

**Genetische Transformation von *Oncidium* und *Odontoglossum*-  
Hybriden mit dem Ziel der Verbesserung der Haltbarkeit**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Gartenbauwissenschaften  
(Dr. rer. hort.)  
genehmigte Dissertation

von

**M.Sc. Barbara Raffeiner**

geboren am 13.09.1980 in Bozen (Italien)

2008

## Kurzfassung der Dissertation

Die beiden Orchideengattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* weisen im Vergleich zur Gattung *Phalaenopsis* eine deutlich geringere Haltbarkeit auf und sind daher auch kommerziell weniger attraktiv. Die geringe Haltbarkeit der Blüten ist unter anderem auf das Hormon Ethylen zurückzuführen, das eine wichtige Rolle bei der Seneszenz der Pflanzen spielt. Die Sensitivität von *Oncidium* und *Odontoglossum* gegenüber Ethylen wurde untersucht und sowohl die Blütenrispen als auch die Topfpflanzen können als sensitiv eingestuft werden. Die Knospen und Blüten der mit Ethylen behandelten Pflanzen fielen vorzeitig ab, die Blütenstängel und die Blätter vergilbten.

Eine Möglichkeit zur langfristigen Verbesserung der Haltbarkeit von Blüten stellt die genetische Transformation von *Oncidium* and *Odontoglossum* mit dem mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors dar. Voraussetzung dafür war zunächst die Etablierung eines effizienten Regenerationssystems. Es konnte in dieser Arbeit für zwei Genotypen von *Oncidium* und sechs Genotypen von *Odontoglossum* die Regeneration von „Protocorm like Bodies“ (PLBs) über somatische Embryogenese gezeigt werden.

Sowohl die Blattspitzen als auch die PLBs wurden als Ausgangsmaterial für die genetische Transformation mittels *A. tumefaciens* herangezogen. Die Blattspitzen erwiesen sich als nicht geeignet, da keine transformierten Sprosse regeneriert werden konnten. Der Ansatz der Transformation von PLBs war vielversprechender. In Transformationsversuchen mit PLBs wurden Transformationsraten von bis zu 1,1 % mit dem *etr1-1*-Gen und bis zu 2,7 % mit dem *gus*-Gen erreicht. Insgesamt wurden aus den zahlreichen Transformationsversuchen 93 GUS-positive transgene Linien und drei transgene Linien mit erfolgreich integriertem *etr1-1*-Gen nachgewiesen. Der Southern Blot konnte das Ergebnis aus der PCR-Analyse bestätigen.

In dieser Arbeit konnte erfolgreich sowohl ein effizientes und zuverlässiges Regenerationssystem als auch ein Transformationssystem mittels *A. tumefaciens* für *Oncidium* und *Odontoglossum* etabliert werden.

Stichwörter: *Orchidaceae*, Haltbarkeit, genetische Transformation, somatische Embryogenese

## Abstract of the Thesis

*Oncidium* and *Odontoglossum* orchid species have reduced display lives and are thus commercially less important than *Phalaenopsis*. The reduced longevity of the flowers can be due to the hormone ethylene which plays a major role in the senescence process of plants. The sensitivity of *Oncidium* und *Odontoglossum* towards ethylene was investigated and cut inflorescences as well as potted plants have been proven sensitive to ethylene. The buds and flowers of ethylene treated plants dropped early, the flower stalks became yellow and chloroses were expressed regularly over the whole leaves.

One approach to prolonging display life permanently is to transform *Oncidium* and *Odontoglossum* with the ethylene receptor mutant gene *etr1-1* from *Arabidopsis* under control of a flower specific promoter; this should reduce their sensitivity to exogenous ethylene. To achieve this it will be necessary to establish an efficient regeneration protocol using somatic embryogenesis and a routine *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation procedure.

Leaf tips as well as protocorm like bodies (PLBs) were used as starting material for genetic transformation with *A. tumefaciens*. No transgenic shoots were obtained from leaf tips, while PLBs of *Oncidium* and *Odontoglossum* were successfully transformed. Transformation efficiencies up to 1.1 % were achieved with the *etr1-1* gene and up to 2.7 with the *gus* gene. From the several transformation experiments 93 GUS positive transgenic shoots could be verified and three transgenic shoots with integrated *etr1-1* gene. The Southern blot analysis could confirm the results from the PCR analysis.

In this study for *Oncidium* und *Odontoglossum* an efficient and reliable regeneration system as well as a successful *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation procedure was established.

Keywords: *Orchidaceae*, display live, flower senescence, genetic engineering, somatic embryogenesis

Tag der Promotion: 04. Dezember 2008

Referent: Prof. Dr. Margrethe Serek

Koreferent: Prof. Dr. Traud Winkelmann

Prüfer: Prof. Dr. Thomas Debener

Prüfer: Prof. Dr. Bernhard Beßler

**Aus der vorliegenden Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:**

Raffeiner, B., Serek, M., Winkelmann, T., 2009. 1-Methylcyclopropene inhibits ethylene effects in cut inflorescences and potted plants of *Oncidium* and *Odontoglossum* orchid species. *Europ. J. Hortic. Science* 74 (1), 10-15.

Raffeiner, B., Serek, M., Winkelmann, T., (in press). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Oncidium* and *Odontoglossum* orchid species with the ethylene receptor mutant gene *etr1-1*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* (DOI: 10.1007/s11240-009-9545-7)

**Beiträge zum Thema der vorliegenden Arbeit wurden von mir bei folgenden**

**Fachkongressen in Form eines Vortrages oder Posters präsentiert:**

Raffeiner, B., Serek, M., Winkelmann, T. Effect of ethylene and 1-Methylcyclopropene (1-MCP) on flower senescence of *Oncidium* and *Odontoglossum*. XXII EUCARPIA Symposium section Ornamentals, Breeding for Beauty, 11.-15. 09.2006, Sanremo, Italien

Raffeiner, B., Serek, M., Winkelmann, T. Regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Oncidium* 'Sweet Sugar'. Plant Transformation Technologies Conference, 04.-07.02.2007, Wien, Österreich

Raffeiner, B., Serek, M., Winkelmann, T. In-vitro-Regeneration und *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Gentransfer bei *Oncidium* ‚Sweet Sugar‘. Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie Arbeitskreis Gentechnik, 12.-13.07.2007, Neustadt, Deutschland

Raffeiner, B., Serek, M., Winkelmann, T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Oncidium* and *Odontoglossum* with the mutated ethylene receptor *etr1-1*. ISHS, VI International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 24.-28.08.2008, Brisbane, Australien. Für diesen Vortrag wurde der “Student Award of Excellence Paper Presentation” (Abb. 7.1) verliehen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>7</b>
2.1.1 Pflanzenmaterial .....	7
2.1.2 Bakterienstämme .....	8
2.1.3 Vektoren .....	9
2.1.4 Medien.....	12
2.1.5 Enzyme.....	14
2.1.6 Oligonukleotide .....	14
<b>2.2 Untersuchung des Einflusses von Ethylen auf die Seneszenz.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Blütenrispen .....	16
2.2.2 Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Topfpflanzen .....	17
<b>2.3 Entwicklung von In-vitro-Kulturtechniken.....</b>	<b>18</b>
2.3.1 Etablierung steriler Sprosskulturen .....	18
2.3.2 Vermehrung von In-vitro-Sprosskulturen .....	19
2.3.3 Bewurzelung und Akklimatisierung im Gewächshaus .....	20
2.3.4 Regeneration von PLBs aus Blattmaterial .....	20
2.3.5 Regeneration von Sprossen aus der Flüssigkultur.....	21
<b>2.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>-vermittelter Gentransfer .....</b>	<b>23</b>
2.4.1 Kultur, Anzucht und Aufreinigung der Agrobakterien .....	23
2.4.2 Transformation von Blattspitzen mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
2.4.3 Transformation von PLBs mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	24
2.4.4 Selektion und Regeneration transgener Pflanzen.....	27
2.4.5 Histochemischer GUS-Test.....	29
2.4.6 Auswertung von Transformationsversuchen.....	30
<b>2.5 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren .....	32
2.5.2 PCR-Methoden.....	37
2.5.3 Gelelektrophorese.....	39
2.5.4 DNA-Sequenzierung .....	40

2.5.5	Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen.....	40
2.5.6	Southern Hybridisierung .....	40
2.5.7	Klonierungen und Transformation von Vektoren .....	43
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zum Einfluss von Ethylen und 1-MCP auf die Seneszenz.....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Blütenrispen .....	47
3.1.2	Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Topfpflanzen .....	50
<b>3.2</b>	<b>Entwicklung von In-vitro-Kulturtechniken.....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Etablierung steriler Sprosskulturen .....	52
3.2.2	Vermehrung von In-vitro-Sprosskulturen .....	53
3.2.3	Bewurzelung und Akklimatisierung im Gewächshaus .....	55
3.2.4	Regeneration von PLBs über somatische Embryogenese .....	56
3.2.5	Regeneration von Sprossen aus der Flüssigkultur.....	61
<b>3.3</b>	<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i>-vermittelter Gentransfer .....</b>	<b>64</b>
3.3.1	Selektionsbedingungen.....	64
3.3.2	Transformation der Blattspitzen von <i>Oncidium</i> und <i>Odontoglossum</i> .....	68
3.3.3	Transformation der PLBs von <i>Oncidium</i> und <i>Odontoglossum</i> auf Festmedium .....	70
3.3.4	Vergleich der Transformation auf Fest- und in Flüssigmedium .....	80
3.3.5	Transformation der PLBs von <i>Oncidium</i> und <i>Odontoglossum</i> in Flüssigkultur.....	85
<b>3.4</b>	<b>Vergleich verschiedener DNA- und RNA-Isolierungsmethoden .....</b>	<b>88</b>
<b>3.5</b>	<b>Klonierung des Promotors PeMADS5 und des <i>etr1-1</i>-Gens in pCambia .....</b>	<b>90</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>95</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen zum Einfluss von Ethylen auf die Seneszenz .....</b>	<b>96</b>
<b>4.2</b>	<b>Entwicklung von In-vitro-Kulturtechniken.....</b>	<b>99</b>
4.2.1	Regeneration von Protocorm Like Bodies (PLBs).....	100
4.2.2	Ausgangsmaterial für die Regeneration von PLBs .....	101
4.2.3	Medienzusammensetzungen für die Regeneration und Vermehrung .....	102
4.2.4	Bewurzelung von Sprosskulturen.....	106
<b>4.3</b>	<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i>-vermittelter Gentransfer .....</b>	<b>107</b>
4.3.1	Transformationsmethode.....	107
4.3.2	Die Vorkultur .....	109
4.3.3	Die Inokulation und Kokultur .....	109

4.3.4	Der Agrobakteriumstamm.....	111
4.3.5	Selektion.....	112
4.3.6	Transformation mit Hilfe der Ultraschallbehandlung .....	115
4.3.7	Transformation mit Hilfe der Vakuuminfiltration .....	116
4.3.8	Molekulare Analysen .....	117
<b>4.4</b>	<b>Vergleich der DNA- und RNA-Isolierungsverfahren .....</b>	<b>119</b>
<b>4.5</b>	<b>Klonierung von pCambiaPeMADS5etr1-1 .....</b>	<b>120</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>122</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>135</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Anz.	Anzahl
AS	Aminosäure
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbammat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
Expl.	Explantat
Fa.	Firma
FM	Frischgewicht
g	Gramm
GA <sub>3</sub>	Giberellinsäure A3
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunden
IAA	Indol-3-Essigsäure
KK	Kokultur
l	Liter
LB	Linke Bordersequenz
m	Meter
M	Mol
mA	Milliamper
1-MCP	1-Methylcyclopropen
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
ms	Millisekunde

MS	Murashige & Skoog
$\mu\text{M}$	Mikromol
$\mu\text{l}$	Mikroliter
NAA	1-Naphtylessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase-Ketten Reaktion
PLB	Protocorm like body
PVP	Polyvinylpyrrolidon-10
RB	Rechte Bordersequenz
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
T-DNA	Transfer-DNA
TDZ	Thidiazuron
Trafo	Transformationsversuch
U	Einheit (Unit)
ÜNK	Übernachtskultur
V	Volt
<i>vir</i> -Region	Virulenz-Region
VK	Vorkultur
v/v	Volumenanteil pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor- 3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure

## 1 Einleitung

Orchideen sind aus dem blühenden Topfpflanzen-Sortiment nicht mehr wegzudenken. Darunter haben die beiden Orchideengattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* zur Zeit deutlich geringere Bedeutung als die Gattung *Phalaenopsis*, die den absoluten Spitzenreiter darstellt (WINKELMANN ET AL., 2006). Die Orchideen hatten in den Niederlanden im Jahr 2006 einen Umsatzwert von 257 Mio. €, wobei *Phalaenopsis* mit einem Umsatz von 173,7 Mio. € die absatzstärkste Zimmerpflanze war mit einem Aufwärtstrend von 21 % im Vergleich zum Vorjahr (VAKBLAD VOOR DE BLOEMISTERIJ, 21/2007). Die Gattung *Oncidium* konnte einen Umsatz von 4,8 Mio. € mit einer Steigerung von 6,8 % zum Vorjahr aufweisen und bei den *Odontoglossum*-Hybriden wurde mit einem Plus von 124,5 % ein Umsatz von 2,8 Mio. erzielt.

Ein wesentlicher Grund für diesen Unterschied in den Verkaufszahlen der beiden Gattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* im Vergleich zu *Phalaenopsis* ist sicher die deutlich geringere Haltbarkeit der Blüten der erstgenannten. Während eine *Phalaenopsis* im Schnitt 2-4 Monate blüht, verblühen *Oncidium* und *Odontoglossum* bereits nach drei bis vier Wochen (RAFFEINER V., mündliche Mitteilung).

