneration fördernde Wirkung bestimmter *Agrobacterium*-Stämme geliefert werden. Lediglich BARTSCH UND TEBBE (1989) verwiesen auf die Degradierung von Phosphinothricin durch Bodenbakterien. In ihren Untersuchungen klassifizierten sie resistente Mikroorganismen in zwei Gruppen: Mikroorganismen, die L-PPT als Stickstoffquelle verwenden können und Mikroorganismen, denen dies nicht möglich ist. Für *Agrobacterium tumefaciens* konnte hierbei nachgewiesen werden, dass sie eine hohe Konzentration an PPT tolerierten, aber nicht als Stickstoffquelle verwenden können.

Zukünftige Transformationsexperimente werden berücksichtigen müssen, dass bestimmte *Agrobacterium*-Stämme die Wirksamkeit von PPT herabsetzen und die Regeneration fördern und dies in die Versuchsdurchführung einfließen lassen.

4.2.3 Vergleich der Transformationseffizienz bei Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP

Zu Beginn der Transformationsversuche bei *Petunia* Cultivars wurde der Vektor pGreenII0229smRS-GFP verwendet. Der Vektor pGreenII0229 gehört in das Vektorsystem pGreenII (HELLENS ET AL. 2000b) und beinhaltet das *bar*-Gen als Selektionsmarker auf der T-DNA. Das Vektorsystem pGreenII ist ein binärer Ti-Vektor mit einer „Extensive Multiple Cloning Site“, einer reduzierten Vektorgröße, der T-DNA Sequenz aus pTiT37 und einer overdrive Sequenz eines Octopin-Ti-Plasmids. Diese Sequenz wirkt sich positiv in cis auf das Ausschneiden der T-DNA und damit auf den Transfer der T-DNA aus (HELLENS ET AL. 2000).

Wie zuvor beschrieben konnte mit dem verwendeten Phosphinothricin (Kap. 3.3.3.1, Abb. 3.14) nicht effizient selektiert werden und daraus folgend führte dies zu einer geringen Transformationseffizienz. Lediglich mit den *Agrobacterium*-Stämmen EHA105 und GV3101 in Kombination mit pGreenII0229smRS-GFP konnten transgene Sprosse erzielt werden. Die Transformationseffizienz lag bei Verwendung des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes GV3101 bei 1 % und bei EHA105 bei 34 % und 2 %, jeweils nur in einem von mehreren Versuchsdurchgängen (Abb. 3.14). VAN DER MEER (1999) transformierte Petunien Blattexplantate mit dem *Agrobacterium*-Stamm LBA4404 mit Kanamycin-Selektion und erzielte eine Transformationsrate von 20 %. TJOKROKUSUMO ET AL. (2000) vakuuminfiltrierten *Petunia*-Pollen mit dem *Agrobacterium*-Stamm AGL0 und erzielten unter Phosphinothricin-Selektion in der T1-Generation eine Transformationsrate von 55 %. WANG UND KUMAR (2006) transformierten Petunien Blattexplantate mit dem *Agrobacterium*-Stamm GV3101, machten aber keine Angaben über die Transformationseffizienz.

Bei der Verwendung des Vektors pGreenII0229smRS-GFP kam hinzu, dass eine GFP-Expression nur während der Kallusphase detektiert werden konnte und sich daraus entwickelnde Sprosse keine oder nur sehr schwache Fluoreszenz aufwiesen, was eine spätere Selektion über GFP nicht durchführbar erschienen ließ. Ein Grund für die Abnahme der Fluoreszenzintensität könnte im Entwicklungszustand liegen. In älteren Blättern ist die zytoplasmatische Dichte der Zellen besonders gering und Vakuolen, die frei von GFP sind, machen einen Großteil der Zelle aus, was zu einem „Verdünnen“ des GFP-Gehalts führen kann (MAXIMOVA ET AL. 1998, MOLINIER ET AL. 2000; CHO UND WIDHOLM 2002). Aber auch die Autofluoreszenz des Chlorophylls könnte ein Störfaktor sein, vor allem in Gewebe mit hohem Chlorophyllgehalt (VAN DER GEEST UND

PETOLINO 1998, VAIN ET AL. 1998, PONAPPA ET AL. 1999, KAEPPLER ET AL. 2000, JORDAN 2000, CHO ET AL. 2002, ZHOU ET AL. 2005). Andere Gründe für die Abnahme der Fluoreszenz könnten eine entwicklungsbedingte oder zellspezifische Expression des CaMV 35S-Promotors sein (PONAPPA ET AL. 1999, ZHU ET AL. 2004) oder eine Geninaktivierung (gene-silencing) (VOINNET UND BAULCOMBE 1997).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Vektor und damit einhergehend der Selektionsmarker und der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm in nachfolgenden Versuchen verändert. Transformationsversuche mit dem Vektor pMen65smRS-GFP mit 35S-*nptII* als Selektionsmarker und dem *Agrobacterium*-Stamm ABI zeigten in der Kallusphase und der weiteren Sprossentwicklung klar zu detektierende stabile Fluoreszenz. Versuche, die zum Ziel hatten die Transformationseffizienz bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion zu untersuchen, konnten nun durchgeführt werden. Beim Vergleich dieser Selektionsvarianten zeigte die Variante, die ausschließlich mittels GFP-Expression selektiert wurde, eine höhere Anzahl selektierter Sprosse mit GFP-Expression in allen vier *Petunia* Cultivars als die Variante mit Kanamycin-Selektion (siehe Tabelle 3.2-3.5). Nach PCR-Überprüfung aller über GFP-Expression selektierten Sprosse konnte die Transformationseffizienz berechnet werden. Die Transformationsrate wurde hierbei nicht wie üblich berechnet, indem ein Spross pro Explantat verwendet wurde und darauf basierend die Transformationsrate bestimmt wurde. Sondern hierbei wurden für die Berechnung der Transformationsrate alle GFP positiven Sprosse, die am Explantat regenerierten geerntet, über PCR getestet und in Bezug zur Anzahl Sprosse gesamt genommen. Basierend auf diesen Berechnungen der Transformationsrate wies die Variante GFP+Kan in den zwei Genotypen 'Famous Electric Purple' und 'Famous Lilac Dark Vein' eine höhere Transformationsrate als die Variante GFP auf. Im Genotyp 'Famous Violet Dark Eye' waren die Transformationsraten in den beiden Varianten identisch, lediglich im Genotyp 'Famous Cerise Pearl' wies die Variante GFP eine höher Transformationsrate auf. BOWER ET AL. (1996) verzeichneten eine 10fach geringere Transformationsrate bei visuell über Luciferase selektierten Kalluskulturen von *Saccharum* nach Particle Bombardment verglichen mit Kanamycin- oder Phosphinothricin-Selektion.

Die Transformationsraten der einzelnen Versuche unterlagen relativ starken Schwankungen. Diese Schwankungen können, zum Beispiel durch die Umgebungstemperatur im Labor hervorgerufen sein, die im Versuchszeitraum jahreszeitlich bedingt stark schwankte sowie vom Alter der Blattexplantate. DAVIS ET

AL. (1991) konnten bei Tomaten feststellen, dass die älteren Blätter leichter zu transformieren waren als jüngere und dass es starke genotypische Unterschiede innerhalb einer Art gab. Genotypische Unterschiede in der Transformationseffizienz konnten auch bei den untersuchten *Petunia* Cultivars festgestellt werden. Die Genotypen, die sich gut aus Blattexplantaten regenerieren ließen, ermöglichten auch eine gute Transformationseffizienz (Abb. 3.5, Tab. 3.2-3.5). Beim Vergleich der Transformationsraten bei Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion trat in der Variante GFP eine sehr hohe Anzahl an Escapes im Vergleich zur Variante Kanamycin und GFP auf. Diese über PCR überprüften Sprosse wiesen zum Selektionszeitpunkt smRS-GFP-Fluoreszenz auf und entwickelten sich auch auf Sprosskulturmedium mit Kanamycin und Cefotaxim weiter. Das zu beobachtende Wachstum dieser Sprosse kann darauf zurückzuführen sein, dass die T-DNA nicht ins Genom integriert und im Verlauf der Kultur abgebaut wurde (DEROLES UND GARDNER 1988).

In der Variante GFP traten in der hohen Anzahl selektierter Sprosse in einzelnen Fällen Sprosse mit fasciierter Wuchsform auf (Abb. 3.21). Unter Fasciation versteht man missgebildete, zusammenhängende Organe bei Gefäßpflanzen, hierbei ist die am meisten beschriebene Form der Fasciation die bändrige Form. Ab einem bestimmten Entwicklungszustand wechselt das Wachstum der Sprossspitze von einer konischen in eine kammartige Form, wobei der Unterschied zwischen fasciierten und normalen Sprossen in der Menge an gebildetem Gewebe und des Wachstums in eine bestimmte Richtung liegt. Fasciationen werden durch eine Vielzahl an Ursachen hervorgerufen, diese können sowohl natürliche (Schädlingsbefall, Druck, saisonale Einflüsse, geringe Temperaturen) als auch künstliche Ursachen (Entlaubung, Verwundung, Röntgenstrahlung, Polyploidisierungsmittel, Wachstumsregulatoren) haben (GORTER 1965). In der In-vitro-Kultur treten Fasciationen zum Beispiel bei der Verwendung von TDZ (AMUTHA ET AL. 2006, BAKER UND WETZSTEIN 1992, KANYAND ET AL. 1994) auf. Die Ursache für eine Fasciation in den hier beschriebenen Transformationen liegt wahrscheinlich in einer Wachstums stimulierenden Wirkung von pflanzlichen Wachstumsregulatoren oder dass es im Laufe der Kultur zu einer Polyploidisierung kam. Phänotypische Abweichungen traten auch bei transformierten Sprossen, die ins Gewächshaus überführt wurden, auf. Hier konnten vergrößerte Blätter, Blattdeformationen oder Störungen in der Chlorophyllsynthese (Abb. 3.41 und 3.42) im

Gegensatz zur Kontrolle beobachtet werden. Inwieweit diese phänotypischen Abweichungen auf Polyploidisierung zurückzuführen sind, wurde nicht analysiert.