Die geringe Haltbarkeit der Blüten ist im Allgemeinen auf verschiedene Faktoren wie hohe Temperaturen, Stress infolge des Transports oder geringe Lichtzufuhr zurückzuführen. In diesem Zusammenhang stellten auch die Anwesenheit anderer Pflanzen, die Ethylen produzieren, oder andere Quellen für exogenes Ethylen während des Transports und der Lagerung eine mögliche Beeinträchtigung der Qualität der Orchideen dar. Ethylen ist ein gasförmiges Hormon, das bei einer Vielzahl an Stoffwechselprozessen in der Pflanze eine wichtige Rolle spielt und unter anderem für die Seneszenz und damit für das Abfallen von Knospen und Blüten verantwortlich ist. Die Sensitivität gegenüber Ethylen bei verschiedenen Orchideenarten konnte bereits bei Schnittblumen von *Cymbidium* und *Phalaenopsis* nachgewiesen werden (PORAT ET AL., 1994, PHILOSOPH-HADAS ET AL., 2005). Auch der Einfluss von endogenem Ethylen auf die Seneszenz der Blüten infolge einer Bestäubung wurde bei den Orchideenarten *Phalaenopsis* und *Dendrobium* ausführlich dokumentiert (PORAT ET AL., 1994, ZHANG ET AL., 1996, HUANG ET AL., 1999, KETSA UND RUGKONG, 1999, 2000). Aus den bisherigen Untersuchungen kann man darauf schließen, dass sich der Einfluss von Ethylen auch auf *Oncidium* und *Odontoglossum* durch eine verminderte Pflanzenqualität äußern kann. Die Qualität der Pflanze wird vor allem durch eine schnellere Welke und das Abfallen von Knospen und Blüten vermindert (WOLTERING UND VAN

DOORN, 1988, HUANG, 1998, KETSA UND RUGKONG, 1999, 2000, CHANG ET AL., 2003, LIN ET AL., 2003).

Da das Problem des negativen Einflusses von exogenem Ethylen auf die Haltbarkeit verschiedener Zierpflanzen bekannt ist, wurden in der Vergangenheit einige Bestrebungen unternommen, um einer frühen Seneszenz entgegenzuwirken (HEYES UND JOHNSTON, 1998, HUANG ET AL., 2003, LIN ET AL., 2003, PHILOSOPH-HADAS ET AL., 2005). Das Ethylenmolekül muss an einen membrangebundenen Rezeptor binden, bevor in der Zelle eine Reihe von Reaktionen in Gang gesetzt werden, die zur Seneszenz der Pflanze führen können. Durch das Behandeln der Pflanzen mit chemischen Substanzen, die an den Ethylenrezeptor binden und ihn damit blockieren, können die nachgeschalteten Reaktionen nicht starten und eine durch exogenes Ethylen hervorgerufene Seneszenz kann unterbunden werden. Zu diesen Inhibitoren der Ethylenrezeptoren gehören Silberthiosulfat (STS), 1-Methylcyclopropen (1-MCP) und Diazocyclopropen (DACP). Ein weiterer Wirkstoff im Zusammenhang mit der Hemmung der endogenen Ethylenbiosynthese stellt die Verwendung des Inhibitors der ACC-Synthase, Aminoxy-Essigsäure (AOA), dar. Diese genannten Wirkstoffe ermöglichen durch eine Verzögerung der Welke und das Verhindern des Abfallens von Knospen und Blüten (PORAT ET AL. 1994, KETSA UND LUANGSUWALAI, 1996, ZHANG ET AL., 1996, HUANG ET AL., 1999, KETSA UND RUGKONG, 2000) eine Verlängerung der Haltbarkeit.

1-MCP ist ein nicht toxischer Wirkstoff, der an den Ethylenrezeptor bindet und daher sehr spezifisch und in geringen Konzentrationen wirkt. Der Erfolg der Behandlung mit 1-MCP hängt von der Konzentration, der Einwirkzeit, der Temperatur bei der Behandlung und der Qualität der Pflanze ab (SISLER UND SEREK, 1997, SEREK ET AL., 2006). Die Wirkung von 1-MCP auf die Verlängerung der Haltbarkeit bei Orchideen wurde bereits bei *Phalaenopsis* (PORAT ET AL., 1994, CHANG ET AL., 2003, LIN ET AL., 2003), *Cymbidium* (HEYES UND JOHNSTON, 1998, PHILOSOPH-HADAS ET AL., 2005) und bei Schnittblumen von *Oncidium* (HUANG ET AL., 2003) getestet. Der Einfluss von Ethylen und die Wirkung von 1-MCP wurden bisher weder bei Blütenrispen noch bei Topfpflanzen von *Odontoglossum* und dessen Hybriden überprüft.

Während die Behandlung der Pflanzen mit den oben genannten Wirkstoffen bedingt durch den Abbau der chemischen Substanzen lediglich eine kurzfristige Lösung darstellt, ist mit Hilfe einer genetischen Transformation die langfristige Veränderung des Einflusses von exogenem Ethylen auf eine verfrühte Seneszenz von Blüten möglich. Für die gentechnische Transformation, die auf

der Übertragung, Integration und Expression von Fremd-DNA in Pflanzen basiert, stehen verschiedene Methoden des Gentransfers mit Hilfe der Partikelkanone, der Elektroporation oder von *Agrobacterium tumefaciens* zur Verfügung. Die heute oft bevorzugte Methode ist der Gentransfer mit Hilfe von *A. tumefaciens* wegen seiner hohen Effizienz und der gewünschten stabilen und "low copy" Integration des neuen Gens im Genom (ROY ET AL., 2000, SHOU ET AL., 2004, TRAVELLA ET AL., 2005, BHALLA ET AL., 2006). Das Bodenbakterium *A. tumefaciens* besitzt die Fähigkeit, einen Teil seiner DNA, die so genannte T-DNA, die sich auf einem tumor-induzierenden (Ti) Plasmid befindet, ins pflanzliche Genom zu integrieren und dadurch die Ausprägung eines Tumors, so genannter Wurzelhalsgallen, zu bewirken. Auf der T-DNA befinden sich zum einem Gene, die für an der Synthese von Phytohormonen beteiligte Enzyme kodieren und damit für die Ausbildung des Tumors verantwortlich sind, und zum anderen Gene für die Opine-Synthese. Opine werden von *A. tumefaciens* katabolisiert und als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt. Außerhalb der T-DNA befinden sich Gene für den Abbau der Opine, für den Transfer der T-DNA vom Bakterium in die pflanzliche Zelle und für die Integration ins pflanzliche Genom. Die T-DNA wird beidseitig von einer jeweils 25 bp langen DNA-Sequenz, den so genannten rechten und linken Bordersequenzen, begrenzt, die für das Ausschneiden aus dem Ti-Plasmid und die Integration der T-DNA ins Genom notwendig ist, da diese grundsätzlich beginnend mit der RB-Sequenz in die pflanzlichen Zellen transferiert wird (ZAMBRYSKI, 1992). Da die Herstellung dieser Vektoren aufgrund ihrer Größe relativ kompliziert und zeitaufwendig ist, wurden binäre Vektoren entwickelt (HOEKEMA ET AL., 1983, HOOD ET AL., 1986). Bei einem binären Vektor befindet sich die T-DNA mit dem Zielgen auf einem zweiten kleineren Plasmid und das Ti-Plasmid enthält nur noch die Virulenzgene. Das zweite, kleinere Plasmid trägt das Zielgen, das Ti-Plasmid hilft durch die Aktivität der *vir*-Gene bei dem Transfer der T-DNA, ohne dass die Information für die Übertragung selber mit in die Pflanze eingebaut wird. Der Vorteil der Binärvektoren liegt in der geringen Größe und einer daher relativ einfachen Handhabbarkeit. Außerdem wurde der prokaryontische Replikationsursprung inseriert, so dass der Vektor in *Agrobacterium* und *Escherichia coli* vermehrt werden kann. Des weiteren wurden aufgrund des unnötigen Energieverbrauchs die Opine-Synthese- und die Tumor-induzierenden Gene entfernt und dominant selektive Markergene eingefügt. Zwischen den Bordersequenzen befinden sich ein Selektionsgen und ein Polylinker als Klonierungsstelle für das Einfügen weiterer Gene (BRANDT, 2004, KEMPKEN UND KEMPKEN, 2004).

Die Infektion von Pflanzen mit *A. tumefaciens* infolge der chemotaktischen Anlockung und Expression der Virulenzgene erfolgt mit Hilfe von phenolischen Substanzen, die entweder auf

natürliche Weise nach einer Verwundung des Gewebes ausgeschieden oder künstlich in Form von Acetosyringon bei der Transformation zugegeben werden. Die phenolischen Substanzen werden von *A. tumefaciens* erkannt und führen zur Expression der *vir*-Gene, die die Übertragung der T-DNA in die pflanzliche Zelle einleiten.

Die Effizienz von Transformationssystemen ist oft sehr gering, weshalb es wichtig ist, die wenigen transformierten Pflanzen von der Masse der nicht transformierten frühzeitig unterscheiden zu können. Ein erfolgreicher Gentransfer kann mit Hilfe von Selektionssystemen ermittelt werden. Dabei wird zwischen negativer Selektion, die auf Antibiotika- oder Herbizidresistenzen beruht, und positiven Systemen, die auf der Expression von wachstumsfördernden Proteinen basieren, unterschieden (BRANDT, 2001, MUBMANN ET AL., 2006). Erwünschte Selektionssysteme sind dominant selektive Systeme, bei denen nur tatsächlich transgene Pflanzen regenerieren, die einfach in der Handhabung sind und den Sicherheits- und Akzeptanzüberlegungen gerecht werden (KEMPKEN UND KEMPKEN, 2004).

Eine genetische Transformation wurde bei *Oncidium* bereits beschrieben (LIAU ET AL., 2003A, 2003B, YOU ET AL., 2003, LI ET AL., 2005), während es zu *Odontoglossum* bislang keine wissenschaftlichen Arbeiten gibt. LIAU ET AL. (2003a) übertrugen mittels *A. tumefaciens* das Markergen  $\beta$ -glucuronidase (*gusA*) in *Oncidium* 'Sharry Baby'. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Übertragung des "sweet pepper ferredoxin-like protein" (*pflp*). Dabei wurde *pflp* als neuer Selektionsmarker für die Transformation mit Hilfe von *A. tumefaciens* eingesetzt, welches den Pflanzen zugleich eine erhöhte Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* verlieh (LIAU ET AL., 2003B, YOU ET AL., 2003). Neben dem *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer wurde auch der direkte Gentransfer über die Genkanone bei *Oncidium* 'Sharry Baby' zur Übertragung des *pflp*-Gens angewendet (YOU ET AL., 2003, LI ET AL., 2005).

Ausgangsmaterial für die eben aufgelisteten Untersuchungen bildeten dabei so genannte protocorm like bodies (PLBs). Die Regeneration von PLBs konnte bei *Oncidium* über somatische Embryogenese, bei dem sich aus einer somatischen Zelle ein Embryo entwickelt, aus Blattexplantaten von In-vitro-Pflanzen (CHEN ET AL., 1999, CHEN UND CHANG, 2001, 2002, 2003A, 2003B, 2004, SU ET AL., 2006) gezeigt werden. Des Weiteren konnten PLBs aus Internodienabschnitten von Gewächshauspflanzen (CHEN UND CHANG, 2000a) und über Kallusbildung von Wurzelsegmenten (CHEN UND CHANG, 2000, 2004) regeneriert werden. Bei der Gattung *Odontoglossum* wurde die Regeneration von PLBs noch nicht beschrieben.

Eine Möglichkeit zur Verlängerung der Haltbarkeit der Blüten von *Oncidium* und *Odontoglossum* ist die Übertragung des mutierten Ethylenrezeptors *etr1-1* aus *Arabidopsis* (WILKINSON ET AL., 1997, HALL ET AL., 2007) mittels *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfers. Dieser mutierte und damit veränderte Ethylenrezeptor führt zu einer geringeren Ethylensensitivität. Dabei wird die Bindung des Ethylenmoleküls an den Rezeptor reduziert und damit die Signaltransduktion von Ethylen wie auch die Ethylenbiosynthese inhibiert (BOVY ET AL., 1999). Der Ansatz der genetischen Transformation mit dem mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* wurde bereits erfolgreich bei *Petunia* (WILKINSON ET AL., 1997, CLARK ET AL., 1999, GUBRIUM ET AL., 2000, CELVENGER ET AL., 2004), Nelken (BOVY ET AL., 1999), *Campanula* (SRISKANDARAJAH ET AL., 2007) und *Kalanchoe* (SANIKHANI ET AL., 2008) umgesetzt. Neben der Beteiligung an der Seneszenz der Pflanze, spielt Ethylen auch bei einer Vielzahl an weiteren Prozessen, wie Pflanzenwachstum, Wurzelbildung oder Pathogenabwehr eine Rolle. Daher wird dem mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* nicht der üblicherweise verwendete konstitutiv exprimierte CaMV 35S Promotor, sondern der blütenspezifische Promotor *fbp1* aus *Petunia* vorgeschaltet. In transgenen Nelken konnte die Aktivität dieses Promotors in den Petalen und jungen Staubgefäßen nachgewiesen werden (BOVY ET AL., 1999).

Der Promotor ist ein Teil des Gens, über den die Aktivität des Gens reguliert wird (KEMPKEN UND KEMPKEN, 2004). Er stellt den Bindungsbereich für die Transkriptionsfaktoren dar und kontrolliert damit die Transkription. Aus diesem Grund ist die Auswahl des idealen Promotors von großer Bedeutung. Der überwiegende Teil der Blütenorgan-Identitätsgene gehört zur Familie der MADS Box-Gene, weshalb die Promotoren dieser Gene blütenspezifische Eigenschaften besitzen. Bei Orchideen gibt es bereits einige Veröffentlichungen über die für diese Arbeit interessanten MADS-Box-Gene und deren Promotoren. Die MADS-Box-Gene sind nämlich bei der Festlegung der Identität der Blütenorgane entsprechend dem ABC-Modell der Blütenentwicklung beteiligt. LU ET AL. (1993) waren die erste Arbeitsgruppe, die ein MADS-Box-Gen aus der Orchidee *Aranda deborah* isoliert hat. Seitdem wurden weitere Sequenzen von MADS-Box-Genen aus *Phalaenopsis equestris* (TSAI ET AL., 2004), *Oncidium* 'Gower Ramsey' (HSU ET AL., 2003) und *Dendrobium* 'Madame Thong-In' (YU UND GOH, 2000) veröffentlicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die MADS-Box-Gene in Orchideen teilweise nicht nur blütenspezifisch exprimiert werden, sondern auch in vegetativen Pflanzenorganen. TSAI ET AL. (2004) beschrieben in ihrer Arbeit die Expression von vier verschiedenen MADS-Box-Genen aus *Phalaenopsis equestris*. Das Gen *PeMADS5* (Accessionsnummer AY378148) gehört zu den

B-Funktionsgenen und wird den Deficiens-like Genen zugeordnet. *PeMADS5* wurde stark in den Petalen, schwächer in Sepalen, Lippe und Säule und nicht im vegetativen Gewebe exprimiert.

## **Zielsetzung**

Die beiden Orchideengattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* sind aufgrund der geringeren Haltbarkeit wirtschaftlich weniger bedeutend als die Gattung *Phalaenopsis*. Eine Möglichkeit zur langfristigen Verbesserung der Haltbarkeit von *Oncidium* und *Odontoglossum* stellt die genetische Transformation dar.

Die geringe Haltbarkeit der Blüten wird unter anderem auf das Hormon Ethylen zurückgeführt, das bei der Seneszenz der Pflanze eine große Rolle spielt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Ethylen und von dem Inhibitor des Ethylenrezeptors 1-MCP auf die Haltbarkeit von Blütenstielen sowie Topfpflanzen von *Oncidium* und *Odontoglossum* untersucht. Der Nachweis, dass Ethylen zu beschleunigter Alterung führt und 1-MCP in ethylenhaltiger Atmosphäre die Haltbarkeit verlängert, war Voraussetzung für die Anwendbarkeit des transgenen Ansatzes der vorliegenden Arbeit.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines Transformationssystems von *Oncidium* und *Odontoglossum* über einen *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer zur langfristigen Verlängerung der Haltbarkeit der Blüten. Voraussetzung dafür war zunächst die Etablierung steriler und genetisch identischer In-vitro-Sprosse von *Oncidium* und *Odontoglossum*. Davon ausgehend sollte ein zuverlässiges und effizientes Regenerationssystem von PLBs über somatische Embryogenese etabliert werden. Im Anschluss daran bildete die Entwicklung und Etablierung eines effizienten Transformationssystems für *Oncidium* und *Odontoglossum* mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer den Schwerpunkt dieser Arbeit. Dieser etablierte Gentransfer wurde schließlich für die Übertragung des mutierten Ethylenrezeptors *etr1-1* aus *Arabidopsis thaliana*, der zu einer geringeren Ethylensensitivität führt, verwendet. Da Ethylen neben der Beteiligung an der Seneszenz der Pflanze auch bei einer Vielzahl an weiteren Prozessen eine Rolle spielt, wurde *etr1-1* unter Kontrolle des blütenspezifischen Promotors *fbp1* aus *Petunia* in *Oncidium* und *Odontoglossum* übertragen werden. Zur Überprüfung des Transformationserfolgs kamen GUS-Tests, PCR-Verfahren und Southern Hybridisierung zur Anwendung.

## 2 Material und Methoden

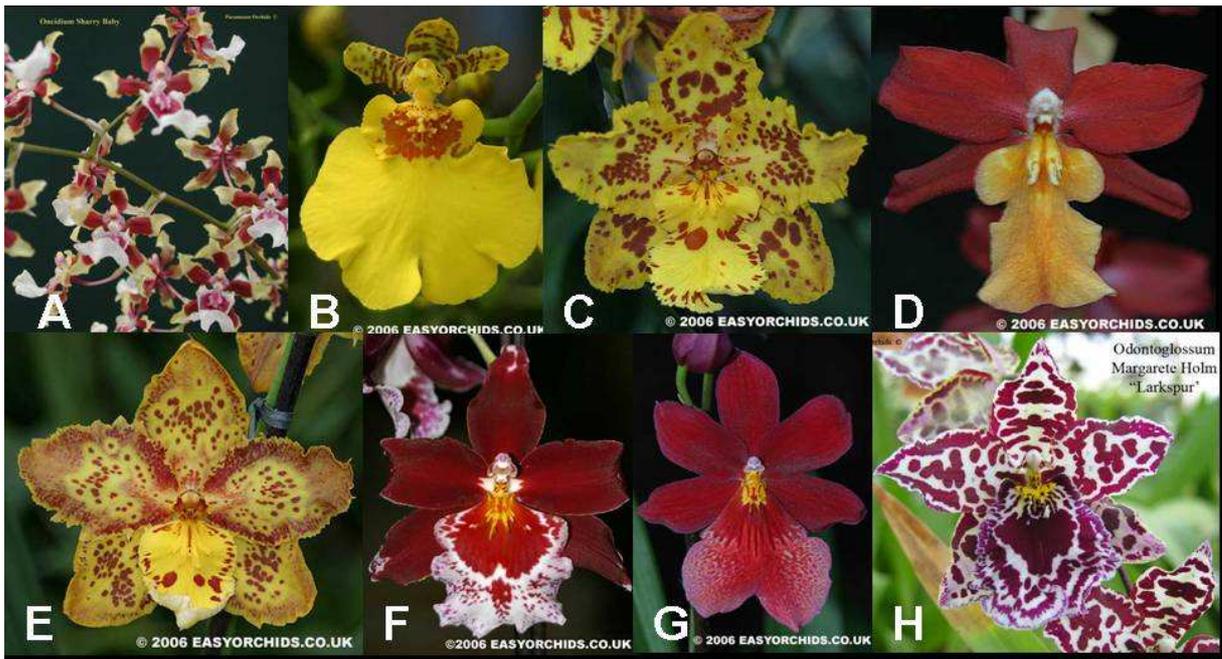
### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden Vertreter aus zwei Gattungen von Orchideen, *Oncidium* und *Odontoglossum* verwendet. Bei *Oncidium* kamen die Sorten 'Sweet Sugar' und 'Sharry Baby' zum Einsatz, während es sich bei den *Odontoglossum*-Hybriden um die Sorten 'Stirling Tiger', Phoenix March '6513', Stefan Isler 'Lava Flow', 'Hansueli Isler', Cambria 'Plush', 'Nelly Isler' und Margarete Holm 'Larkspur' handelte (Tab. 2.1, Abb. 2.1). Das Ausgangsmaterial für die In-vitro-Kultur und die Versuche zur Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Blütenrispen und Topfpflanzen wurde freundlicherweise von der Firma Valtl Raffener (Bozen, Italien) zur Verfügung gestellt.

**Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Gattungen und Gattungs-Hybriden von *Oncidium* und *Odontoglossum*.**

Bezeichnung	Sortenname	Gattung	Hybride	Kreuzung
ON01	'Sharry Baby'	<i>Oncidium</i>		
ON02	'Sweet Sugar'	<i>Oncidium</i>		
OD01	'Stirling Tiger'		<i>Wilsonara</i>	<i>Cochlioda x Odontoglossum x Oncidium</i>
OD02	Phoenix March'6513'		<i>Odontioda</i>	<i>Cochlioda x Odontoglossum</i>
OD03	Stefan Isler 'Lava Flow'		<i>Burrageara</i>	<i>Cochlioda x Miltonia x Odontoglossum x Oncidium</i>
OD04	'Hansueli Isler'		<i>Odontocidium</i>	<i>Odontoglossum x Oncidium</i>
OD05	Cambria 'Plush'		<i>Vuylstekeara</i>	<i>Cochlioda x Miltonia x Odontoglossum</i>
OD06	'Nelly Isler'		<i>Burrageara</i>	<i>Cochlioda x Miltonia x Odontoglossum x Oncidium</i>
OD07	Margarete Holm 'Larkspur'	<i>Odontoglossum</i>		



**Abb. 2.1: Blüten der verwendeten Gattungen *Oncidium* und *Odontoglossum*, sowie Gattungshybriden.** A: ON01, B: ON02, C: OD01, D: OD03, E: OD04, F: OD05, G: OD06, H: OD07 (Quelle: [www.eastorchids.co.uk](http://www.eastorchids.co.uk)).

### 2.1.2 Bakterienstämme

#### *Agrobacterium tumefaciens*

Für den *A. tumefaciens*-vermittelten Transfer des *gus*-Gens und des *etr1-1*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* mit dem *fbp*-Promotor aus *Petunia hybrida* wurden die Agrobakterienstämme EHA105 (HOOD ET AL., 1986), LBA4404 (HOEKEMA ET AL., 1983) und AGL0 (LAZO ET AL., 1991) verwendet. Diese Agrobakterienstämme unterscheiden sich bezüglich ihres Opine-Hintergrundes. EHA105 gehört zu den Nopaline-Stämmen in einem C58 chromosomalen Hintergrund, LBA4404 zu den Octopine-Stämmen in einem TiAch5 chromosomalen Hintergrund und AGL0 zu den Agropine-Stämmen.

#### *Escherichia coli*

In dieser Arbeit fand folgender *E. coli* Stamm Verwendung:

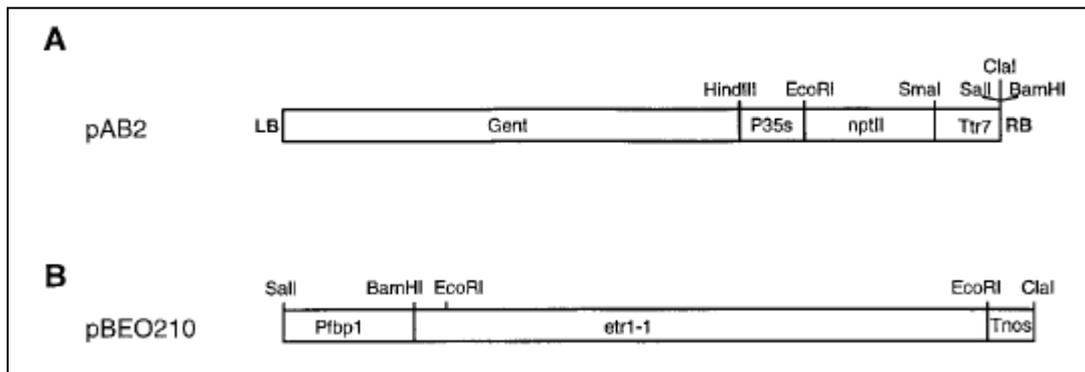
Top10F<sup>-</sup>: F<sup>-</sup> {*lacI*<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

Dieser Stamm wurde für die Vermehrung und Klonierung des Plasmides pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> (Fa. Invitrogen) und pCAMBIA2300 ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)) verwendet.

### 2.1.3 Vektoren

#### pBEO210

Das Binärplasmid pBEO210 wurde von Dr. A. G. Bovy hergestellt (BOVY ET AL., 1999) und freundlicherweise von Prof. Margrethe Serek zur Verfügung gestellt. pBEO210 enthält zwischen der linken und rechten Bordersequenz der T-DNA das *etr1-1*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle des blütenspezifischen *fbp1*-Promotors aus *Petunia* sowie das *nptII*-Gen, reguliert durch den 35S-Promotor (Abb. 2.2). Die Größe des Plasmids beträgt 10.231 bp.

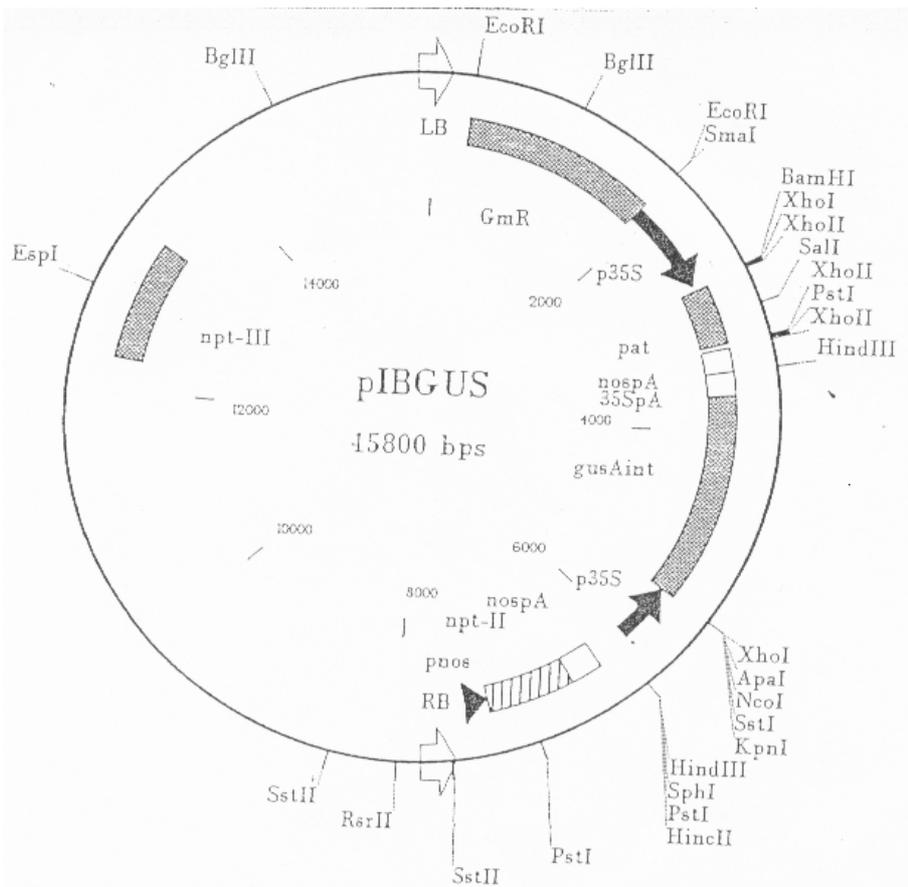


**Abb. 2.2:** T-DNA des Plasmids pBEO210 (BOVY ET AL., 1999). *Gent*: Gentamycin-Resistenzgen, 35S: Promotor des Cauliflower Mosaic Virus, *nptII*: Kanamycin-Resistenzen, *Trt7*: Terminator, *Pfbp1*: blütenspezifischer Promotor aus *Petunia*, *etr1-1*: mutierter Ethylenrezeptor aus *Arabidopsis*, *Tnos*: Terminator der Nopalinsynthase.

#### pIBGUS

Das Plasmid pIBGUS wurde von Prof. Inge Broer hergestellt und dankenswerterweise von Prof. Hans-Jörg Jacobsen zur Verfügung gestellt. pIBGUS enthält zwischen der linken und rechten Bordersequenz der T-DNA das *gusAint*-Gen sowie das *nptII*-Gen, das *gusAint*-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors und das *nptII*-Gen unter Kontrolle des nos-Promotors (Abb. 2.3). Das *gusAint*-Gen besitzt ein Intron.

Das Plasmid hat eine Größe von 15.800 bp.