4.2.4 Nachweis der Integration und Expression von Transgenen

In Hinblick auf die Zielsetzung der Selektion transgener Zierpflanzen mittels PCR wurden drei DNA-Extraktionsmethoden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und Effektivität in der DNA-Präparation bei *Petunia* verglichen. Hierbei resultierte die Schnellisolation nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) als die Methode mit der höchsten DNA-Ausbeute (Abb. 3.22) und nach Zeit- und Kostenkalkulation (Tab. 3.8) als die kostengünstigste Methode. Die isolierte DNA nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) war zum Teil stärker verunreinigt als die DNA isoliert mit dem DNA-Isolationskit DNeasy® PlantMini von QIAGEN, konnte aber trotzdem für Southern Hybridisierung verwendet werden. Die drei verwendeten DNA-Extraktionsmethoden unterschieden sich in ihren verwendeten Extraktionspuffern (Tab. 3.6), wobei die Zusammensetzung des QIAGEN-Extraktionspuffers vom Hersteller nicht angegeben wurde. Der Extraktionspuffer nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) beinhaltet das Detergens SDS, welches wasserunlösliche Lipide emulgieren kann und zum Aufbrechen der Zellmembran führt (BROWN 2002). Das vielverwendete DNA-Extraktionsprotokoll von DELLAPORTA ET AL. (1983) basiert ebenfalls auf einem SDS-Extraktionspuffer und wurde erfolgreich in *Petunia* bei WRIGHT ET AL. (1989) verwendet.

Für molekulare Analysen konnte eine effektive, kostengünstige und mit geringstem apparativem Aufwand durchzuführende Methode zur Aufbereitung von Pflanzenmaterial und DNA-Extraktion nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) für *Petunien* etabliert werden.

Eine Auswahl transgener Pflanzen, hervorgegangen aus Transformationsversuchen mit pGreenII0229smRS-GFP und pMen65smRS-GFP, wurden hinsichtlich der Integration des *smRS-GFP* ins Pflanzengenom und deren Anzahl an integrierten Genkopien mit Hilfe von Southern Hybridisierung untersucht. Dabei wurde ein überwiegender Teil der transgenen Pflanzen mit Mehrfach-Integrationen, aber auch singuläre und Pflanzen ohne Integrationen nachgewiesen. Dabei wurden Pflanzen aus

Transformationsversuchen mit pMen65smRS-GFP mit identischen Bandenmustern nachgewiesen (Abb. 3.30 und 3.31). Beim Auftreten von identischem Bandenmuster handelt es sich um denselben Klon, bedingt durch die Selektionsmethode. Bei der GFP-Selektion wurden alle fluoreszierenden Sprosse eines Explantats auf Selektionsmedium weiterkultiviert, so konnten keine unabhängigen transgenen Sprosse mehr sichergestellt werden. In den Transformationsversuchen mit pGreenII0229smRSGFP in EHA105 wurde nur ein Spross je Explantat auf Selektionsmedium weiterkultiviert, um unabhängige Transgene zu gewährleisten. Das Ergebnis der Southern Hybridisierung zeigte, dass es bei den untersuchten Transgenen nicht zu identischen Bandenmustern kam (Abb. 3.29).

Ein Auftreten von multiplen Integrationen und daraus folgender Geninaktivierung wird oftmals als Nachteil von direkten Genübertragungen gesehen im Gegensatz zum *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer (FINNEGAN UND MCELROY 1994). MATZKE ET AL. (1994) postulierten die Anwesenheit von multiplen Integrationen eines Gens als Auslöser von Geninaktivierungen. Aber auch das Auftreten von sich wiederholenden Sequenzen (Promotor und Terminator) in der T-DNA und/oder ein hoher Transkriptionsgrad des Transgens, resultiert in Inaktivierung eines der beiden übertragenen Gene und multiplen Insertionen (LECHTENBERG ET AL. 2003, SCHUBERT ET AL. 2004, MELANDER ET AL. 2006). In den meisten Fällen ist die Inaktivierung mit einer Methylierung von CG/CNG Sequenzen in der inaktivierten Region verbunden (HOBBS ET AL. 1993, PARK ET AL. 1996, KOHLI ET AL. 1999, DE WILDE ET AL. 2001).

Es kommt aber nicht immer zu einer Inaktivierung der Expression, wie CHAREONPORNWATTANA ET AL. (1999) und KOHLI ET AL. (1999) bei Reis zeigten. KOHLI ET AL. (1999) zeigten vielmehr, dass die Expression des *gusA*-Gens durch multiple Integrationen nicht nachteilig beeinflusst wird, sondern gleich der Expression von singulären Integrationen sein kann. Ausschlaggebend für eine Geninaktivierung war vielmehr die Art und Weise wie die Kopien integriert waren, wenn sie als inverted repeats vorlagen, begünstigte dies die Inaktivierung eines Gens (HOBBS ET AL. 1993, STAM ET AL. 1997).

Der Mechanismus einer Geninaktivierung ist noch nicht vollständig verstanden, aber WATERHOUSE ET AL. (2001) fassten einige Erklärungsansätze in einem Überblick zusammen. Ein Erklärungsansatz geht davon aus, dass eine hohe Kopienzahl eines Transgens hohe Gehalte an mRNA produziert, die wiederum der Auslöser der Degradierung sind (LINDBO UND DOUGHERTY 1992, DOUGHERTY UND PARKS 1995). Ein

anderer Erklärungsansatz führt das Vorhandensein einer doppelsträngigen-RNA als ausschlaggebend für Degradierungsprozesse an. Multiple Integrationen und die Anordnung als inverted repeats fördern die Entstehung von doppelsträngiger RNA oder die Bildung von hairpin-RNA, wodurch eine Kaskade an Prozessen induziert werden, die in der Inaktivierung von Genen resultieren (WATERHOUSE ET AL. 1998).

Inwieweit die multiplen Insertionen die Aktivität der Gene beeinflussen, wurde in dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopisch und durch Expressionsanalysen auf Transkriptionsebene mit Hilfe von RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) überprüft. Für alle untersuchten *smRS-GFP* transgenen Pflanzen konnte dabei das erwartete *smRS-GFP* Fragment in der RT-PCR amplifiziert werden und somit die Transkription des *smRS-GFP* nachgewiesen werden (Abb. 3.44). Selbst in der Pflanze (T1), die nach Southern Hybridisierung keine Integration des *smRS-GFP* zeigte, konnte die Transkription nachgewiesen werden.

Nach den Ergebnissen der Southern Hybridisierung wurden die untersuchten Sprosse wiederholt fluoreszenzmikroskopisch auf *smRS-GFP*-Expression untersucht, hierbei zeigte sich ein klar zu detektierender Unterschied zwischen Petunien mit singulärer, multipler oder Pflanzen ohne Integration des *smRS-GFP*. Mit zunehmender Kopienzahl in der Pflanze nahm die Expression deutlich ab und wurde nur noch am Blattrand partiell nachweisbar. TAMURA ET AL. (2003) bestätigten den Einfluss des positionalen Effekt des integrierten Transgens, verursacht durch multiple Insertionen bei Internodiensegmenten von *Verbena hybrida* auf die sGFP-Expression. Transgene Linien mit einer Kopie hatten eine stärkere GFP-Expression, als solche mit mehreren Kopien. Keine klare Korrelation zwischen Kopienzahl und Gen-Expression konnte bei *Kalanchoe blossfeldiana* in Transformationen mit dem *uidA*-Gen (AIDA UND STIBATA 1996), bei Reis (KOHLE ET AL. 1999) und Gerste (TRIFONOVA ET AL. 2001) ausgemacht werden.

Die Pflanze, die in Southern Hybridisierung keine Integration des *smRS-GFP* zeigte, exprimiert partiell in Blättern fleckenartige *smRS-GFP*-Fluoreszenz. Dies bestätigt die vorher positive PCR auf *smRS-GFP* und die Ergebnisse der RT-PCR. Mögliche Ursachen für den mangelnden Nachweis einer Integration könnten auf eine nicht stattgefundenene Integration ins Pflanzengenom oder Deletionsmutation des *smRS-GFP* in dieser Pflanze zurückzuführen sein. ROSELLINI ET AL. (2007) führten ein fehlendes Hybridisierungssignal auf die Deletion eines Zielgens in transgenen *Medicago sativa* zurück. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es entscheidend, sich einen Überblick über die

Kopienzahl des entsprechend Zielgens zu machen, hierfür sind Southern Hybridisierung oder aber die quantitative Real-time PCR geeignete Methoden und zusätzlich GFP als visuellen Reporter.

Ins Gewächshaus überführte transgene In-vitro-Sprosse zeigten mit zunehmendem Entwicklungszustand eine schlechte Nachweisbarkeit des *smRS-GFP*, so konnte nur in sich entwickelnden Blättern und Blüten GFP-Expression festgestellt werden. Die Expression von GFP unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in transgenen Pflanzen wird von KAMATÉ ET AL. (2000), TAMURA ET AL. (2003) und ZHOU ET AL. (2004) in jungen Geweben und Organen sowie sich entwickelnden Sprossen ebenfalls als starkes Signal beschrieben, während ältere Blätter eine schwache GFP-Expression zeigten. Schwache oder keine GFP-Fluoreszenz in älteren Blättern beobachteten auch CHO UND WIDHOLM (2002), CUI ET AL. (2003) und TANIGUCHI ET AL. (2005). Auch MAXIMOVA ET AL. (1998) beobachteten das Phänomen, dass eine Detektion der 35S kontrollierten GFP-Fluoreszenz in älterem Gewebe vom Apfel schwieriger wird und führten dies darauf zurück, dass die Fluoreszenz teilweise vom Chlorophyll der Zelle absorbiert wird. ELLIOTT ET AL. (1999) wiesen auf die gleiche Problematik bei Zuckerrohr hin und empfahlen die Verwendung eines Bandpassfilters, der den roten Bereich der Chlorophyllfluoreszenz eliminiert.

ZHOU ET AL. (2004) untersuchten stark GFP exprimierende junge Blätter und schwach exprimierende ältere Blätter bei *Medicago truncatula* auf ihre mRNA-Gehalte. Nach RT-PCR zeigte sich in allen untersuchten Blättern gleiche RNA-Transkription, was gegen einen Verlust der Expression sprach.

Eine Vielzahl an Untersuchungen basieren auf GFP-Varianten unter der Kontrolle von konstitutiven CaMV 35S-Promotoren. CaMV 35S ist allgemein ein als konstitutiv beschriebener Promotor und seine konstitutiven Eigenschaften konnten in transgenen Pflanzen nachgewiesen werden (BENFEY ET AL. 1989, BATTRAW UND HALL 1990). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es zu Expressionsunterschieden bei der Verwendung dieses Promotors kommt (WILLIAMSON ET AL. 1989, SUNILKUMAR ET AL. 2002, HRASKA ET AL. 2007). WILLIAMSON ET AL. (1989) stellten eine unterschiedliche Akkumulation von RNA in unterschiedlichem Gewebe und Entwicklungsstadien der Pflanze, gesteuert vom 35S-Promotor, fest. Diese Erkenntnisse beeinträchtigen die Verwendung dieses Promotors für Genexpressionsuntersuchungen.