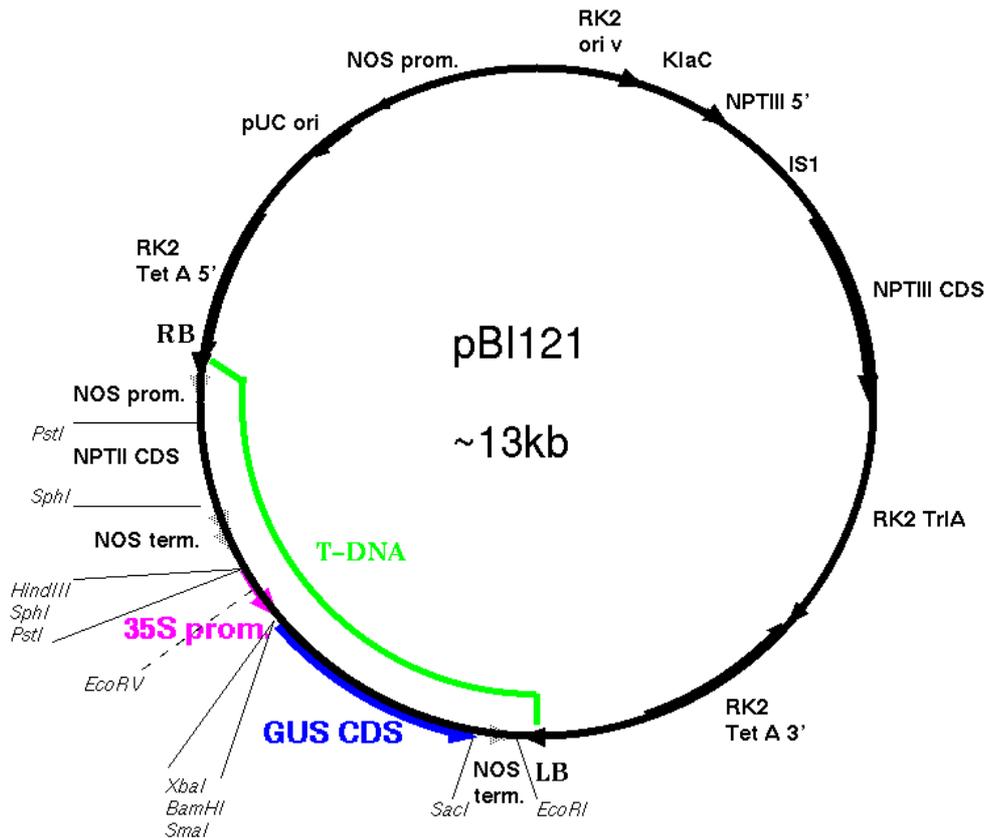


**Abb. 2.3:** Plasmidkarte des binären Vektors **pIBGUS**: *GmR*: Gentamycin-Resistenzgen, 35S: Promotor des Cauliflower Mosaic Virus, *pat*: Phosphinotricin-Resistenzgen, *nospA*: Terminator der Nopalinsynthase, *gusAint*: Gen mit Intron für die  $\beta$ -Glucuronidase, *nptII*: Kanamycin-Resistenzgen, *nosP*: Promotor der Nopalinsynthase.

### pBI121

Das Plasmid pBI121 wurde von der Firma Clontech hergestellt und freundlicherweise vom Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. pBI121 enthält zwischen der linken und rechten Bordersequenz der T-DNA das *gus*-Gen ohne Intron sowie das *nptII*-Gen, das *gus*-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors und das *nptII*-Gen unter Kontrolle des *nosP*-Promotors (Abb. 2.4).

Die Größe des Plasmids beträgt circa 13.000 bp.

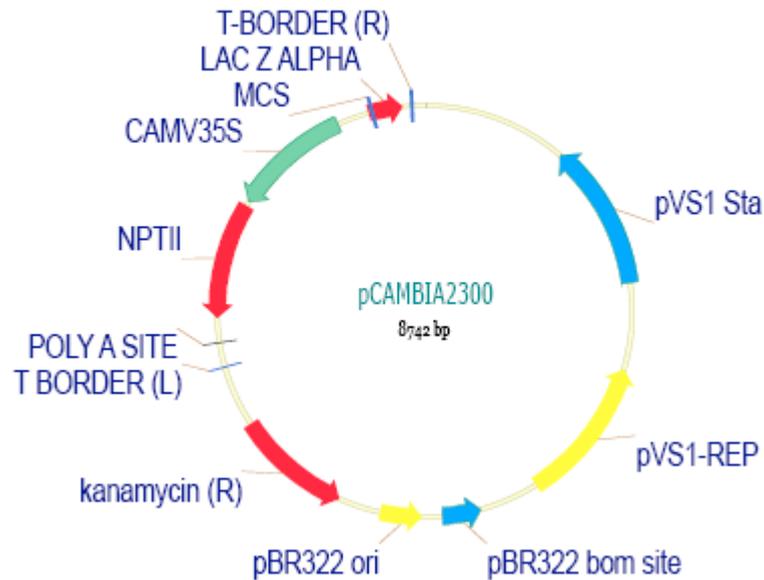


**Abb. 2.4:** Plasmidkarte des binären Vektors pBI121. *Tnos*: Terminator der Nopalinsynthase, *gus*: Gen für die  $\beta$ -Glucuronidase, *35S*: Promotor des Cauliflower Mosaic Virus, *nptII*: Kanamycin-Resistenzgen, *nosP*: Promotor der Nopalinsynthase.

### pCambia2300

Das Plasmid pCambia 2300 ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)) wurde freundlicherweise von Prof. Traud Winkelmann zur Verfügung gestellt. pCambia2300 enthält zwischen der linken und rechten Bordersequenz der T-DNA eine "multiple cloning site" (MCS) sowie das *nptII*-Gen, reguliert durch den 35S-Promotor (Abb. 2.5). Die in der MCS enthaltenen Schnittstellen *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SallI*, *PstI* und *HindIII* sind so genannte "single cutter", d.h. sie schneiden nur an einer Stelle im Plasmid.

Das Plasmid hat eine Größe von 8.742 bp.



**Abb. 2.5:** Plasmidkarte des binären Vektors pCAMBIA2300. MCS: "multiple cloning site", *nptII*: Kanamycin-Gen, CAMV35S: Promotor des Cauliflower Mosaic Virus ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)).

### pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>

Das Plasmid pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (TOPO TA Cloning - Kit von Invitrogen) enthält ein Ampicillin-Gen (*amp*) sowie das *nptII*-Gen, beide reguliert durch den 35S-Promotor. Dieser linearisierte Vektor enthält 3'-T-Überhänge an der Insertionsstelle, die innerhalb eines Proteinfragments zur  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galaktosidase lokalisiert ist, und ermöglicht damit ein "blau/weiß-Screening". Die Größe des Plasmids beträgt 3.908 bp.

## 2.1.4 Medien

### Pflanzenkulturmedien

Als Basismedium für *Oncidium* und *Odontoglossum* wurde die Zusammensetzung der Makro- und Mikroelemente von MURASHIGE & SKOOG (1962) in halber Konzentration verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Mischung aus Vitaminen und anderen organischen Bestandteilen ist in Tab.2.2 ersichtlich. Weitere Standardzugaben waren 20 g/l Saccharose, 1 g/l Polyvinylpyrolidone-10, 0,25 g/l Pepton und 0,25 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O. Der pH-Wert wurde auf 5,8-6,0 eingestellt.

Tab. 2.2: Zusammensetzung der Vitaminmischung für das Basismedium.

Substanz	Konzentration	Molarität
	[mg l <sup>-1</sup> ]	[μM]
Myo-Inositol	100,0	554,94
Glycin	2,0	26,64
Nicotinsäure	0,5	4,06
Thiamin-HCl	1,0	0,30
Pyridoxin-HCl	0,5	2,43

Die Zusammensetzung der Kulturmedien für die verschiedenen Anwendungen ist den entsprechenden Kapiteln der Methoden zu entnehmen.

### Bakterienmedien

Das YEB-Medium wurde zur Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* verwendet, während für die Kultur von *Escherichia coli* sowohl das LB-Medium als auch das SOC-Medium zur Anwendung kamen (Tab. 2.3). Die Selektion der Bakterienkolonien erfolgte durch Zugabe von 50 mg/l Kanamycin.

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Bakterienmedien YEB, LB und SOC.

Substanz	YEB-Medium	LB-Medium	SOC-Medium
Pepton [w/v]	0,5 %	1,0 %	0,002 %
Hefeextrakt [w/v]	0,1 %	0,5 %	0,5 %
NaCl [w/v]	-	0,5 %	0,06 %
KCl [w/v]	-	-	0,02 %
MgSO <sub>4</sub> [w/v]	0,05 %	-	0,1 %
Fleischextrakt [w/v]	0,5 %	-	-
Saccharose [w/v]	0,5 %	-	-
Glukose [w/v]	-	-	0,35 %
pH	7,2	7,5	-

### 2.1.5 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind der Tab. 2.4 zu entnehmen.

**Tab. 2.4: Restriktionsenzyme und DNA modifizierende Enzyme.**

Enzym	Hersteller
<i>Bam</i> HI	Fermentas
<i>Psh</i> AI	New England Biolabs
<i>Pfu</i> Polymerase	Fermentas
<i>Pst</i> I	Fermentas
<i>RNase</i> A	Roche
<i>Sal</i> I	Fermentas
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Roche
T <sub>4</sub> DNA-Ligase	Fermentas
<i>Taq</i> Polymerase	Fermentas

### 2.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Tab. 2.5) wurden von der Firma MWG (Ebersberg, <http://ecom2.mwgdna.com>) bezogen.

Tab. 2.5: Sequenzen der Oligonukleotide zum Nachweis verschiedener Zielgene.

Zielgen	Name	Primersequenz	Annealing- temperatur [°C]	Produkt- größe [bp]
Promotor von <i>PeMADS5</i>	Pro1PeMADS5_s	5'-GGGAAATTGATTGGGATGTG-3'	60	889
	Pe MADS5Pro2_as	5'-TCTCTCTCCCCTGAAAGCAA-3'		
Promotor von <i>PeMADS5</i> mit Restriktionsenzymen	Pro1PeMADS5b_s	5'-CTGCAGGGGAAATTGATTGGGATGTG-3'	60	901
	PeMADS5Pro2b_as	5'-GTCGACTCTCTCTCCCCTGAAAGCAA-3'		
<i>PeMADS5</i>	ProPeMADS5_as	5'-AGGGCTGCAGAAATCAGCTA-3'	60	1.139
Primer aus Promotor <i>PeMADS5</i> für die Sequenzierung	PeMADS5Pro3_s	5'-GTCAAACAGAGGGGTCTCA-3'	60	
PCR-Amplifizierung des Fragments Promotor <i>fbp1</i> und <i>etr1-1</i> aus pBEO210	fbp1etr1-1_s	5'-TGTGGTGAAAGAAAACTCGAC-3'	64	1.027
	fbp1etr1-1_as	5'-CACGGCTGATTTCTTCACAA-3'		
PCR-Amplifizierung des Fragments Promotor <i>PeMADS5</i> und <i>etr1-1</i> aus pBEO210	Pro1PeMADS5_s	5'-GGGAAATTGATTGGGATGTG-3'	60	1.477
	fbp1etr1-1_as	5'-CACGGCTGATTTCTTCACAA-3'		
Agrobakteriengenom	PicA_s	5'-ATGCGCATGAGGCTCGTCTTCGAG-3'	63	550
	PicA_as	5'-GACGCAACGCATCCTCGATCAGCT-3'		
GUS-Gen	GUS1	5'-CCTGTAGAAACCCCAACCCG-3'	66	952
	GUS2	5'-TGGCTGTGACGCACAGTTCA-3'		
<i>nptII</i> -Gen	nptII_s	5'-ATGACTGGGCACAACAGACA-3'	62	620
	nptII_as	5'-AATATCACGGGTAGCCAACG-3'		

## 2.2 Untersuchung des Einflusses von Ethylen auf die Seneszenz

### 2.2.1 Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Blütenrispen

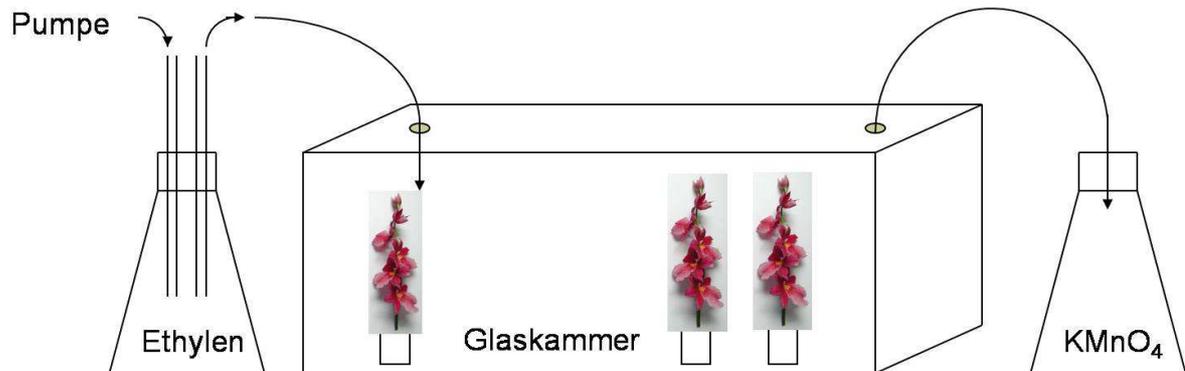
Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchung wurden für die Gattung *Oncidium* Blütenrispen von ON01 und ON02 verwendet. Bei den *Odontoglossum*-Hybriden handelte es sich um Blütenrispen von OD03, OD05, OD06 und OD07 (Kap. 2.1.1). Zum Nachweis des Effektes von Ethylen und 1-MCP, dem Inhibitor des Ethylenrezeptors, auf die Haltbarkeit von Blütenrispen wurden diese in einer 0,05 m<sup>3</sup> gasdichten Glaskammer Ethylen mit einer Konzentration von 1,0 ( $\pm$  0,2)  $\mu\text{L L}^{-1}$  ausgesetzt. Während der Dauer des Versuchs befanden sich die Blütenrispen in mit Wasser gefüllten Röhrchen.