Durch die Wahl eines geeigneten *gfp*-Genes und der optimalen Filterkombination war es bei *Petunia* möglich, transgene Pflanzen allein aufgrund ihrer GFP-Fluoreszenz zu

selektieren und somit auf umstrittene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene zu verzichten. In dieser Arbeit kam es in Versuchen zum Vergleich der Transformationseffizienz bei Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP zum Auftreten von identischen Klonen nachgewiesen durch Southern Hybridisierung. Diese identischen Klone entstanden durch die Entnahme aller GFP exprimierender Sprosse an einem Explantat. In zukünftigen Transformationen sollte dies vermieden werden, um durch die Entnahme nur eines Sprosses pro Explantat, unabhängig transgene Sprosse zu gewährleisten. Basierend auf unabhängig transgenen Sprossen wäre es interessant, Transformationseffizienzen zwischen Selektion mit Kanamycin und smRS-GFP versus alleinige Selektion über smRS-GFP zu berechnen. Diese Transformationsraten sollten in zukünftigen Transformationsereignissen nicht nur über PCR bestätigt werden, sondern gleichzeitig die Kopienzahl der Transgenen berücksichtigen. Hier wäre der TaqMan[®] Assay für Real-Time PCR zur Bestimmung von Transgenen Kopienzahlen interessant. Mit diesem Assay könnte ein hoher Probendurchsatz am Tag analysiert werden im Vergleich zum geringen Durchsatz von traditionellen Methoden wie Southern Hybridisierung.

4.3 A. *tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Pelargonium*

Pelargonien sind eine der beliebtesten Topf- und Gartenpflanzen weltweit. Aus diesen Gründen besteht beträchtliches Interesse an der Entwicklung eines Transformationssystems zur Verbesserung von Krankheitsresistenz, Wuchsform und Blütenfarbe (DEROLES ET AL. 2002).

Für *Pelargonium* existieren bereits mehrere Publikationen zur Sprossregeneration und somatischen Embryogenese sowie darauf basierend verschiedene Transformationsprotokolle (MARSOLAIS ET AL. 1991, GILL ET AL. 1994, HUTCHINSON ET AL. 1996, MURTHY ET AL. 1996, WILSON ET AL. 1996, CROKE UND CASSELLS 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf dem Transformationssystem nach WINKELMANN ET AL. (2005) gearbeitet, indem kommerziell wichtige *Pelargonium zonale* Cultivars und *Pelargonium peltatum* Cultivars transformiert wurden, unter anderen die drei hier benutzten Genotypen.

Zur Entwicklung einer alternativen Strategie für die Detektion von transgenen Pelargonien wurde wie bei Petunien vorgegangen. Hierbei wurden transgene Zellen und

Sprosse mittels des visuellen Markers GFP während der Regeneration selektiert und anschließend mit Hilfe von molekularen Verfahren analysiert.

Zur Selektion transgener Zellen wurde zu Beginn das Selektionsmarkergen *bar* aus *Streptomyces hygrosopicus*, dessen Produkt die Resistenz gegen Phosphinothricin (PPT) verleiht, in Transformationen mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP verwendet. In späteren Transformationsversuchen mit dem Vektor pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm ABI wurde das *nptII*-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin (Kan) vermittelt, eingesetzt. Um eine effiziente Selektion transgener Zellen zu gewährleisten, wurde zunächst die optimale Konzentration des selektiven Agens ermittelt. Hierbei wurden für In-vitro-Blattexplantate von *Pelargonium* eine letale Konzentration von 0,5 mg/L PPT und eine Konzentration von 50 mg/L Kanamycin ermittelt. Die ermittelte Konzentration von 0,5 mg/L Phosphinothrin war identisch mit der Konzentration für Gewächshausmaterial von *Pelargonium* wie bei WINKELMANN ET AL. (2005) beschrieben. HASSANEIN ET AL. (2005) selektierten in Transformationsversuchen Blattexplantate von *Pelargonium x hortorum* und *Pelargonium capitatum* mit 100 mg/L Kanamycin.

Die Verwendung von Blattexplantaten im Gegensatz zu Blattstielexplantaten wurde in Vorversuchen als förderlich auf die Regeneration aus In-vitro-Material ermittelt und daher in Transformationen mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP verwendet. Da aus Transformationen mit dem Vektor pGreenII0229smRS-GFP in Verbindung mit verschiedenen *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen nur ein transgener Spross aus einer Transformation des *Pelargonium peltatum* Genotyps 'Royal Blue' (pGreenII0229smRS-GFP in EHA105) hervorging, wurde auch hier, wie in Petunien, der Vektor, der Selektionsmarker und der *Agrobacterium*-Stamm verändert. Der in späteren Transformationen verwendete Vektor war pMen65smRS-GFP im *Agrobacterium*-Stamm ABI. Bei der Verwendung dieses Vektors wurden neben Blattexplantaten auch Blattstielexplantate verwendet. WINKELMANN ET AL. (2005) verwiesen in ihrer Arbeit auf geringe Unterschiede in der Regeneration von Explantaten mit verschiedener Herkunft bei *Pelargonium*.

Versuche, die zum Ziel einen Vergleich zwischen Selektion auf smRS-GFP-Expression mit und ohne Kanamycin-Selektion in *Pelargonium* hatten, wiesen nur in der Variante, die anhand von GFP-Expression selektiert wurde, transgene Sprosse auf. Die Transformationseffizienz bei Verwendung von Blatt- oder Stielexplantaten war aber in dieser Variante mit 0,2-0,7 % zu gering. Aus der Variante mit Kanamycin-Selektion

konnten keine transgenen Sprosse gewonnen werden. ROBICHON ET AL. (1996) war es ebenfalls nicht möglich in *Pelargonium x hortorum* unter Verwendung von Kanamycin als Selektionsagens transgene Pflanzen zu regenerieren. Im Gegensatz zu BOASE ET AL. (1996), die Blattexplantate aus Gewächshauskultur von *Pelargonium x domesticum* transformierten. BOASE ET AL. (1998) modifizierten ihr entwickeltes Transformationsprotokolls und verwendeten In-vitro-Blattmaterial, Acetosyringon in Vor- und Kokulturmedium und senkten die Kanamycinkonzentration von 300 mg/L auf 50 mg/L und erreichten eine Transformationseffizienz von 19,3 % bei einem Modellgenotypen.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in den Varianten mit und ohne Kanamycin-Selektion wiesen in der Kallusphase der Variante mit Kanamycin-Selektion eine stärkere GFP-Expression auf. Aus starken GFP-Expressionen entwickelten sich teilweise keine weiteren Sprosse und die Regeneration stagnierte. Entstanden aus starkem GFP exprimierendem Kallus aber Sprosse, war die GFP-Expression in der Variante mit Kanamycin-Selektion höher als ohne Selektion, aber nicht PCR positiv. HASELOFF ET AL. (1997) berichteten bei *Arabidopsis* ebenfalls über Probleme in der weiteren Regeneration von stark 35S-mGFP4 exprimierendem Kallus und Sprossen. Sie vermuteten toxische Effekte oder Beeinträchtigungen in der Differenzierung durch hohe GFP-Gehalte, dies belegten auch ROUWENDAL ET AL. (1997) bei Tabak. In mehreren Publikationen liegen inzwischen erfolgreiche Transformationen von GFP ohne nachteiligen Effekt auf Zellwachstum, Regeneration oder Fertilität vor (z. B.: Tabak: CHIU ET AL. 1996, PANG ET AL. 1996, LEFFEL ET AL. 1997, BLUMENTHAL ET AL. 1999, HARPER ET AL. 1999; Citrus: GHORBEL ET AL. 1999; Schwarzfichte: TIAN ET AL. 1999; Petunie: GARABAGI UND STROMMER 2000; Weizen: JORDAN 2000, MOLINIER ET AL. 2000; *Medicago truncatula*: KAMATÉ ET AL. 2000; Hafer: KAEPLER ET AL. 2000; Gerste: CARLSON ET AL. 2001, MURRAY ET AL. 2004). HARPER ET AL. 1999 testeten eine mögliche Wachstumshemmung von drei verschiedenen *gfp*-Genen bei transgenen *Nicotiana tabacum* unter Feldbedingungen. In den Versuchen konnte kein Zusammenhang zwischen GFP und Wachstumshemmung gezeigt werden. NIWA ET AL. (1999) zeigten zudem in *Arabidopsis*, dass die sGFP (S65T)-Variante unter Kontrolle eines 35S-Promotors einen hohen Fluoreszenzgrad und morphologisch normale, fertile Pflanzen hervorbrachte.

Die Ergebnisse in Transformationen von *Pelargonium* zeigten, dass es möglich ist transgene Sprosse über GFP zu detektieren und durch eine effektive, kostengünstige

und mit geringstem apparativem Aufwand durchzuführen. Die Transformationsversuche mit *Pelargonium* resultierten in geringen Transformationsraten, so dass eine Veränderung des Protokolls Fortschritte bringen könnte. Denkbar wäre der Einsatz von Opinen, die bei VELUTHAMBI ET AL. (1989) die acetosyringon-induzierte Expression der *vir*-Gene auf das zwei- bis zehnfache steigerten. Mit Hilfe von GFP, als In-vivo-Reporter, besteht die Möglichkeit in späteren Transformationen diese Veränderungen der Transformationsmethode in kommerziell verwendeten Pelargonien zu visualisieren und weiter zu optimieren.

4.4 *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.)

Impatiens Cultivars (Neuguinea Grp.) sind neben *Impatiens walleriana*, die wichtigsten und am meisten verbreiteten *Impatiens* unter den Beet- und Balkonpflanzen. Obwohl sie eine der wichtigsten Beet- und Balkonpflanzen in der Welt ist, sind nur wenige Informationen verfügbar, da verschiedene private Firmen beachtliche Forschungsarbeit leisten, und sich diese Ergebnisse patentieren lassen (UCHNEAT 2006). Für *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) existieren keine publizierten Regenerations- und Transformationsprotokolle, zudem gilt die Pflanzenart als schwer zugänglich für den *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer. Die Ball Horticultural Company hat ein Verfahren für den Gentransfer entwickelt und patentieren lassen (CHOU UND BALL HORTICULTURAL COMPANY 2000). Das Protokoll der Ball Horticultural Company verwendet Sprossspitzen als Explantatquelle und basiert auf dem Austrieb bereits angelegter Meristeme in den Sprossspitzen. Vergleichende Arbeiten zur Regeneration von *Impatiens* sind veröffentlicht über die In-vitro-Vermehrung (HAN UND STEPHENS 1987, NIKOLOVA ET AL. 1996, STEPHENS ET AL. 1985), Regeneration aus Kotyledonen (HAN 1994) und Kultur von Embryonen (ARISUMI 1980, ARISUMI 1985). Keine dieser Arbeiten konnte zur Etablierung eines Regenerationssystems für Transformationen verwendet werden. Als Ausgangsmaterial für *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformationen von *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.) wurde ein von der Firma Klemm & Sohn GmbH & Co. KG erarbeitetes Regenerationsprotokoll genutzt und eine Selektionsstrategie mit der Verwendung von Phosphinothricin und Kanamycin erarbeitet. Im histochemischen GUS-Test konnte diese Strategie durch eine Vielzahl meristematischer Cluster mit GUS-Färbung bestätigt werden (Abb. 3.60).

Meristematische Cluster zeigten aber nur einzelne blau gefärbte Bereiche mit GUS-Expression und keine GUS-positiven Sprosse. Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass nur einzelne Bereiche des verwendeten meristematischen Clusters erfolgreich transformiert wurden, die aber nicht zur Regeneration von transgenen Sprossen befähigt waren. Dies zeigte sich auch in späteren Transformationen mit den Vektoren pGreenII0229smRS-GFP und pMen65smRS-GFP, denn hier konnten nur nicht-transgene Sprosse (Escapes) aus Transformationsversuchen regeneriert werden. Zu beobachten war in diesen Transformationen auch, dass sich an keinem der drei *Impatiens*-Genotypen GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch nachweisen ließ. Die Eignung von *gfp* als Reportergen wurde aber zuvor in einem Versuch zur transienten Genexpression bestätigt.

Die Isolierung von DNA erwies sich bei *Impatiens* ebenfalls als problematisch. Es wurden drei verschiedene DNA-Extraktionsmethoden auf ihre Durchführbarkeit bei *Impatiens* verglichen. Die einzige DNA-Extraktionsmethode, die sich als geeignet für die Isolation von DNA bei *Impatiens* herausstellte war das DNA-Isolationskit DNeasy[®]PlantMini von QIAGEN. CARR ET AL. (2003) verwiesen bereits auf die Problematik der DNA-Isolation aus Blattmaterial bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.). Nach verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden verwendeten sie ein kommerzielles DNA-Isolationskit von Amersham Pharmacia Biotech mit anschließender Chloroform:Phenol-Aufreinigung. CARR ET AL. (2003) vermuteten störende Polysaccharidgehalte im Blattmaterial als Auslöser. Eine modifizierte CTAB DNA-Extraktionsmethode wurde bei POREBSKI ET AL. (1997) für Blattmaterial von *Fragaria* mit hohen Polysaccharidgehalten und Polyphenolen verwendet, so dass für *Impatiens* die Überprüfung verschiedener CTAB DNA-Extraktionsprotokolle ratsam wäre.

Obwohl die Voraussetzungen für die Nutzung des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers nach ersten GUS-Transformationen bei *Impatiens* günstig zu sein schienen, ermöglichten die weiteren Untersuchungen unter Verwendung von GFP in Transformationen von meristematischen Clustern keine transgenen Sprosse. Andere Möglichkeiten des Gentransfers eröffnen sich durch die Nutzung des Particle Bombardment von meristematischen Clustern bei *Impatiens* Cultivars (Neuguinea Grp.). GELVIN UND LIU (1994) verwiesen für Pflanzenarten, die schwer zugänglich für einen *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer sind, auf die Möglichkeit eines erfolgreichen Gentransfers Partikel Bombardment.

5. Literatur

- AIDA, R. UND SHIBATA, M. (1996): Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* mediated *Agrobacterium tumefaciens* and transgene silencing. *Plant Science* 121: 175-185
- AMUTHA, S., MURUGANANTHAM, M., GANAPATHI, A. (2006): Thidiazuron-induced high-frequency axillary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiate* (L.) Wilczek. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 42: 26-30
- ANKENBAUER, R.G. UND NESTER, E.W. (1990): Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. *Journal of Bacteriology* 172: 6442-6446
- ARISUMI, T. (1980): In vitro culture of embryos and ovules of certain incompatible selfs and crosses among *Impatiens* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105: 629-631
- ARISUMI, T. (1985): Rescuing abortive *Impatiens* hybrids through aseptic culture of ovules. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110: 273-276
- AUER, C.A., COHEN, J.D., LALOUE, M., COOKE, T.J. (1992): Comparison of benzyl adenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. *Plant Physiology* 98: 1035-1041
- BAKER, C.M. UND WETZSTEIN, H.Y. (1992): Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut *Arachis hypogaea*. *Plant Cell Reports* 11: 71-75
- BARTSCH, K. UND TEBBE, C.C. (1989): Initial steps in the degradation of phosphinothricin (glufosinate) by soil bacterial. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 711-716

- BATTRAW, M.J. UND HALL, T.C. (1990): Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology* 15: 527-538
- BENDAHMANE, A., QUERCI, M., KANYUKA, K., BAULCOMBE, D.C. (2000): *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *The Plant Journal* 21: 73-81
- BENFEY, P.N., REN, L., CHUA, N., (1989): The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO Journal* 8: 2195-2202
- BEVAN, M. (1984): Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721
- BLUMENTHAL, A., KUZNETZOVA, L., EDELBAUM, O., RASKIN, V., LEVIN, M., SELA, I. (1999): Measurement of green fluorescence protein in plants: quantification, correlation to expression, rapid screening and differential gene expression. *Plant Science* 142: 93-99
- BOASE, M.R., DEROLES, S.C., WINEFIELD, C.S., BUTCHER, S.M., BORST, N.K., BUTLER, R.C. (1996): Genetic transformation of regal pelargonium (*Pelargonium x domesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 121: 47-61
- BOASE, M.R., BRADLEY, J.M., BORST, N.K. (1998): An improved method for transformation of regal pelargonium (*Pelargonium x domesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 139: 59-69
- BOLTON, G.W., NESTER, E.W., GORDON, M.P. (1986): Plant phenolic compounds induce expression of *A. tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* 232: 983-985

- BOWER, R., ELLIOTT, A.R., POTIER, B.A.M., BIRCH, R.G. (1996): High-efficiency, microprojectile-mediated co-transformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Molecular Breeding* 2: 239-249
- BROWN, T.A. (2002): *Gentechnologie für Einsteiger*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- CAO, X., LIU, Q., ROWLAND, L.J., HAMMERSCHLAG, F.A. (1998): GUS expression in blueberry (*Vaccinium ssp.*): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. *Plant Cell Reports* 18: 266-270
- CARLSON, A.R., LETARTE, J., CHEN, J., KASHA, K.J. (2001): Visual screening of microscope-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green fluorescence protein. *Plant Cell Reports* 20: 331-337
- CARR, J., XU, M., DUDLEY, J.W., KORBAN, S.S. (2003): AFLP analysis of genetic variability in New Guinea *Impatiens*. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1509-1516
- CHAREONPORNWATTANA, S., THARA, K.V., WANG, L., DATTA, S.K., PANBANGRED, W., MUTHUKRISHNAN, S. (1999): Inheritance, expression, and silencing of a chitinase transgene in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 371-378
- CHILTON, M.D., DRUMMOND, M.H., MERLO, D.J., SCIACKY, D., MONTOYA, A.L., GORDON, M.P., NESTER, E.W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271
- CHIU, W.L., NIWA, Y., ZENG, W., HIRANO, T., KOBAYASHI, H., SHEEN, J. (1996): Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6: 325-330
- CHO, H.-J. UND WIDHOLM, J.M. (2002): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of legume *Astragalus sinicus* using kanamycin resistance selection and green fluorescent protein expression. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 251-258

CHO, M.-J., CHOI, H.-W., JIANG, W., HA, CH.D., LEMAUX, P.G. (2002): Endosperm-specific expression of green fluorescent protein driven by the hordein promoter is stably inherited in transgenic barley (*Hordeum vulgare*) plants. *Plant Physiology* 115: 144-154

CHOI, Y.E., YANG, D.C., KUSANO, T., SANO, H. (2001): Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Panax ginseng* by plasmolyzing pre-treatment of cotyledons. *Plant Cell Reports* 20: 616-621

CHOU, T.S. (INVENTOR) UND BALL HORTICULTURAL COMPANY (ASSIGNEE) (2000): Production of transgenic *Impatiens*. US Patent 6121511, 18.05.2000

CODY, C.W., PRASHER, D.C., WESTLER, W.M., PRENDERGAST, F.G., WARD, W.W. (1993): Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemistry* 32: 1212-1218

CROKE, J. UND CASSELLS, A.C. (1997): Dark induction and genetic stability of somatic embryos of zonal pelargoniums (*Pelargonium x hortorum* Bailey). *Journal of Applied Botany* 71: 119-124

CUI, M.-L., HANDA, T., EZURA, H. (2003): An improved protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Antirrhinum majus* L.. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 296-302

DAVIS, M., LINEBERGER, R.D., MILLER, A.R. (1991): Effects of tomato cultivar, leaf age and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24: 115-121

DAVIS, S.J. UND VIERSTRA, R.D. (1998): Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology* 36: 521-528

DE CLERQ, J., ZAMBRE, M., VAN MONATGU, M., DILLEN, W., ANGENON, G. (2002): An optimized *Agrobacterium*-mediated procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Reports* 21: 333-340

- DE KATHEN, A. UND JACOBSEN, H.J. (1990): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pisum sativum* L. using binary and cointegrate vectors. Plant Cell Reports 9: 276-279
- DE VETTEN, N., WOLTERS, A.-M., RAEMAKERS, K., VAN DER MEER, I., TER STEGE, R., HEERES, E., HEERES, P., VISSER, R. (2003): A transformation method for obtaining marker-free plants of across-pollinating and vegetatively propagated crop. Nature Biotechnology 21: 439-442
- DE WILDE, C., PODEVIN, N., WINDELS, P. AND DEPICKER, A. (2001): Silencing of antibody genes in plants with single copy transgene inserts as a result of gene dosage effects. Molecular Genetics and Genomics 265: 647-653
- DEKEYSER, R., CLAES, B., MARICHAL, M., VAN MONATGU, M., CAPLAN, A. (1989): Evaluation of selectable markers for rice transformation. Plant Physiology 90: 217-233
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J., HICKS, J.B. (1983): A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21
- DEROLES, S.C. UND GARDNER, R.C. (1988): Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Molecular Biology 11: 355-364
- DEROLES, S.C., BOASE, M.R., KONCZAK, I. (1997): Transformation protocols for ornamental plants. In GENEVE, R.L., PREECE, J.E., MERKLE, S.A.(eds): Biotechnology of Ornamental Plants. CAB International: 87-119
- DEROLES, S.C., BOASE, M.R., LEE, C.R., PETERS, T.A. (2002): Gene transfer to plants. In VAINSTEIN, A. (ed.): Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches. Kluwer Academic Publishers: 155-196
- DIETZ-PFEILSTETTER, A., ARNDT, N., KAY, V., BODE, J. (2003): Molecular structure and regulatory potential of a T-DNA integration site in *petunia*. Transgenic Research 12: 83-99