Zunächst wurde die Hälfte der Blütenrispen mit 1-MCP vorbehandelt. Dazu wurden sie in luftdicht verschlossenen Glaskammern (0,05 m<sup>3</sup>) mit 200 nL L<sup>-1</sup> 1-MCP für sechs Stunden bei Raumtemperatur behandelt, indem dem 1-MCP-Pulver ein paar Tropfen Wasser zugegeben wurden und dadurch der Wirkstoff gasförmig freigesetzt wurde. Die Kontrollpflanzen befanden sich für dieselbe Zeitdauer in einer verschlossenen und mit Raumluft gefüllten Glaskammer.

Nach dieser Vorbehandlung wurden die Glaskammern für eine Stunde gelüftet. Die Blütenstände wurden darauf randomisiert in den luftdichten Glaskammern verteilt. Diese wurden verschlossen und bei 20°C unter einer Photoperiode von 16/8 Stunden durch eine Beleuchtung mit weißen Leuchtstoffröhren bei 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  gehalten. Eine gasdichte Glaskammer wurde mit Ethylen beigemischter Raumluft bei einer Konzentration von 1,0 ( $\pm$  0,2)  $\mu\text{L L}^{-1}$  begast, das durch ein einfaches Diffusionsverfahren (SALVEITH 1978, Abb. 2.6) ermöglicht wurde, während die zweite Glaskammer nur mit Raumluft versorgt wurde. Die aus der Glaskammer austretende und mit Ethylen versetzte Raumluft wurde durch einen mit Kaliumpermanganat (KMnO<sub>4</sub>) gefüllten Erlenmeyerkolben geführt. Das Ethylen band an das Kaliumpermanganat und wurde dadurch nicht an die Raumluft im Versuchsraum abgegeben.

Die Konzentration an Ethylen in der gasdichten Glaskammer wurde täglich mittels Gaschromatographen (Perkin-Elmer, GC Voyager FFKG312; Perkin Elmer, Markham, Ontario, Canada), der mit einem Photoionisationsdetektor ausgestattet ist, ermittelt. Als Trägergas wurde N<sub>2</sub> (40 mL min<sup>-1</sup>) verwendet, der Injektionsdruck betrug 69 kPa, die Ofen- und die Säulentemperatur jeweils 60°C.

Bonitiert wurden täglich die Anzahl an Blüten und Knospen und deren Erscheinungsbild, sowie die Anzahl der Tage bis zur Welke der Blüten gegenüber der entsprechenden Kontrolle. Bei ON01 wurde der Ethylenversuch nur einmal durchgeführt, bei OD03, OD04, OD05, OD06 und OD07 zweimal und bei ON02 dreimal. Für jeden Genotypen wurden jeweils acht Blütenstiele, d.h zwei pro Behandlungsvariante eingesetzt.



**Abb. 2.6:** Versuchsaufbau zur Untersuchung der Wirkung von Ethylen und dem Inhibitor des Ethylenrezeptors 1-MCP auf Blütenrispen. Mit Hilfe einer Pumpe wurde der Raumluft Ethylen in einer Konzentration von  $1,0 (\pm 0,2) \mu\text{L L}^{-1}$  beigemischt und kontinuierlich der gasdichten Glaskammer zugeführt. Am anderen Ende der Glaskammer wurde die mit Ethylen versetzte Raumluft in einen mit Kaliumpermanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) gefüllten Erlenmeyerkolben abgeführt. Das Ethylen bindete an das Kaliumpermanganat und wurde dadurch nicht an die Raumluft des Versuchsraums abgegeben.

### 2.2.2 Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Topfpflanzen

Dieser Untersuchung dienten Topfpflanzen als Ausgangsmaterial. Für die Gattung *Oncidium* wurde ON02 verwendet und bei den *Odontoglossum*-Hybriden kamen OD04 und OD05 zum Einsatz (Kap. 2.1.1).

Wie bereits bei der Untersuchung der Blütenrispen (Kap. 2.2.1) beschrieben, wurde die Hälfte der Pflanzen mit 1-MCP vorbehandelt. Für die Begasung mit  $200 \text{ nL L}^{-1}$  1-MCP für sechs Stunden bei Raumtemperatur wurde bei den Topfpflanzen eine Wachstumskammer von  $0,66 \text{ m}^3$  verwendet. Die Kontrollpflanzen kamen in eine zweite, mit Raumluft gefüllte Wachstumskammer.

Nach dem Belüften wurden die Topfpflanzen zufällig in zwei Klimakammern von jeweils  $21 \text{ m}^3$  verteilt. Dort wurden sie unter denselben Bedingungen wie die Blütenrispen gehalten. Nur die Behandlung mit Ethylen wurde auf eine andere Weise durchgeführt. Die Ethylenkonzentration in der Wachstumskammer wurde zweimal täglich

gaschromatographisch ermittelt und daraufhin wurde die Differenz zur gewünschten Konzentration von  $1,0 (\pm 0,2) \mu\text{L L}^{-1}$  an purem Ethylen eingespritzt.

Bonitiert wurde täglich die Anzahl an Knospen, offenen und welken Blüten sowie die Anzahl der Tage bis zur Welke der ersten und letzten Blüte. Zusätzlich wurde rein visuell das Erscheinungsbild, in erster Linie Vergilbungen bei Blättern und Stängeln, erfasst. Für jeden Genotypen wurde der Ethylenversuch zweimal mit jeweils zwanzig Topfpflanzen, d.h fünf pro Behandlungsvariante durchgeführt.

### **2.3 Entwicklung von In-vitro-Kulturtechniken**

Die folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit horizontalem Luftstrom durchgeführt. Alle benötigten Arbeitsmaterialien, Kulturmedien und Chemikalien wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert. Antibiotika sind thermolabile Substanzen, weshalb sie sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren dem Medium zugegeben wurden.

Die In-vitro-Kulturen wurden bei  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  und einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden kultiviert, wobei die Beleuchtung durch weiß fluoreszierende Leuchtstoffröhren mit einer Stärke von ca.  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erfolgte.

#### **2.3.1 Etablierung steriler Sprosskulturen**

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung einer In-vitro-Kultur wurden die Seitensprosse der Pseudobulben der in Kap. 2.1.1 beschriebenen Genotypen ON01 und ON02 der Gattung *Oncidium* und OD01 bis OD07 der *Odontoglossum*-Hybriden verwendet.

Für die sterile Sprossspitzenkultur wurde zunächst die Knospe des Seitensprosses freigelegt, indem die äußersten Blätter der Pseudobulben entfernt wurden. Die Oberfläche der 3-5 mm großen Knospe wurde sterilisiert, indem sie für 5 Minuten in eine 1,5 %ige NaOCl-Lösung mit ein paar Tropfen Tween 20 zur Reduzierung der Oberflächenspannung getaucht wurde. Anschließend wurde die Knospe dreimal mit sterilem Wasser gewaschen, um das Pflanzengewebe schädigende NaOCl wieder zu entfernen.

Nun galt es das Meristem, bzw. die Sprossspitze - hierbei handelt es sich um ein Meristem, das von Blattprimordien umhüllt ist - aus der Knospe herauszupräparieren. Dazu wurden die

äußeren Hüllblätter weitestgehend entfernt und die freigelegte Sprossspitze auf ein mit 4,4 µM BAP und 0,5 µM IBA versetztes Basismedium nach MURASHIGE & SKOOG (1962, Kap. 2.1.4) aufgelegt. Die Sprossspitzen wurden in Petrischalen von 5 cm Durchmesser mit ca. 10 ml Medium kultiviert.

Die Sprossspitzen wurden alle vier Wochen auf demselben Medium subkultiviert. Nach drei Monaten wurden die aus den Sprossspitzen entstandenen Sprosse vereinzelt und auf ein Medium überführt, das zusätzlich noch 2,9 µM GA<sub>3</sub> enthielt. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Sprosse alle drei Monaten in gammabestrahlten runden Gefäßen aus Polypropylen (Fa. LAB Associates) mit ca. 100 ml Medium subkultiviert.

### **2.3.2 Vermehrung von In-vitro-Sprosskulturen**

Zur Ermittlung eines optimalen Sprossvermehrungsmediums wurden die Makronährsalze nach MURASHIGE & SKOOG (1962) des Basismediums zum Teil aufgedoppelt sowie verschiedene Auxine und Cytokinine in unterschiedlicher Konzentration getestet (Tab. 2.6). Drei Monate alte Sprosse wurden vereinzelt, auf die Vermehrungsmedien in gammabestrahlten runden Gefäßen aus Polypropylen (Fa. LAB Associates) mit ca. 100 ml Medium überführt und bei der nächsten Subkultur nach drei Monaten bonitiert. Ermittelt wurde die Vermehrungsrate, die als Anzahl Sprosse nach einer Kulturdauer von drei Monaten bezogen auf die eingesetzte Anzahl an Sprossen zu Beginn definiert wurde, und visuell die Größe der einzelnen Sprosse aufgeteilt in drei Klassen: Klein (< 1,5 cm), Mittel (1,5 bis 3,0 cm) und Groß (> 3,0 cm).

Das Basismedium für die Mikrovermehrung ist Kap. 2.1.4 zu entnehmen, die besonderen Zusätze sind in Tab. 2.6 aufgelistet. Die Verwendung der Medienabkürzungen bezog sich auf die verwendeten Inhaltsstoffe: demnach steht B für BAP, I für IAA und N für NAA. Die 1 in der Medienbezeichnung bezog sich auf die Verwendung der MS-Salze in voller Konzentration, während 1/2 auf die halbe Konzentration verweist.

**Tab. 2.6: Konzentration der MS-Salze und Zusätze der Vermehrungsmedien für die In-vitro-Kulturen.**

<b>Substanz</b>	<b>1/2BI</b>	<b>1BN</b>	<b>1/2BN</b>
MS-Salze	1/2 x	1 x	1/2 x
BAP [ $\mu\text{M}$ ]	0,9	8,8	8,8
NAA [ $\mu\text{M}$ ]	-	5,4	5,4
IAA [ $\mu\text{M}$ ]	1,1	-	-
Agar [%]	0,8	0,8	0,8

### 2.3.3 Bewurzelung und Akklimatisierung im Gewächshaus

Die Bewurzelung der In-vitro-Sprosse erfolgte auf dem Basismedium mit 0,8 % Agar ohne jegliche Hormonzusätze. Als Kulturgefäße wurden wiederum gammabestrahlte runde Gefäße aus Polypropylen (Fa. LAB Associates) mit ca. 100 ml Medium verwendet.

Die Akklimatisierung der bewurzelten In-vitro-Sprosse an Ex-vitro-Bedingungen erfolgte im Gewächshaus unter einem Folienzelt. Die Wurzeln der Sprosse wurden zunächst mit Wasser von den Medienresten befreit und dann auf das Betriebssubstrat der Fa. Raffener (hergestellt von der Fa. Slingerland) überführt. Das Betriebssubstrat bestand schätzungsweise aus 80 % Pinienrinde fein (7-15 mm), 10 % *Sphagnum*-Fasern, 10 % Schaumstofflocken und 10 % Pflanzenperlite (KLEIN, 2007).

Sofort nach dem Pikieren wurden die Sprosse mit dem Dünger Peters Professional Grow Mix (21-07-21, Fa. Scotts) in einer Konzentration von 0,5 ‰ angegossen. Die Sprosse wurden die ersten vier Wochen jede zweite Woche und darauf jede Woche gedüngt. Die Kultur der Pflanzen erfolgte bei einer Temperatur von 18-20°C. Nach vier Wochen unter dem Folienzelt wurden die akklimatisierten Pflanzen langsam abgelüftet.

### 2.3.4 Regeneration von PLBs aus Blattmaterial

Für die Regeneration aus Blattmaterial von ON01, ON02, OD01, OD04, OD05 und OD06 wurden verschiedene Medien hinsichtlich ihrer Effektivität zur Induktion von PLBs getestet. Die Medien bestanden wiederum aus dem Basismedium (Kap. 2.1.4) nach MURASHIGE & SKOOG (1962) mit verschiedenen Zusätzen, die in Tab. 2.7 aufgelistet sind. Die Verwendung der Medienabkürzungen bezog sich auf die verwendeten Inhaltsstoffe: demnach steht T für

TDZ, I für IAA und B für BAP. Die 1 in der Medienbezeichnung bezog sich auf die Mengenangabe von 1 mg/l und A, bzw. G auf die Verfestigungsmittel Agar, bzw. Gelrite.

**Tab. 2.7: Zugaben zum Basismedium nach MURASHIGE & SKOOG (1962, Kap. 2.1.4) in den Versuchen zur Regeneration von PLBs.**

Substanz	T1G	T1A	T1I1G	B1G
BAP [ $\mu\text{M}$ ]	-	-	-	4,4
TDZ [ $\mu\text{M}$ ]	4,5	4,5	4,5	-
IAA [ $\mu\text{M}$ ]	-	-	5,7	-
Agar [%]	-	0,8	-	-
Gelrite [%]	0,4	-	0,4	0,4

Als Ausgangsmaterial für diese Versuche dienten 2 und 5 mm breite Blattstreifen und 1 und 2 cm lange Blattspitzen von In-vitro-Sprossen. Bei den Blattstreifen wurde die Blattspitze verworfen und das restliche Blatt über die Blattachse hinweg in Streifen geschnitten. Die Explantate wurden sowohl abaxial als auch adaxial auf das Medium aufgelegt und in völliger Dunkelheit oder im Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei 20°C und 24°C kultiviert. Die Explantate wurden vierwöchentlich für zwei bis drei Monate auf demselben Medium subkultiviert.

Jede Versuchsfrage wurde dreimal mit jeweils 30 Explantaten pro Behandlungsvariante wiederholt. Die Auswertung erfolgte jeweils 30, 45, 60, 75 und 90 Tagen nach Versuchsbeginn. Folgende Parameter wurden zur Beurteilung der Induktion von PLBs herangezogen:

- die Regenerationsrate, d. h. die Anzahl Blattexplantate mit Regeneration bezogen auf die gesamte Anzahl an Blattexplantaten multipliziert mit dem Faktor 100.
- die mittlere Anzahl Regenerate pro regenerierendem Explantat, d. h. die gesamte Anzahl an Regeneraten bezogen auf die Anzahl Blattexplantate mit Regeneration.

### 2.3.5 Regeneration von Sprossen aus der Flüssigkultur

Für die Flüssigkultur wurden die aus Blattmaterial regenerierten PLBs verwendet, die mit einem Skalpell zerhackt und im Basismedium unter Zugabe von 4,5  $\mu\text{M}$  TDZ (T1) und alternativ von 1,4  $\mu\text{M}$  TDZ (T03) kultiviert wurden. Bei der Flüssigkultur kamen Weithalserlenmeyerkolben von 100 ml zur Anwendung, in die 0,5 g Frischmasse an

zerhackten PLBs und 20 ml an Flüssigmedium gegeben wurden. Die Kolben wurden im Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei 20°C permanent bei 100 rpm geschüttelt.