- DOROKHOV, D.B. UND KLOCKE, E. (1997): A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russian Journal of Genetics* 33 (4): 358-365
- DOUGHERTY, W.G. UND PARKS, T.D. (1995): Transgenes and gene suppression: Telling us something new? *Current Opinion in Cell Biology* 7: 399-405
- DRAPER, J. UND SCOTT, R. (1991): Gene transfer to plants. IN GRIERSON, D. (ed.): *Plant Genetic Engineering*. Blackie & Son Ltd, London, Vol. 1: 38-81
- EBINUMA, H., SUGITA, K., MATSUNAGA, E., YAMAKADO, M. (1997): Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 2117-2121
- EDWARDS, K., JOHNSTONE, C., THOMPSON, C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349
- EFSA (2007): Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safe use of the *nptII* antibiotic resistance gene in genetically modified plants. <http://www.efsa.europa.eu> (03.03.2008)
- ELLIOTT, A.R., CAMPBELL, J.A., DUGDALE, B., BRETTELL, M.I.S., GROF, C.P.L. (1999): Green fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Rep* 18: 707-714.
- EU- RICHTLINIE 2001/18/EG (2008): Über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. http://www.bfr.bund.de/cm/208/richtlinie_2001_18_eg_ueber_die_absichtliche_freisetzung.pdf; 03.03.2008
- FINNEGAN, J. UND MCELROY, D. (1994): Transgene inactivation: Plants fight back! *Bio Technology* 12: 883-888

- FRALEY, R.T., ROGERS, S.G., HORSCH, R.B. (1983): Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 4803-4807
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. (1968): Nutrient requirements of suspension culture of soybean root callus. *Experimental Cell Research* 50, 151-158
- GARABAGI, F. UND STROMMER, J. (2000): Green fluorescent protein as an all-purpose reporter in *Petunia*. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 219-226
- GELVIN, S.B. UND LIU, C.N. (1994): Genetic manipulation of *Agrobacterium tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant species. In GELVIN, S.B., SCHILPEROORT, R.A. (eds.): *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 1-13
- GHEYSEN, G., ANGENON, G., VAN MONTAGU, M. (1998): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications. In LINDSEY, K. (ed.): *Transgenic Plant Research*. Harwood Academic, Amsterdam: 1-33
- GHORBEL, R., JUAREZ, J., NAVARRO, L., PEÑA, L. (1999): Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 350-358
- GILL, R., SENARATNA, T., SAXENA, P.K. (1994): Thidiazuron-induced somatic embryogenesis enhances viability of hydrogel-encapsulated somatic embryos of geranium. *Journal of Plant Physiology* 143: 408-413
- GODWIN, I., TODD, G., FORD-LLOYD, B., NEWBURY, H.J. (1991): The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports* 9: 671-675
- GORTER, C.J. (1965): Origin of fasciation. In RUHLAND, W. (ed.): *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer Verlag, New York: 330-351

- HALDRUP, A., PETERSEN, S.G., OKKELS, F.T. (1998): The xylose isomerase gene from *Theroanaerobacterium thermosulfigenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as selection agent. *Plant Molecular Biology* 37: 287-296
- HALFHILL, M.D., RICHARDS, H.A., MABON, S.A., STEWART, C.N. JR. (2001): Expression of GFP and Bt transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa*. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 659-667
- HAN, K. (1994): In vitro shoot regeneration from cotyledons of immature ovules of *Impatiens platypetala* Lindl.. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 30: 108-112
- HAN, K. AND STEPHENS, L.C. (1987): Growth-regulators affect in-vitro-propagation of two interspecific *Impatiens* hybrids. *Scientia Horticulturae* 32: 307-313
- HARPER, B.K., MABON, S.A., LEFFEL, S.M., HALFHILL, M.D., RICHARDS, H.A., MOYER, K.A., STEWART, C.N. JR. (1999): Green fluorescent protein in transgenic plants indicates the presence and expression of a second gene. *Nature Biotechnology* 17: 1125-1129
- HASELOFF, J. UND AMOS, B. (1995): GFP in plants. *Trends in Genetics* 11: 328-329
- HASELOFF, J., SIEMERING, K.R., PRASHER, D.C., HODGE, S. (1997): Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 94: 2122-2127
- HASSANEIN, A., CHEVREAU, E., DORION, N. (2005): Highly efficient transformation of zonal (*Pelargonium x hortorum*) and scented (*P. capitatum*) geraniums via *Agrobacterium tumefaciens* using leaf discs. *Plant Science* 169: 532-541
- HEIM, R., PRASHER, D., TSIEN, R. (1994): Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 12501-12504

HEIM, R., CUBITT, A.B., TSIEN, R.Y. (1995): Improved green fluorescence. *Nature* 373: 663-664

HELLENS, R.P., EDWARDS, E.A., LEYLAND, N.R., BEAN, S., MULLINEAUX, P.M. (2000): pGreen: a versatile and flexible binary Ti-vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 42: 819-832

HELLENS, R., MULLINEAUX, P., KLEE, H. (2000b): A guide to *Agrobacterium* binary Ti-vectors. *Trends in Plant Science* 5: 446-451

HOBBS, S.L.A., WARKENTIN, T.D., DE LONG, C.M.O. (1993): Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology* 21: 17-26

HOEKEMA, A., HIRSCH, P.R., HOOYKAA, P.J.J., SCHILPEROORT, R.A. (1983): A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180

HOLSTERS, M., SILVA, B., VAN VLIET, F., GENETELLO, C., DE BLOCK, M., DHAESE, P., DEPICKER, A., INZE, D., ENGLER, G., VILLARROEL, R.R. (1980): The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* 3: 212-230

HOOD, E.E., HELMER, G.L., FRALEY, R.T., CHILTON, M.-D. (1986): The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology* 168: 1291-1301

HOOD, E.E., GELVIN, S.B., MELCHERS, L.S., HOEKEMA, A. (1993): New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2: 208-218

HORSCH, R.B., FRALEY, R.T., ROGERS, S.G., SANDERS, P.R., LLOYD, A. (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231

- HRASKA, M., RAKOUSKÝ, S., ČURN, V. (2007): Tracking of the CaMV-35S promoter performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* DOI 10.1007/s11240-007-9312-6 online-first
- HU, W. UND CHENG, C.L. (1995): Expression of *Aequorea* green fluorescent protein in plant cells. *FEBS Letters* 369: 331-334
- HUTCHINSON, M.J., MURCH, S.J., SAXENA, P.K. (1996): Morphoregulatory role of thidiazuron: Evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey). *Journal of Plant Physiology* 149: 573-579
- JEFFERSON, R.A. (1987): Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Reports* 5: 387-405
- JIA, S.-R., YANG, M.-Z., OTT, R., CHUA N.-H. (1989): High frequency transformation of *Kalanchoe laciniata*. *Plant Cell Reports* 8: 336-340
- JORDAN, M.C. (2000): Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Reports* 19: 1069-1075
- KAEPLER, H.F., MENON, G.K., SKADSEN, R.W., NUUTILA, A.M., CARLSON, A.R. (2000): Transgenic oat plants via visual selection of cells expressing green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 19: 661-666
- KAMATÉ, K., RODRIGUEZ-LLORENTE, I.D., SCHOLTE, M., DURAND, P., RATET, P., KONOROSI, A., TRINH, T.H. (2000): Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports* 19: 647-653
- KANYAND, M., DESSAI, A.P., PRAKASH, C.S. (1994): Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants in vitro. *Plant Cell Reports* 14: 1-5

KEMPKEN, F. UND KEMPKEN, R. (2004): Gentechnik bei Pflanzen. 2. Auflage, Springer Verlag Berlin

KOHLI, A., GAHAKWA, D., VAIN, P., LAURIE, D.A., CHRISTOU, P. (1999): Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* 208: 88-97

KOMBRINK, E. UND SOMSSICH, I.E. (1995): Defense responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research* 21: 1-34

KONCZ, C. UND SCHELL, J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396

KONDO, T., HASEGAWA, H., SUZUKI, M. (2000): Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Reports* 19: 989-993

LANDGARD (2005): Geschäftsbericht 2005.

<http://www.landgard.de/geschaeftsberichte.html> 06.02.2008

LECHTENBERG, B., SCHUBERT, D., FORSBACH, A., GILS, M., SCHMIDT, R. (2003): Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. *Plant Journal* 34: 507-517

LEE, B.-K., YU, S.-H., KIM, Y.-H., AHN, B.-O., HUR, H.-S., LEE, S.-C., ZHANG, Z., LEE, J.-Y. (2005): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Perilla* (*Perilla frutescens*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 51-58

LEFFEL, S.M., MABON, S.A., STEWART, C.N. JR., (1997): Applications of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques* 23: 912-918

LEROUX, B., YANOFSKY, M.F., WINANS, S.C., WARD, J.E., ZIEGLER, S.F., NESTER, E.W. (1987): Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. EMBO Journal 6: 846-849

LINDBO, J.A. UND DOUGHERTY, W.G. (1992): Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. Virology 189: 725-733

LOAKE, G.J., ASHBY, A.M., SHAW, C.H. (1988): Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system. The Journal of General Microbiology 134: 1427-1432

MARSOLAIS, A.A., WILSON, D.P.M., TSUJITA, M.J., SENARATNA, T. (1991): Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium x hortorum*) and regal (*Pelargonium x domesticum*) geranium. Canadian Journal of Botany 69: 1188-1193

MATHIS, N.L. UND HINCHEE, M.A.W. (1994): *Agrobacterium* inoculation techniques for plant tissue. In GELVIN, S.B. UND SCHILPEROORT, R.A (eds.): Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Band 6: 1-9

MATZKE, A.J., NEUHUBER, F., PARK, Y.D., AMBROS, P.F., MATZKE, M.A. (1994): Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. Molecular and General Genetics 244: 219-229

MAXIMOVA, S.N., DANDEKAR, A.M., GUILTINAN, M.J. (1998): Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. Plant Molecular Biology 37: 549-559

MC BRIDE, K.E. UND SUMMERFELT, K.R. (1990): Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Plant Molecular Biology 14: 269-276

- MELANDER, M., KAMNERT, I., HAPPSTADIUS, I., LILJEROTH, E., BRYNGELSSON, T. (2006): Stability of transgene integration and expression in subsequent generations of doubled haploid oilseed rape transformed with chitinase and beta-1,3-glucanase genes in a double-gene construct. *Plant Cell Reports* 25: 942-952
- MEYER, P., WALGENBACH, E., BUSSMANN, K., HOMBRECHER, G., SAEDLER, H. (1985): Synchronized tobacco protoplasts are efficiently transformed by DNA. *Molecular and General Genetics* 201: 513
- MICHALCZUK, B. UND WAWRZYNCZAK, D. (2004): Effect of medium composition and date of explant drawing on effectiveness of *Agrobacterium*-mediated transformation in the petunia (*Petunia hybrida pendula*). *Journal of Fruit and Ornamental Research* 12: 5-16
- MIKI, B. UND MCHUGH, S. (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* 107: 193-232
- MOLINIER, J., HIMBER, C., HAHNE, G. (2000): Use of green fluorescent protein for detection of transformed shoots and homozygous offspring. *Plant Cell Reports* 19: 219-223
- MOORE, L.W., CHILTON, W.S., CANFIELD, M.L. (1997): Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 201-207
- MORISE, J.G., SHIMOMURA, O., JOHNSON, F.H., WINANT, J. (1974): Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13: 2656-2662
- MURASHIGE, T. UND SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479
- MURRAY, F., BRETTELL, R., MATTHEWES, P., BISHOP, D., JACOBSEN, J. (2004): Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Reports* 22: 397-402

- MURTHY, B.N.S., SINGH, R.P., SAXENA, P.K. (1996): Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv. Ringo Rose) cotyledonary cultures. *Plant Cell Reports* 15: 423-426
- NIEDZ, R.P., SUSSMAN, M.R., SATTERLEE, J.S. (1995) Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Reports* 14: 403-406
- NIKOLOVA, R.V., LALL, N., BOSHA, A.J.N. (1996): An assessment of the conditions for the rapid propagation of *Impatiens flanaganii* in vivo and in vitro. *Acta Horticulturae* 440: 633-638
- NIU, X., LI, X., VERONESE, P., BRESSAN, R.A., WELLER, S.C., HASEGAWA, P.W. (2000): Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of peppermint. *Plant Cell Reports* 19: 304-310
- NIWA, Y., HIRANO, T., YOSHIMOTO, K., SHIMIZU, M., KOBAYASHI, H. (1999): Non-invasive quantitative detection and application of non-toxic, s65t-type green fluorescent protein in living plants. *The Plant Journal* 18:455-463
- OLD, R.W. UND PRIMROSE, S.B. (1992): *Gentechnologie: eine Einführung*. Thieme Verlag Stuttgart
- PANG, S., DEBOER, D.L., WAN, Y., YE, G., LAYTON, J.G., NEHER, M.K., ARMSTRONG, C.L., FRY, J.E., HINCHEE, M.A.W., FROMM, M.E. (1996): An improved green-fluorescence protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiology* 112: 893-900
- PARK, Y.-D., PAPP, I., MOSCONE, E.A., IGLESIAS, V.A., VAUCHERET, H., MATZKE, A.J.M., MATZKE, M.A. (1996): Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant Journal* 9: 183-194

- PLAUTZ, J.D., DAY, R.N., DAILEY, G.M., WELSH, S.B., HALL, J.C., HALPAIN, S., KAY, S.A. (1996): Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene* 173: 83-87
- PONAPPA, T., BRZOZOWSKI, A.E., FINER, J.J. (1999): Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 19: 6-12
- POREBSKI, S., BAILEY, L.G., BAUM, B.R. (1997): Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 8-15
- PRASHER, D.C., ECKENRODE, V.K., WARD, W.W., PRENDERGAST, F.G., CORMIER, M.J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233
- REICHEL, C., MATHUR, J., ECKES, P., LANGENKEMPER, K., KONCZ, C., SCHELL, J., REISS, B., MAAS, C. (1996): Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93: 5888-5893
- REUTHER G. (1983): Propagation of disease-free *Pelargonium* cultivars by tissue culture. *Acta Horticulturae* 131: 311-319
- RIBAS, A.F., KOBAYASHI, A.K., PROTASIO PEREIRA, L.F., VIEIRA, L.G.E. (2006): Production of herbicide-resistance coffee plants (*Coffea canephora* P.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 11-19
- ROBICHON, M.D., RENOU, J.P., JALOUZOT, R. (1995): Genetic transformation of *Pelargonium x hortorum*. *Plant Cell Reports* 25: 63-67

ROSELLINI, D., CAPOMACCIO, S., FERRADINI, N., SARDARO, M.L.S., NICOLIA, A., VERONESI, F. (2007): Non-antibiotic, efficient selection for alfalfa genetic engineering. *Plant Cell Reports* 26: 1035-1044

ROUWENDAL, G.J.A., MENDES, O., WOLBERT, E.J.H., DE BOER, A.D. (1997): Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. *Plant Molecular Biology* 33: 989-999

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press

SANDERS, P.R., WINTERS, J.A., BARNASON, A.R., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. (1987): Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research* 15: 1543-1558

SCHUBERT, D., LECHTENBERG, B., FORSBACH, A., GILS, A., BAHADUR, S., SCHMIDT, R. (2004): Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* 16: 2561-2572

SKVIRSKY, R.C., HANSON, M.R., AUSUBEL, F.M. (1984): Intraspecific genetic variation in cytokinin-controlled shoot morphogenesis from tissue explants of *Petunia hybrida*. *Plant Science Letters* 35: 237-246

SMALLA, K., BORIN, S., HEUER, H., GEBHARD, H., VAN ELSAS, J.D., NIELSEN, K. (2000): Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria. Are there new data to fuel the debate? *Proceedings of the 6th International Symposium: The Biosafety of genetically modified organisms*: 146-154

SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517

- SRISKANDARAJAH, S., FRELLO, S., JORGENSEN, K., SEREK, M. (2004): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Campanula carpatica*: factors affecting transformation and regeneration of transgenic shoots. *Plant Cell Reports* 23: 59-63
- SRIVATATAKUL, M., PARK, S.H., SALAS, M.G., SMITH, R.H. (2001): Transformation of parameters enhancing T-DNA expression in kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Journal of Plant Physiology* 158: 255-260
- STACHEL, S.E., MESSENS, E., VAN MONTAGU, M., ZAMBRYSKI, P. (1985): Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629
- STAM, M., DE BRUIN, R., KENTER, S., VAN DER HOORN, R.A.L., VAN BLOKLAND, R., MOL, J.N.M., KOOTER, J.M. (1997): Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant Journal* 12: 63-82
- STEPHENS, L.C., KRELL, S.L., WEIGLE, J.L. (1985): In vitro propagation of java, new guinea, and java x new guinea *Impatiens*. *HortScience* 20: 362-363
- STEWART, C.N. JR. (1996): Monitoring transgenic plants using in vivo markers. *Nature Biotechnology* 14: 682
- STEWART, C.N. JR. (2001): The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Reports* 20: 376-382
- STOEBER, F. (1961): Etudes des proprietis et de la biosynthese de la glucuronidase et de la glucuronide-permease chez *Escherichia coli*. These de Docteur de Sciences, University of Paris, France
- SUNILKUMAR, G., MOHR, L.A., LOPATA-FINCH, E., EMANI, C., KEERTI, S. (2002): Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Molecular Biology* 50: 463-474

SUZUKI, S. UND NAKANO, M. (2002): *Agrobacterium*-mediated production of transgenic plants of *Muscari armeniacum* Leichtl. Ex Bak.. Plant Cell Reports 20: 835-841

SZANKOWSKI, I., BRIVIBA, K., FLESCHHUT, J., SCHÖNHERR, J., JACOBSEN, H.-J., KIESECKER, H. (2003): Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). Plant Cell reports 22: 141-149

TAMURA, M., TOGAMI, J., ISHIGURO, K., NAKAMURA, N., KATSUMOTO, Y., SUZUKI, K., KUSUMI, T., TANAKA, Y. (2003): Regeneration of transformed verbena (*Verbena x hybrida*) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 21: 459-466

TANIGUCHI, T., KURITA, M., OHMIYA, Y., KONDO, T. (2005): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic tissue and transgenic plant regeneration in *Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.. Plant Cell Reports 23: 796-802

THOMPSON, C.J., MOVVA, N.R., TIZARD, R., CRAMERI, R., DAVIES, J.E., LAUWEREYS, M., BOTTERMAN, J. (1987): Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO Journal 6: 2519-2523

TIAN, L., LEVEE, V., MENTAG, R., CHAREST, P.J., SEGUIN, A. (1999): Green fluorescent protein as a tool for monitoring transgene expression in forest tree species. Tree Physiology 19: 541-546

TJOKROKUSUMO, D., HEINRICH, T., WYLIE, S., POTTER, R., MC COMB, J. (2000): Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. Plant Cell Reports 19: 792-797

TRIFONOVA, A., MADSEN, S., OLESEN, A. (2001): *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of *in vitro* culture conditions. Plant Science 161: 871-880

- UCHNEAT, M.S. (2006): Impatiens. In ANDERSON, N.O. (ed.): Flower Breeding and Genetics, Springer Verlag: 277-299
- VAIN, P., WORLAND, B., KOHLI, A., SNAPE, J.W., CHRISTOU, P. (1998): The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. Theoretical and Applied Genetics 96: 164-169
- VAN DER GEEST, A.H.M. UND PETOLINO, J.F. (1998): Expression of modified green fluorescent protein gene in transgenic maize plants and progeny. Plant Cell Reports 17: 760-764
- VAN DER MEER, I.M. (1999): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Petunia* leaf disks. Methods in Molecular Biology, Volume 111: 327-334, Plant Cell Culture Protocols, by: R.D. HALL, Humana Press Inc., Totowa, New York
- VELUTHAMBI, K., KRISHAN, M., GOULD, J.H., SMITH, R.H., GELVIN, S.B. (1989): Opines stimulate the induction of the *vir* genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Journal of Bacteriology 171: 3969-3703
- VOINNET, O. UND BAULCOMBE, D.C. (1997): Systematic signalling in gene silencing. Nature 389: 553
- WANG, Y. UND KUMAR, P.P. (2006): Characterization of two ethylene receptors *PhERS1* and *PhETR2* from *Petunia*: *PhETR2* regulates timing of anther dehiscence. Journal of Experimental Botany 6: 1-12
- WATERHOUSE, P.M., GRAHAM, M.W., WANG, M.-B. (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proceedings of the National Academy of Science USA 95: 13959-13964
- WATERHOUSE, P.M., WANG, M.-B., LOUGH, T. (2001): Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 411: 834-842

- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535
- WILLIAMSON, J.D., HIRSCH-WYNCOTT, M.E., LARKINS, B.A., GELVIN, S.B. (1989): Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 90: 1570-1576
- WILSON, D.P.M., SULLIVAN, J.A., MARSOLAIS, A.A., TJUJITA, M.J., SENARATNA, T. (1996): Improvement of somatic embryogenesis in zonal *pelargonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 27-32
- WINK, M. (2004): *Molekulare Biotechnologie: Konzepte und Methoden*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG, Weinheim
- WINKELMANN, T., KAVIANI, K., SEREK, M. (2005): Development of a shoot regeneration protocol for genetic transformation in *Pelargonium zonale* and *Pelargonium peltatum* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 33-42
- WRIGHT, R., MCCLURE, B., GUILFOYLE, T. (1989): Auxin-induced expression of the soybean SAUR locus in transgenic *Petunia*. *Journal of Plant Growth Regulation* 8: 283-291
- ZAMBRYSKI, P. (1988): Basic process underlying *Agrobacterium* mediated DNA transfer to plant cells. *Annual Review of Genetics* 22: 1-30
- ZENTRALE MARKT- UND PREISBERICHTSTELLE GMBH (ZMP) UND CENTRALE MARKETING-GESELLSCHAFT DER DEUTSCHEN AGRARWIRTSCHAFT (CMA) (2007): *Imageanalyse Beet- und Balkonpflanzen*. ZMP Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH Verlag
- ZHANG, F.-L., YAKAHATA, Y., WATANABE, M., XU, J.-B. (2000): *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports* 19: 569-575