Für jeden Genotypen wurde der Regenerationsversuch in Flüssigmedium zweimal mit jeweils 40 Weithalserlenmeyerkolben wiederholt. Die Auswertung erfolgte zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von sechs bis acht Wochen. Dabei wurden an jedem Termin jeweils drei Weithalserlenmeyerkolben für die Auswertung herangezogen. Jedes Gefäß wurde mit einem 100 µm dichten Siebgewebe aus Polypropylen (Fa. Neolab) gesiebt, um die PLBs vom Flüssigmedium zu trennen. Anschließend wurden die PLBs zur Ermittlung der Frischmasse gewogen. Nach einer Woche im Trockenschrank bei 50°C wurde das Trockengewicht der PLBs erfasst.

Folgende Parameter wurden zur Beurteilung des geeigneten Mediums für die Regeneration von PLBs herangezogen:

- die Frischmasse
- die Trockenmasse

Die Regeneration von PLBs zu Sprossen erfolgte bei der Subkultur der PLBs, nach drei bis vier Wochen in Flüssigmedium (Kap. 2.3.3). Für die Regeneration von Sprossen wurde das Basismedium unter Zugabe von 0,4 % Gelrite (T0G) verwendet. Die PLBs wurden zerhackt und jeweils 0,5 g wurden in Petrischalen von 5 cm Durchmesser mit ca. 10 ml Medium überführt und im Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden, wobei die Beleuchtung durch weiß fluoreszierende Leuchtstoffröhren mit einer Stärke von ca. 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> erfolgte. Die Raumtemperatur betrug 20°C.

## 2.4 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Gentransfer

### 2.4.1 Kultur, Anzucht und Aufreinigung der Agrobakterien

Die Kulturen von *A. tumefaciens* wurden in Form von Glycerindauerkulturen (250 µl Bakteriensuspension + 337 µl 80 % Glycerin) bei -80°C gelagert. Für die fortwährende Benutzung von *A. tumefaciens* wurden die einzelnen Bakterienstämme mit einer Impföse alle drei Wochen auf neues YEB-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 28°C wachsen gelassen. Diese Platten wurden zum Animpfen der ÜNK für die Transformation verwendet, da hiermit ein schnelles Wachstum von *A. tumefaciens* gewährleistet werden konnte. Je nach verwendetem Vektor wurden bei der Anzucht folgende Konzentrationen an Antibiotika zur Selektion zugegeben:

pIBGUS	50 mg/l Kanamycin und 20 mg/l Rifampicin
pBI121	50 mg/l Kanamycin und 20 mg/l Rifampicin
pBEO210	50 mg/l Kanamycin, 20 mg/l Rifampicin und 30 mg/l Streptomycin

Die Kulturen von *A. tumefaciens* wurden bei einer Temperatur von 28°C unter Schütteln (170 rpm) über Nacht inkubiert. Am Tag der Transformation wurden die Bakterien durch eine Zentrifugation für 10 Minuten von 3.000 g bei Raumtemperatur vom Bakterienmedium getrennt. Das Pellet wurde in flüssigem Basismedium (Kap. 2.1.4), dem 100 µM Acetosyringon zugefügt wurde, resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde für die Transformation verwendet.

### 2.4.2 Transformation von Blattspitzen mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Als Ausgangsmaterial für die Transformation wurden 1 cm lange Blattspitzen von In-vitro-Sprossen verwendet. Um die optimale Vorkulturdauer zu ermitteln, wurden die Blattspitzen adaxial auf das Regenerationsmedium T1G (Kap. 2.3.4) aufgelegt und für 1, 14 und 28 Tage im Dunkeln bei 24°C kultiviert. Zur Transformation wurden die Explantate unter gelegentlichem Schütteln in der Bakteriensuspension (Kap. 2.4.1) mit einer Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5 für 30 Minuten inkubiert.

Nach dem Trocknen auf sterilem Filterpapier wurden die Blattspitzen adaxial auf dasselbe Medium der Vorkultur gegeben und für drei Tage im Dunkeln bei 24°C mit *A. tumefaciens* kokultiviert. Nach der Kokultur wurden die Explantate in sterilem Wasser unter Zugabe von 500 mg/l Cefotaxim gewaschen, auf sterilem Filterpapier getrocknet und auf das

Selektionsmedium T1G/300 (Kap. 2.4.4) adaxial aufgelegt. Dieser Versuch wurde für die Genotypen ON02 und OD01 zweimal mit jeweils 100 bis 200 Blattspitzen wiederholt.

### **2.4.3 Transformation von PLBs mittels *Agrobacterium tumefaciens***

Drei bis vier Wochen alte zerhackte PLBs (0,2 g) aus der Flüssigkultur (Kap. 2.3.3) bildeten das Ausgangsmaterial für diese Art der Transformation. Die Vorkultur erfolgte abhängig von dem jeweiligen Versuch auf dem Basismedium mit oder ohne 0,4 % Gelrite bei einer Temperatur von 20°C im Dunkeln oder in einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden (Tab. 2.8).

Die Verwendung der Abkürzungen für die Transformationsversuche (Tab. 2.8) bezogen sich auf die Kulturform und der Behandlungen während der Transformation: demnach steht f für Festmedium, fl für Flüssigkultur, U für Ultraschall und V für Vakuuminfiltration.

Die PLBs mit der Vorkultur auf Festmedium (Tf und Tfvsl, Tab. 2.8) wurden unter gelegentlichem Schütteln in einer Bakteriensuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 1,0 für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die PLBs auf dasselbe Medium der Vorkultur aufgelegt und für drei Tage im Dunkeln bei 20°C mit *A. tumefaciens* kokultiviert. Im Anschluss an die Kokultur wurden die PLBs in sterilem Wasser unter Zugabe von 500 mg/l Cefotaxim gewaschen und auf das Selektionsmedium T0G/300 (Kap. 2.4.4) umgesetzt. Der Transformationsversuch auf Festmedium (Tf) wurde viermal mit den Genotypen ON02 und OD01 (Tf1 bis Tf4) und viermal zum Vergleich der Genotypen ON01, ON02, OD01 und OD04 (Tf5 bis Tf8) mit jeweils fünf Petrischalen (5 cm Durchmesser) pro Behandlung wiederholt.

Als nächste Versuchsfrage wurden die Transformation in Flüssigkultur und auf Festmedium unter Verwendung von ON02 miteinander verglichen (Tfvsl, Tab. 2.8). Dabei wurde zunächst vor allem auf die beiden Medienvarianten fest versus flüssig während der Vorkultur, Kokultur und Selektion geachtet (Tfvsl1 bis Tfvsl3). Dieser Transformationsversuch wurde dreimal mit jeweils 16 Petrischalen (5 cm Durchmesser) und 16 Weithalserlenmeyerkolben pro Behandlung (Tab. 2.9) wiederholt.

**Tab. 2.8: Darstellung der verschiedenen Parameter für die einzelnen Transformationsversuche.** *Tf*: Transformation auf Festmedium, *Tfvsfl*: Transformation auf Fest- vs. Flüssigmedium, *TfIU*: Transformation in Flüssigmedium mit Ultraschallbehandlung, *TfIV*: Transformation in Flüssigmedium mit Vakuuminfiltration.

Bezeichnung	Versuchsnummer	Genotypen	Vorkultur			Kokultur				Kultur nach Trafo
			Tage	Medium flüssig/fest	Licht/Dunkel	Tage	Medium flüssig/fest	OD <sub>600</sub>	Licht/Dunkel	
<b>Tf</b>	Tf1	ON02 / OD01	7	fest	Dunkel	3	fest	1,0	Dunkel	festes Medium, im Licht
	Tf2	ON02 / OD01	7	fest	Dunkel	3	fest	1,0	Dunkel	festes Medium, im Licht
	Tf3	ON02 / OD01	7	fest	Dunkel	3	fest	1,0	Dunkel	festes Medium, im Licht
	Tf4	ON02	7	fest	Dunkel	3	fest	1,0	Dunkel	festes Medium, im Licht
	Tf5	ON01/ON02/OD01/OD04	7	fest	Dunkel	3	fest	1,0	Dunkel	festes Medium, im Licht
	Tf6	ON01/ON02/OD01/OD04	7	fest	Dunkel	3	fest	1,0	Dunkel	festes Medium, im Licht
	Tf7	ON01/ON02/OD04	7	fest	Dunkel	3	fest	1,0	Dunkel	festes Medium, im Licht
	Tf8	ON01/ON02/OD04	7	fest	Dunkel	3	fest	1,0	Dunkel	festes Medium, im Licht
<b>Tfvsfl</b>	Tfvsfl1	ON02	7	flüssig/fest	Licht/Dunkel	2/3	flüssig/fest	0,1/1,0	Licht/Dunkel	Siehe Tab. 2.9
	Tfvsfl2	ON02	7	flüssig/fest	Licht/Dunkel	2/3	flüssig/fest	0,1/1,0	Licht/Dunkel	Siehe Tab. 2.9
	Tfvsfl3	ON02	7	flüssig/fest	Licht/Dunkel	2/3	flüssig/fest	0,1/1,0	Licht/Dunkel	Siehe Tab. 2.9
	Tfvsfl4	ON02	7	flüssig/fest	Licht/Dunkel	2/3	flüssig/fest	0,1/0,5/1,0	Licht/Dunkel	Siehe Tab. 2.10
	Tfvsfl5	ON02	7	flüssig/fest	Licht/Dunkel	2/3	flüssig/fest	0,1/0,5/1,0	Licht/Dunkel	Siehe Tab. 2.10
<b>TfIU</b>	TfIU1	ON02	3	flüssig	Licht	2	flüssig, Ultraschall- behandlung	0,1	Licht	festes Medium, im Licht
	TfIU2	ON02	3	flüssig	Licht	2		0,1	Licht	festes Medium, im Licht
	TfIU3	ON02	3	flüssig	Licht	2		0,1	Licht	festes Medium, im Licht
<b>TfIV</b>	TfIV1	ON02	3	flüssig	Licht	2	flüssig, Vakuum- infiltration	0,1	Licht	festes Medium, im Licht
	TfIV2	ON02	3	flüssig	Licht	2		0,1	Licht	festes Medium, im Licht
	TfIV3	ON02	3	flüssig	Licht	2		0,1	Licht	festes Medium, im Licht

**Tab. 2.9: Darstellung der verschiedenen Parameter für die Transformationsversuche Tfvsfl1 bis Tfvsfl3 (Tab. 2.8) des Vergleichs der verschiedenen Kulturphasen in flüssigem und auf festem Medium.**

	Tfvsfl-A	Tfvsfl-B	Tfvsfl-C	Tfvsfl-D
<b>Vorkultur</b>	7 Tage Flüssigmedium im Licht	7 Tage Flüssigmedium im Licht	7 Tage Flüssigmedium im Dunkeln	7 Tage festes Medium im Dunkeln
<b>Kokultur</b>	2 Tage Flüssigmedium im Licht	2 Tage Flüssigmedium im Licht	2 Tage Flüssigmedium im Dunkeln	3 Tage festes Medium im Dunkeln
<b>Selektion</b>	3 Wochen flüssig, dann festes Medium	festes Medium	festes Medium	festes Medium

Bei den Transformationsversuchen Tfvsfl4 und Tfvsfl5 (Tab. 2.8) wurde neben dem Vergleich des flüssigen mit dem festen Medium vor und nach der Transformation zusätzlich die Dichte ( $OD_{600}$ ) der Bakteriensuspension während der Inkubation variiert. Bei dieser Untersuchung wurden die PLBs in Flüssigkultur mit einer Bakteriensuspension der Dichte ( $OD_{600}$ ) 0,1 und 0,5 für zwei und drei Tage Kokultur inkubiert. Die Inkubation der PLBs auf Festmedium hingegen fand bei einer Bakteriendichte ( $OD_{600}$ ) von 1,0 statt (Tab. 2.10). Dieser Transformationsversuch wurde zweimal mit jeweils 10 Petrischalen (5 cm Durchmesser) und 10 Weithalslerlenmeyerkolben pro Behandlung wiederholt.

**Tab. 2.10: Darstellung der verschiedenen Parameter für die Transformationsversuche Tfvsfl4 und Tfvsfl5 (Tab. 2.8) des Vergleichs der verschiedenen Kulturphasen in flüssigem und auf festem Medium mit zusätzlicher Variation der Bakteriendichte ( $OD_{600}$ ).**

	Tfvsfl-E	Tfvsfl-F	Tfvsfl-G	Tfvsfl-H	Tfvsfl-I
<b>Vorkultur</b>	7 Tage Flüssigmedium im Licht	7 Tage festes Medium im Dunkeln			
<b>Kokultur</b>	2 Tage Flüssigmedium im Licht bei $OD_{600}$ 0,1	2 Tage Flüssigmedium im Licht bei $OD_{600}$ 0,5	3 Tage Flüssigmedium im Licht bei $OD_{600}$ 0,1	3 Tage Flüssigmedium im Licht bei $OD_{600}$ 0,5	3 Tage festes Medium im Dunkeln bei $OD_{600}$ 1,0
<b>Selektion</b>	festes Medium				

Bei der Transformation in Flüssigmedium TflU (Tab. 2.8) wurde nach dem Zugeben der Bakteriensuspension eine Ultraschallbehandlung bei 45 kHz durchgeführt, wobei die Behandlungsdauer bei 5, 10, 30 und 60 Sekunden lag. Die Transformation in Flüssigmedium TflV (Tab. 2.8) wurde mit Hilfe der Vakuuminfiltration bei 400 mm Hg durchgeführt, bei der nach dem Zuführen der Bakteriensuspension für 1, 2 und 4 Minuten ein Vakuum angelegt wurde. Nach der Kokultur von zwei Tagen wurden die PLBs der Transformationsversuche in sterilem Wasser unter Zugabe von 500 mg/l Cefotaxim gewaschen und erneut auf das

Basismedium mit 0,4 % Gelrite überführt. Die beiden Transformationsversuche wurden mit dem Genotypen ON02 dreimal mit jeweils vier Weithalserlenmeyerkolben pro Behandlung wiederholt.