ZHANG, S., ZHU, L.-H., LI, X.-Y., AHLMAN, A., WELANDER, M. (2005): Infection by *Agrobacterium tumefaciens* increased the resistance of leaf explants to selective agents in carnation (*Dianthus caryophyllus* L. and *D. chinensis*). *Plant Science* 168: 137-144

ZHOU, X., CHANDRASEKHARAN, M.B., HALL, T.C. (2004): High rooting and functional analysis of GUS and GFP expression in transgenic *Medicago truncatula* A17. *New Phytologist* 162: 813-822

ZHOU, X., CARRANCO, R., VITHA, S., HALL, T.C. (2005): The dark side of green fluorescent protein. *New Phytologist* 168: 313-322

ZHU, Y.J., AGBAYANI, R., MOORE, P.H. (2004): Green fluorescent protein as a visual marker for papaya (*Carica papaya* L.) transformation. *Plant Cell Reports* 22: 660-667

ZIV, M., GANDELMAN, M., GERA, A. (2005): Expression of viral resistance in transformed *petunia* plants regenerated *in vitro*. *Acta Horticulturae* 683: 243-247

6. Anhang

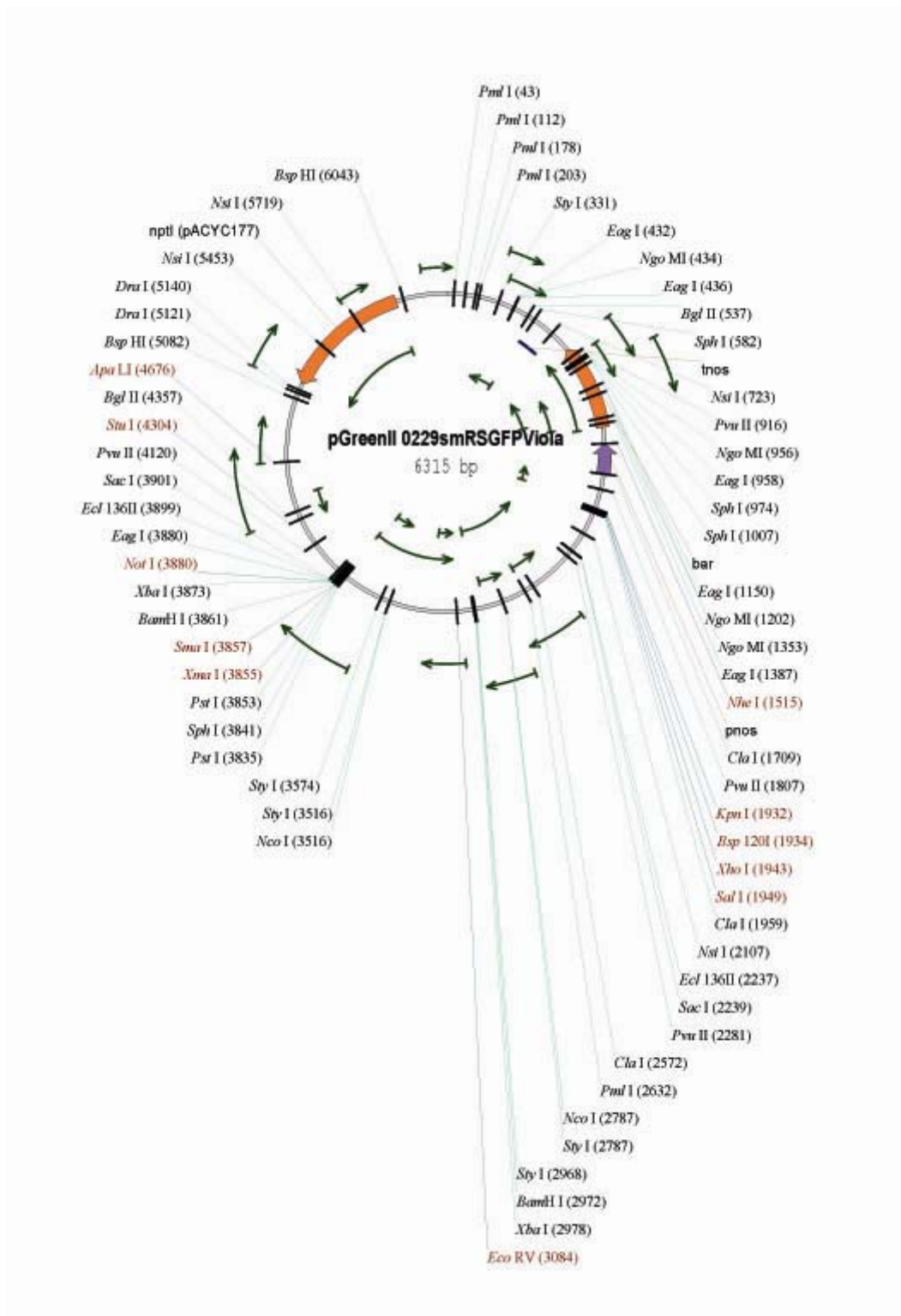


Abbildung A1: Plasmidkarte des binären Vektors pGreenII0229smRS-GFP

LB/RB: linke/rechte Bordersequenz, *lacZ*: kodiert für das Enzym β -Galactosidase, *nptI*: Kanamycinresistenz, übrige Abkürzungen markieren Restriktionsschnittstellen und deren Schnittstelle (z. B. *BglII* (537)) sowie grüne Pfeile open reading frames (ORF)

Statistische Auswertung: Phosphinothricin-Selektion bei Petunien (3.3.1.1)

Obere Konfidenzintervall-Grenzen für die Odds-Ratio (Signifikanter Unterschied wenn $uCI < 1$):

Genotyp: Famous Cerise Pearl

	OR	uCI	
oddsDosis0.5/oddsDosis0	0.24	0.600	signifikant
oddsDosis1/oddsDosis0	0.00	0.011	signifikant
oddsDosis2/oddsDosis0	0.00	0.011	signifikant
oddsDosis3/oddsDosis0	0.00	0.011	signifikant

Genotyp: Famous Electric Purple

	OR	uCI	
oddsDosis0.5/oddsDosis0	0	1.281	nicht signifikant
oddsDosis1/oddsDosis0	0	0.022	signifikant
oddsDosis2/oddsDosis0	0	0.000	signifikant
oddsDosis3/oddsDosis0	0	0.000	signifikant

Genotyp: Famous Lilac Dark Vein

	OR	uCI	
oddsDosis0.5/oddsDosis0	0.069	0.299	signifikant
oddsDosis1/oddsDosis0	0.003	0.016	signifikant
oddsDosis2/oddsDosis0	0.000	0.002	signifikant
oddsDosis3/oddsDosis0	0.000	0.002	signifikant

Genotyp: Famous Violet Dark Eye

	OR	uCI	
oddsDosis0.5/oddsDosis0	0.101	0.255	signifikant
oddsDosis1/oddsDosis0	0.000	0.016	signifikant
oddsDosis2/oddsDosis0	0.000	0.016	signifikant
oddsDosis3/oddsDosis0	0.000	0.016	signifikant

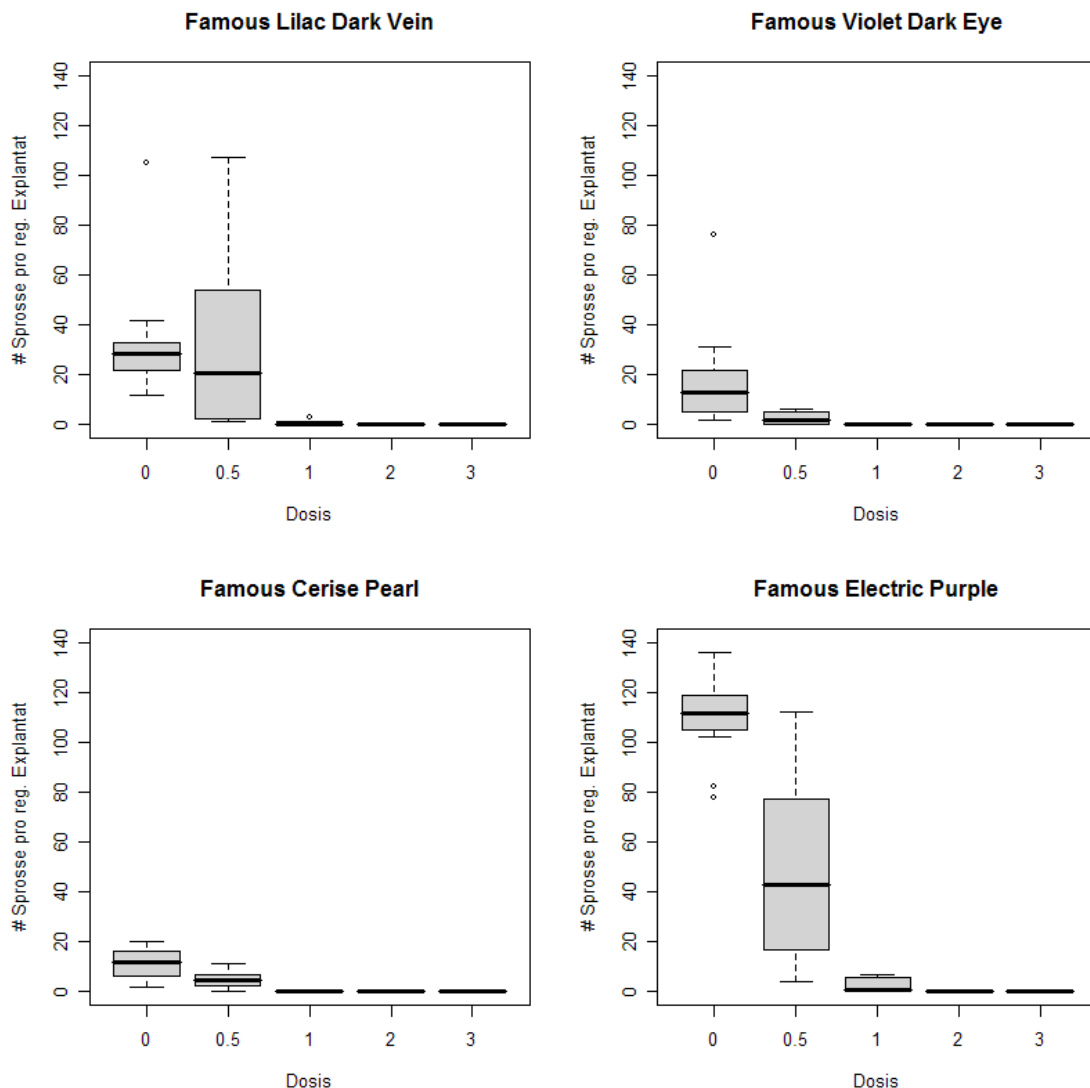


Abbildung A2: Wirkung von Phosphinothricin (PPT) auf die Sprossregeneration nach drei Wochen bei vier *Petunia* Genotypen