Die Transformationsversuche wurden mit verschiedenen Kombinationen an Bakterienstämmen und entsprechenden Vektoren durchgeführt. Die unterschiedlichen Kombinationen sind in Tab. 2.11 aufgeführt.

**Tab. 2.11: Kombination der Bakterienstämme mit entsprechenden Vektoren (Kap. 2.1.3).**

<b>Name</b>	<b>Kombination</b>
EHA/etr	EHA105 mit pBEO210
AGL0/etr	AGL0 mit pBEO210
EHA/gus	EHA105 mit pBI121
LBA/gus	LBA4404 mit pBI121
EHA/gus2	EHA105 mit pIBGUS
LBA/etr	LBA4404 mit pBEO210

#### **2.4.4 Selektion und Regeneration transgener Pflanzen**

##### **Ermittlung der geeigneten Konzentrationen des selektiven Agens**

Die Untersuchung der geeigneten Konzentration an Kanamycin wurde auf festem Medium (Tab. 2.12) in einem Versuch mit jeweils 30 Blattspitzen pro Behandlung mit dem Genotypen ON02 durchgeführt. Bei der Ermittlung der geeigneten Konzentration an Kanamycin in Flüssigmedium (Tab. 2.12) wurde der Versuch mit den Genotypen ON02 und OD01 zweimal mit je zwanzig Weithalserlenmeyerkolben pro Behandlung wiederholt. Zweimal die Woche wurden jeweils drei dieser zwanzig Weithalserlenmeyerkolben für die Ermittlung der Frisch- und Trockenmasse der PLBs herangezogen.

**Tab. 2.12: Zusammensetzung der Medien für die Ermittlung der geeigneten Konzentration an Kanamycin zur Selektion.** T1G: Tab. 2.7; T03: Kap. 2.3.2.

	0 mg/l Kanamycin	50 mg/l Kanamycin	100 mg/l Kanamycin	200 mg/l Kanamycin	300 mg/l Kanamycin	500 mg/l Kanamycin
festes Medium	T1G/0		T1G/100	T1G/200	T1G/300	T1G/500
Flüssigmedium	T03/0	T03/50	T03/100	T03/200	T03/300	

Ein weiterer Versuch befasste sich mit dem Vergleich von dem in den Transformationsversuchen verwendeten Cefotaxim und dem alternativen Antibiotikum Timentin. Diese beiden Antibiotika verhindern ein Auswachsen von *A. tumefaciens* während der Kulturphase nach der Transformation. Die dem Medium T0G (Kap. 2.3.5) zugegebenen Konzentrationen an Cefotaxim und Timentin sind Tab. 2.13 zu entnehmen. Die Konzentration an Kanamycin betrug 300 mg/l. Die Wirkung der Antibiotika Timentin und Cefotaxim wurde mit ON02 in einem Versuch mit je sechs Petrischalen (5 cm Durchmesser) pro Behandlung untersucht.

**Tab. 2.13: Zusammensetzung der Medien zur Inhibierung des Auswachsens von Agrobakterien.** Tim: Timentin, Cef: Cefotaxim.

	Cef	0 mg/l	250 mg/l	500 mg/l
Tim				
0 mg/l		S1	S2	S3
250 mg/l		S4	S5	S6
500 mg/l		S7	S8	S9

Die Untersuchung der Selektionswirkung von Mannose wurde durchgeführt, um auf eine Möglichkeit Antibiotika-freier Selektion zurückgreifen zu können. Mannose kann von der Pflanze nicht verwertet werden. Wird die Pflanze mit Phosphomannose-Isomerase (*pmi*) transformiert, so kann Mannose in einen für die Pflanze metabolisierbaren Zucker umgewandelt und von dieser verwertet werden. Die dem Medium T0G (Kap. 2.3.5) zusätzlich zur Saccharose zugefügten Konzentrationen an Mannose sind in Tab. 2.14 aufgeführt.

Die Selektionswirkung von Mannose wurde für die Genotypen ON01, ON02, OD01 und OD04 untersucht. Dabei wurden vier Wochen alte PLBs zerhackt und jeweils 0,5 g wurden auf die Petrischalen ausplattiert. Der Versuch wurde einmal mit je zehn Petrischalen (5 cm Durchmesser) pro Genotypen und Konzentrationsstufe durchgeführt.

**Tab. 2.14: Zugaben an Mannose im Medium T0G (Kap. 2.3.5) zur Untersuchung der Selektionswirkung.**

	M0	M10	M20	M30
Mannose [g/l]	0	10	20	30

### Selektionsbedingungen der Transformationsversuche

Die Ermittlung der geeigneten Konzentration des selektiven Agens Kanamycin erfolgte durch dessen Zugabe ins Medium in den in Tab. 2.12 aufgeführten Konzentrationen. Ein Auswachsen von *A. tumefaciens* während der Kulturphase wurde durch den Zusatz von 500 mg/l Cefotaxim verhindert.

Die Regeneration transgener PLBs aus den Blattspitzen erfolgte auf dem Selektionsmedium T1G/300 (Tab. 2.12) unter Zugabe von 500 mg/l Cefotaxim. Die Selektion transgener PLBs bei Verwendung zerhackter PLBs in Flüssigmedium hingegen erfolgte auf T03/300 (Tab. 2.12) unter Zugabe von 500 mg/l Cefotaxim. Transgene Sprosse aus der Transformation von PLBs konnten auf dem Selektionsmedium T0G/300, einem hormonfreiem Festmedium unter Zugabe von 300 mg/l Kanamycin und 500 mg/l Cefotaxim, regenerieren. Sobald die ersten Sprosse vereinzelt werden konnten, wurde die Konzentration des selektiven Agens Kanamycin auf 100 mg/l reduziert.

Bei *Oncidium* und *Odontoglossum* erfolgte die Selektion transgener PLBs direkt im Anschluss an die Kokultur. Die Explantate wurden alle vier Wochen auf dem Selektionsmedium subkultiviert, bis nach einem halben Jahr der abschließende histochemische GUS-Test erfolgte und die Anzahl der putativ transgenen Sprosse/PLBs vermerkt wurde. Von diesem Zeitpunkt an wurden nur noch bereits entwickelte grüne Sprosse weiterkultiviert.

### 2.4.5 Histochemischer GUS-Test

Die Untersuchung der transformierten Blattspitzen, PLBs und Sprosse auf Integration und Funktion des übertragenen Reportergens *gus* erfolgte nach JEFFERSON (1987).

Die Explantate wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und die GUS-Färbelösung (Tab. 2.15) wurde bis zur vollständigen Bedeckung derselben hinzupipettiert. Zur besseren

Infiltration der Färbelösung in das Gewebe wurde eine einminütige Vakuumbehandlung durchgeführt. Danach wurden die Explantate über Nacht bei 37°C inkubiert.

**Tab. 2.15: Zusammensetzung der GUS-Färbelösung**

<b>GUS-Färbelösung:</b>	
2,0 mM	X-Gluc
0,05 M	NaPO <sub>4</sub> -Puffer (pH 7,0)
0,5 mM	K-Ferrycyanat
0,5 mM	K-Ferrocyanat
0,5 %	Triton X-100
	H <sub>2</sub> O dest.

Nach der Inkubation wurde die Färbelösung durch 80 %igen Ethanol ersetzt, der zu einer Extraktion des Chlorophylls führte. Anhand der Blaufärbung von Zellen konnte die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in exprimierenden Bereichen nachgewiesen werden.

#### **2.4.6 Auswertung von Transformationsversuchen**

Die Bewertungskriterien für den GUS-Test bei der Transformation von Blattspitzen sind im Folgenden angeführt:

- prozentualer Anteil an Blattspitzen mit „spots“ (blau gefärbte Zellen)
- Anzahl „spots“ (blau gefärbte Zellen) je Blattspitze gemittelt über die Explantate mit „spots“

Die Bewertungskriterien für den GUS-Test bei der Transformation von PLBs umfassten:

- prozentualer Anteil an Explantaten mit „spots“ (blau gefärbte Zellen) der untersuchten PLBs
- Anzahl „spots“ (blau gefärbte Zellen) je PLB gemittelt über die Explantate mit „spots“

Dargestellt wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen eines Transformationsversuches. Die statistischen Berechnungen werden in Kap. 2.6 beschrieben.

Bei der Transformation von PLBs berechnete sich die Transformationseffizienz aus der Anzahl mittels PCR-Technik ermittelter transgener Sprosse bezogen auf die zu Beginn eingesetzte durchschnittliche Anzahl an PLBs multipliziert mit dem Faktor 100. Für die

Transformation der PLBs wurden für jede Wiederholung jeweils 0,2 g PLBs aus der Flüssigkultur zerhackt und transformiert. Nach der Kokultur wurden diese 0,2 g auf Selektionsmedium ausplattiert und zunächst für vier Wochen darauf kultiviert. Im Anschluss daran wurden durchschnittlich 60 PLBs aus der zerhackten Zellmasse ausgewählt und weiterkultiviert. Diese durchschnittlich 60 PLBs dienten bei allen Transformationsversuchen pauschal als zu Beginn eingesetzte Anzahl an PLBs, auf die sich die Transformationseffizienz bezog.

Für jede Versuchsfrage der untersuchten Transformationsmethoden wird im Ergebnisteil exemplarisch die Auswertung des histochemischen GUS-Tests für eine Versuchswiederholung herangezogen. Die weiteren Wiederholungen einer Transformationsvariante werden im Anhang tabellarisch dargestellt.

Das Ergebnis des Nachweises der Integration des gewünschten Gens mittels PCR-Analyse wird anhand aller durchgeführten Wiederholungen einer Versuchsfrage tabellarisch dargestellt. Für jeden Transformationsversuch wurden jeweils die Anzahl ermittelter transgener Linien (TL) und die Transformationseffizienz (TE) ermittelt.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### Isolierung der Gesamt-DNA aus Pflanzen

Es wurden drei Methoden zur Isolierung der genomischen DNA aus Blattmaterial von *Oncidium* ON02 verglichen.

Die erste Methode beruhte auf dem DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen laut Angaben des Herstellers, die zweite ist eine modifizierte CTAB-Methode nach CHEN ET AL. (1998), die speziell für *Phalaenopsis* entwickelt wurde. Als dritte Methode wurde das Verfahren nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) angewendet.

Die DNA-Isolierung wurde für jede angeführte Methode viermal mit Blattmaterial wiederholt.

Die Vorgehensweise nach CHEN ET AL. (1998) wird im Folgenden beschrieben:

- 300 mg von in flüssigem Stickstoff gemörsertem Blattmaterial wurden mit 1 ml vorgeheiztem Extraktionspuffer (Tab. 2.17) bei 65°C für 30 min erwärmt
- Zugabe von 3,5 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:23:1) und Inkubation für 30 min bei 0°C unter gelegentlichem Schütteln
- Die Lösung wurde bei 4°C und 4.000 g für 5 min zentrifugiert
- Zugabe desselben Volumens an Isopropanol und Lagerung für 1 h bei -20°C
- Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 10.000 g für 25 min wurde der Überstand verworfen
- Das Pellet wurde in 300 µl gekühlten TE-Puffer (Tab. 2.16) und 1 µl RNase (2U/µl) gelöst und für eine Stunde bei 37°C erwärmt
- Nach Zugabe von 30 µl 3 M NaOAc und 1 ml absolutem Alkohol wurde die Lösung für 20 min bei 12.000 g zentrifugiert
- Das DNA-Pellet wurde in 300 µl gekühltem Ethanol gewaschen und für 20 min bei 12.000 g zentrifugiert
- Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer (Tab. 2.16) gelöst

**Tab. 2.16: Zusammensetzung des TE-Puffers**

TE-Puffer	
10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
1 mM	EDTA

**Tab. 2.17: Zusammensetzung des CTAB-Extraktionspuffers**

CTAB-Extraktionspuffer	
1% (w/v)	Cetyltrimethylammonium bromide
100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
1,4 M	NaCl
20 mM	EDTA
0,1 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus Blattmaterial nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) wird im Folgenden beschrieben:

- 20 mg von in flüssigem Stickstoff gemörsertem Pflanzenmaterial wurden 400  $\mu$ l Extraktionspuffer (Tab. 2.18) und 20  $\mu$ l RNase (10 mg/ml) zugegeben und gut gevortext
- Die Lösung wurde für 15 min bei 65°C inkubiert und dabei das Reaktionsgefäß gelegentlich geschwenkt, um das Absetzen von Gewebe zu vermeiden
- Zugabe von 200  $\mu$ l kaltem 5 M Kaliumacetat und Inkubation für 10 min im Eisbad
- Nach Zentrifugation für 20 min bei 12.000 g wurden 500  $\mu$ l Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 500  $\mu$ l kaltes Isopropanol zugegeben und vermischt
- Nach Sichtbarwerden der DNA-Fäden (nach maximal 10 min) wurde für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert
- Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml kaltem 70%igen Ethanol gewaschen, zentrifugiert und im Vakuum für 5 bis 10 min getrocknet
- Zugabe von 50  $\mu$ l *Aqua dest.* und Inkubation bei Raumtemperatur bis zum Lösen des Pellets

**Tab. 2.18: Zusammensetzung des Extraktionspuffers nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997)**

Extraktionspuffer nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997)	
200 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA
0,5 %	SDS

### Isolierung der Gesamt-RNA aus Pflanzen

Es wurden vier Methoden zur RNA-Isolierung verglichen. Zum einem wurde das Kit der Fa. Invitex nach Angaben des Herstellers verwendet und zum anderen kamen RNA-Isolierungsverfahren nach MÜHLHARDT (2002), YU UND GOH (2000) und KRIEG (1996) zur Anwendung. Die RNA-Ausbeute wurde photometrisch (Fa. Eppendorf, Biophotometer) ermittelt.

Die RNA-Isolierung wurde für jede angeführte Methode viermal mit Blütenmaterial von Topfpflanzen des *Oncidium*-Genotypen ON02 wiederholt.