Untere Konfidenzintervall-Grenzen für die Ratio der Erwartungswerte DosisX/Dosis0 (Signifikanter Unterschied wenn $uCI < 1$, oder z. B. mindestens 80% weniger Sprosswachstum als in der Kontrolle wenn $uCI < 0.2$):

Genotyp: Famous Lilac Dark Vein

	Ratio	uCI	
Dosis0.5/0	0.950	1.639	nicht signifikant
Dosis1/0	0.015	0.124	signifikant
Dosis2/0	0.000	0.075	signifikant
Dosis3/0	0.000	0.075	signifikant

Genotyp: Famous Violet Dark Eye

	Ratio	uCI	
Dosis0.5/0	0.138	0.334	signifikant
Dosis1/0	0.000	0.061	signifikant
Dosis2/0	0.000	0.061	signifikant
Dosis3/0	0.000	0.061	signifikant

Genotyp: Famous Cerise Pearl

	Ratio	uCl	
Dosis0.5/0	0.447	0.632	signifikant
Dosis1/0	0.000	0.020	signifikant
Dosis2/0	0.000	0.020	signifikant
Dosis3/0	0.000	0.020	signifikant

Genotyp: Famous Electric Purple

	Ratio	uCl	
Dosis0.5/0	0.443	0.592	signifikant
Dosis1/0	0.022	0.056	signifikant
Dosis2/0	0.000	0.013	signifikant
Dosis3/0	0.000	0.013	signifikant

Statistische Auswertung: Kanamycin-Selektion bei Petunien (3.3.1.2)

Obere Konfidenzintervall-Grenzen für die Odds-Ratio (Signifikanter Unterschied wenn uCI < 1):

Genotyp: Famous Cerise Pearl

	OR	uCl	
oddsDosis50/oddsDosis0	0.488	1.143	nicht signifikant
oddsDosis100/oddsDosis0	0.000	0.009	signifikant
oddsDosis300/oddsDosis0	0.000	0.009	signifikant
oddsDosis500/oddsDosis0	0.000	0.009	signifikant

Genotyp: Famous Electric Purple

	OR	uCl	
oddsDosis50/oddsDosis0	0.219	0.593	signifikant
oddsDosis100/oddsDosis0	0.009	0.030	signifikant
oddsDosis300/oddsDosis0	0.000	0.004	signifikant
oddsDosis500/oddsDosis0	0.000	0.004	signifikant

Genotyp: Famous Lilac Dark Vein

	OR	uCl	
oddsDosis50/oddsDosis0	0.040	0.251	signifikant
oddsDosis100/oddsDosis0	0.003	0.020	signifikant
oddsDosis300/oddsDosis0	0.000	0.001	signifikant
oddsDosis500/oddsDosis0	0.000	0.001	signifikant

Genotyp: Famous Violet Dark Eye

	OR	uCl	
oddsDosis50/oddsDosis0	0.194	0.534	signifikant
oddsDosis100/oddsDosis0	0.034	0.100	signifikant
oddsDosis300/oddsDosis0	0.000	0.007	signifikant
oddsDosis500/oddsDosis0	0.000	0.007	signifikant

Statistische Auswertung: Einfluss des *A. tumefaciens*-Stammes auf die Selektionswirkung von Phosphinothricin bei Petunien (3.2.2)

Versuch 1: Effekt von Phosphinothricin und verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen während Übernachtskultur auf die Sprossregeneration

Untere Konfidenzintervall-Grenzen für die Odds-Ratio (Signifikanter Unterschied wenn ICI > 1):

	OR	lCI	
oddsK2/oddsK1	0	0	nicht signifikant
oddsV1/oddsK1	0.529	0.096	nicht signifikant
oddsV2/oddsK1	0.529	0.096	nicht signifikant
oddsV3/oddsK1	Inf	1.226	signifikant
oddsV4/oddsK1	Inf	1.226	signifikant

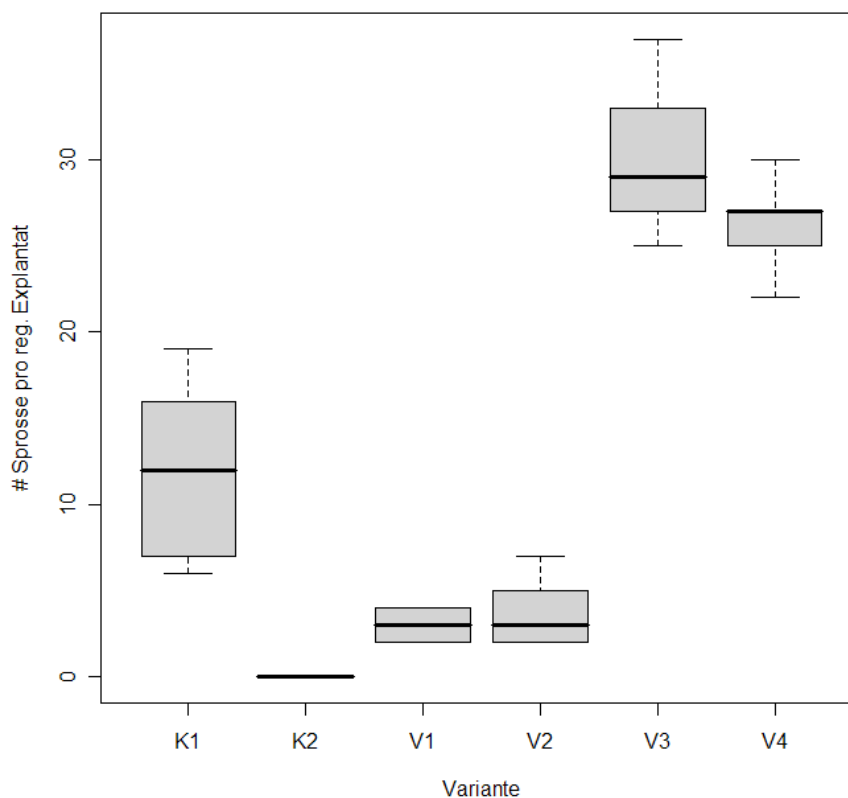


Abbildung A3: Effekt von Phosphinothricin (3 mg/L) und verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen nach Übernachtskultur auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierenden Explantat von *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' nach drei Wochen (Versuch 1)

Untere Konfidenzintervall-Grenzen für die Ratio der Erwartungswerte
Behandlung/Kontrolle (Signifikanter Unterschied wenn ICI > 1):

	Ratio	ICI	
K2/K1	0.000	0	nicht signifikant
V1/K1	0.250	0.121	nicht signifikant
V2/K1	0.317	0.165	nicht signifikant
V3/K1	2.517	1.779	signifikant
V4/K1	2.183	1.530	signifikant

Versuch 3: Effekt von unterschiedlichem *A. tumefaciens*-Stämmen allein auf die Sprossregeneration

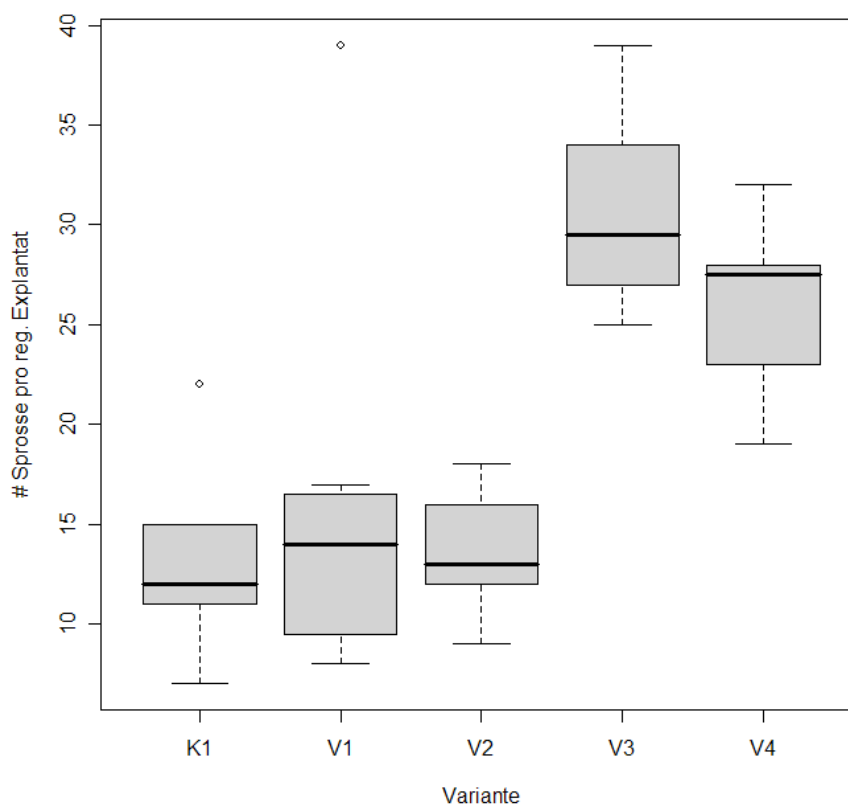


Abbildung A4: Effekt von verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen ohne Phosphinothricin-Selektion auf die mittlere Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat von *Petunia* Cultivars 'Famous Electric Purple' nach drei Wochen (Versuch 3)

Untere Konfidenzintervall-Grenzen für die Ratio der Erwartungswerte
Behandlung/Kontrolle (Signifikanter Unterschied wenn ICI > 1):

	Ratio	ICI	
V1/K1	1.185	0.693	nicht signifikant
V2/K1	1.020	0.594	nicht signifikant
V3/K1	2.261	1.417	signifikant
V4/K1	1.918	1.191	signifikant

Statistische Auswertung: Phosphinothricin-Selektion bei *Pelargonium* (3.4.1.1)

Obere Konfidenzintervall-Grenzen für die Odds-Ratio (Signifikanter Unterschied, wenn $uCI < 1$):

Genotyp: Katinka

	OR	uCl	
oddsDosis0.5/oddsDosis0	0.014	0.047	signifikant
oddsDosis1/oddsDosis0	0.000	0.004	signifikant

Genotyp: Royal Blue

	OR	uCl	
oddsDosis0.5/oddsDosis0	0.012	0.046	signifikant
oddsDosis1/oddsDosis0	0.000	0.002	signifikant

Genotyp: Sailing

	OR	uCl	
oddsDosis0.5/oddsDosis0	0.028	0.104	signifikant
oddsDosis1/oddsDosis0	0.000	0.028	signifikant