Das Protokoll nach MÜHLHARDT (2002) wurde wie folgt angewendet:

- 100 mg von in flüssigem Stickstoff gemörsertem Pflanzenmaterial wurden mit 1 ml der Denaturierungslösung (Tab. 2.19) gut gemischt
- Dem Lysat wurden 100 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 ml Phenol und 200 µl Chloroform zugegeben
- Nach 15 min auf Eis wurde die Lösung für 20 min bei 12.000 g zentrifugiert
- Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und dasselbe Volumen an Isopropanol zugegeben
- Nach 10 min Zentrifugation bei 12.000 g wurde das Pellet gewaschen, getrocknet und in 50 µl 0,1 % DEPC-Wasser (mit Diethylpyrocarbonat behandeltes *Aqua bidest.*) gelöst

**Tab. 2.19: Zusammensetzung der Denaturierungslösung**

<b>Denaturierungslösung:</b>	
4 M	Guanidinisothiocyanat
25 mM	Natriumcitrat (pH 7,0)
0,5 % (w/v)	N-Laurylsarcosin
0,1 M	$\beta$ -Mercaptoethanol

Das Verfahren nach YU UND GOH (2000) wird im Folgenden beschrieben:

- 100 mg mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gemahlenem Pflanzenmaterial wurde 1 ml des Extraktionspuffers (Tab. 2.20) zugegeben und für 15 min bei 65°C erwärmt
- Das Homogenisat wurde für 20 min bei 12.000 g zentrifugiert
- Die wässrige Phase wurde mit demselben Volumen an Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und für 1 min bei 12.000 g zentrifugiert
- Zugabe von 0,25 Volumen an 10 M Lithiumchlorid und Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g
- Das Pellet wurde mit Ethanol gewaschen und in 50  $\mu$ l 0,1 % DEPC-Wasser gelöst

**Tab. 2.20: Zusammensetzung des Extraktionspuffers nach YU UND GOH (2000)**

<b>Extraktionspuffer nach YU UND GOH (2000):</b>	
2 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
2 % (w/v)	Hexadecyltrimethyl-Ammonium Bromid
100 mM	Tris (Tris(Hydroxymethyl) – Aminomethan) – HCl (pH 7,5)
20 mM	EDTA
2 M	NaCl
1 % (w/v)	Polyvinylpyrolidone-30

Die RNA-Isolierung nach KRIEG (1996) dauerte, wie im Folgenden erläutert, drei Tage.

### **TAG 1:**

- Der XTA-Puffer (Tab. 2.21) wurde hergestellt und für 10 min bei 80-90°C homogenisiert.

- Dem mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gemörsertem Pflanzenmaterial wurden 3,5 ml/g Pflanzenmaterial XTA-Puffer (Tab. 2.21) und 110 µl/g Proteinase K (20 mg/ml, Sigma) zugegeben und für 1,5 h bei 42°C inkubiert
- Nach Zugabe von 280 µl/g Gewebe 2 M Kaliumchlorid wurde die Lösung für 20 min bei 6.000 g zentrifugiert
- Dem Überstand wurde 1/3 des Volumens 8 M Lithiumchlorid zugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert

**Tab. 2.21: Zusammensetzung des XTA-Puffers**

<b>XTA-Puffer:</b>	
3,5 ml/g	„Minimum XT Puffer“ (Tab. 2.22)
2,0 %	Polyvinylpyrolidone 30
1,0 %	Dithiothreitol
1,0%	Nonylphenoethoxylat (NP-40)

**Tab. 2.22: Zusammensetzung des Minimum XT-Puffers**

<b>Minimum XT-Puffer:</b>	
1%	SDS (Natriumdodecylsulfat)
1%	Natriumdeoxychlorat
5 mM	EDTA
0,2 M	di-Natriumtetraborate decahydrate (Borax)

**TAG 2:**

- Der Überstand wurde nach 20 min Zentrifugation bei 6.000 g verworfen und das Pellet wurde in 4 ml 2 M Lithiumchlorid gewaschen
- Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 6.000 g wurde das Pellet in 2 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert
- Inkubation für 10 min auf Eis und Zentrifugation für 10 min bei 6.000 g
- Dem Überstand wurde 1/10 Volumen 2 M Kaliumacetat zugegeben, für 15 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 6.000 g zentrifugiert
- Zugabe von 1,5 Volumen an Isopropanol zum Überstand und die RNA wurde über Nacht bei - 20°C präzipitieren gelassen

**TAG 3:**

- Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 30 min bei 8.000 g zentrifugiert
- Das Pellet wurde in Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl 0,1 % DEPC-Wasser resuspendiert

Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde das Kit E.Z.N.A. Plasmid Miniprep der Firma Peqlab laut Angaben des Herstellers verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 5 ml ÜNK einer Bakterienkolonie verwendet.

**2.5.2 PCR-Methoden**Standard PCR

Für Standard PCR-Techniken wurde *Taq* DNA Polymerase (Firma MBI Fermentas) verwendet. Ein Ansatz bestand jeweils aus 10 x Williams Puffer (Tab. 2.24), 2 mM dNTPs, 2,5 pmol Primer, 1-10 ng DNA und 0,5 U *Taq* Polymerase. Die PCR wurde mit einem Gradiententhermocycler Hybaid Express durchgeführt, wobei folgende Bedingungen aus Tab. 2.23 routinemäßig angewendet wurden.

Die aus den transgenen Blattspitzen und PLBs entwickelten Sprosse wurden mit Hilfe von PCR-Technik mit spezifischen Primern (Tab. 2.5) auf Insertion des gewünschten Gens ins pflanzliche Genom überprüft. Die verwendeten Primer amplifizierten zum einem ein Fragment aus dem Zielgen, *etr1-1* oder *gus*, und zum anderen ein Fragment aus dem Selektionsgen *nptII* und dem *A. tumefaciens*-Hintergrund. Die PCR-Analyse mit den vier eben genannten Primerpaaren wurde zweimal für jeden potenziell transgenen Spross wiederholt.

**Tab. 2.23: Darstellung der PCR-Bedingungen**

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	5	
Denaturierung	94	1	} 30-40
Annealing	40-65	1	
Elongation	72	2	
Abschließende Elongation	72	10	
Endtemperatur	18	-	

**Tab. 2.24: Zusammensetzung des 10 x Williams Puffers**

<b>10 x Williams Puffer:</b>	
100 mM	Tris pH 8,3
500 mM	KCl
20 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,01 %	Gelatine

### Colony-PCR

Mit der *Colony-PCR* wurden Bakterienkolonien auf Anwesenheit eines Plasmids mit gewünschtem Insert überprüft. Die Bakterienkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in den Standard-PCR-Ansatz überführt. Für die *Colony-PCR* waren 25 Zyklen ausreichend. Die Temperatur bei der Annealing-Phase lag bei 55°C.

### Sticky end-PCR

Die *sticky end-PCR* erzeugte PCR-Produkte mit kohäsiven Enden, die zu den vorhergesehenen Restriktionsschnittstellen kompatibel waren (ZENG, 1998, Abb. 2.7). Diese Methode benötigte zwei verschiedene Primerpaare, eines mit der Sequenz der Restriktionsschnittstelle und eines ohne (Tab. 2.5). Die PCR wurde für jedes Primerpaar in einem eigenen Reaktionsgefäß durchgeführt. Darauf wurden die PCR-Produkte aus beiden Gefäßen gemischt, für 5 min denaturiert und bei Raumtemperatur wieder hybridisiert, wobei nun ungefähr 25 % der PCR-Produkte ein kohäsives Ende für die Ligation mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektor besaßen. Für die *sticky end-PCR* wurde der Standard-PCR-Ansatz verwendet und es waren 25 Zyklen ausreichend. Die Temperatur bei der Annealing-Phase lag bei 55°C, und es wurde eine *Pfu* DNA Polymerase verwendet.

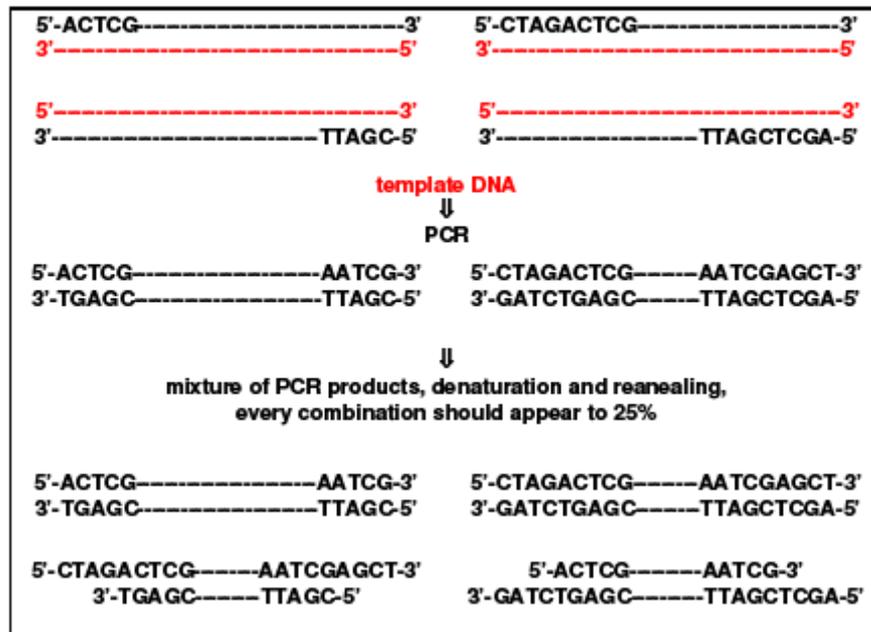


Abb. 2.7: Ablauf der *sticky end*-PCR in zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen (zwei verschiedene Primerpaare, Tab. 2.5), bereit für die Ligation (ZENG, 1998).

### 2.5.3 Gelelektrophorese

Die DNA und die PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose (Firma Seakem) wurde in 1 x TAE-Puffer (Tab. 2.25) gelöst und mit 1,0 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Der DNA und den PCR-Produkten wurden 1/5 ihres Volumens Ladepuffer (Tab. 2.26) zugegeben. Die Elektrophorese wurde bei 90 V, 15 mA und 15 W durchgeführt.

Zur Ermittlung der Fragmentgrößen wurden der 50 bp DNA-Längenmarker und der λ DNA/Eco 471 Längenmarker der Firma MBI Fermentas nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tab. 2.25: Zusammensetzung des TAE-Puffers

TAE-Puffer:	
40 mM	Tris-Ac (pH 7,5)
20 mM	Eisessig
1 mM	EDTA

**Tab. 2.26: Zusammensetzung des Ladepuffers**

<b>Ladepuffer:</b>	
30 %	Glycerin
0,25 %	Bromphenolblau
mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen	

#### 2.5.4 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, <http://www.mwg-biotech.com>) durchgeführt.

#### 2.5.5 Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen

Die Analyse und Bearbeitung von Sequenzierungsergebnissen wurde mit Hilfe der Programme Chromas 1.55 (<http://technelysium.com>) und DNA Club ([http://molbiol-tools.ca/molecular\\_biology\\_freeware.htm](http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm)) durchgeführt. Nachforschungen über die Funktion und Homologien von Gensequenzen erfolgten in der GenBank mit dem Programm "BLAST sequence alignment search tool" vom National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Abgleichungen von DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>) durchgeführt. Die Ableitung von spezifischen Primern erfolgte mit dem Programm Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Restriktionskarten für die Klonierungsarbeiten wurden mit Hilfe des Programms NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) erstellt.

#### 2.5.6 Southern Hybridisierung

Die erfolgreiche Integration des Zielgens und dessen Kopienzahl im Pflanzengenom wurde mit Hilfe der Southern Hybridisierung nachgewiesen.

##### Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Jeweils 10 µg Gesamt-DNA wurden 20 Units der Restriktionsenzyme *Pst*I, *Psh*AI und *Bam*HI zugegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Restriktionsenzyme *Pst*I und *Psh*AI

wurden aufgrund ihrer Eigenschaft gewählt, nur eine Erkennungssequenz in der T-DNA des Plasmides zu besitzen. *Bam*HI schnitt hingegen inmitten der Sonde. Nach der Zugabe von 1/5 ihres Volumens an Ladepuffer (Tab. 2.26) wurde die restringierte DNA in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei 130 V durchgeführt. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen wurden zum einem die mit Biotin angereicherte Kombination der Marker Lambda DNA-HindIII und  $\Phi$ X174 DNA-HaeIII (Fa. New England Biolabs) und zum anderem der DIG-labeled DNA Molecular-Weight Marker III (Fa. Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### Southern Transfer

Nach Auftrennung der DNA wurde das Gel für 10 min in 0,25 M HCl bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend erfolgte erst für zweimal 15 min die Denaturierung und dann für wiederum zweimal 15 min die Neutralisierung in den jeweiligen Lösungen (Tab. 2.27). Anschließend wurde das Gel für 10 min mit 20 x SSC bedeckt.

**Tab. 2.27: Zusammensetzungen der Denaturierungs- und Neutralisierungslösung, sowie von 20 x SSC**

<b>Denaturierungslösung:</b>	<b>Neutralisierungslösung:</b>	<b>20 x SSC:</b>
0,5 M NaOH	0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)	3,0 M NaCl
1,5 M NaCl	1,5 M NaCl	0,3 M Na-Citrat (pH 7,0)

Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran Hybond N<sup>+</sup> (Fa. GE Healthcare) erfolgte mit einem Vakuumblotter (Fa. Bio Rad). Das Agarosegel wurde auf die Nylonmembran gegeben und für 90 min bei 5 in Hg mit 10 x SSC geblottet.

Daraufhin wurde die Nylonmembran mit dem anhaftenden Gel nach unten auf 10 x SSC getränktes Filterpapier (Fa. Whatman) gegeben. Es erfolgte eine dreiminütige Belichtung mit UV-Licht von 302 nm auf einem Transilluminator (Fa. Bio Rad). Anschließend wurde die Nylonmembran mit Bidestwasser gewaschen, in Filterpapier getrocknet und bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert.

### Biotin-Markierung der DNA

Die Herstellung von Biotin-markierten Sonden erfolgte mit dem NEBlot<sup>®</sup> Phototope<sup>®</sup> Kit (Fa. New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers. Es wurde eine Biotin-markierte Sonde für die Detektion des *etr1-1*-Gens angefertigt. Als Ausgangsmaterial diente das

spezifische Primerpaar *fbpetr1-1\_s* und *fbpetr1-1\_as* (Tab. 2.5), das ein Fragment aus dem Promotor *fbp1* und dem Gen *etr1-1* aus dem Vektor pBEO210 amplifizierte.

### DIG-Markierung der DNA

Die Herstellung von DIG-markierten Sonden für den zweiten in dieser Arbeit angefertigten Southern Blot erfolgte mittels PCR nach Angaben des Herstellers (Fa. Roche). Es wurde eine DIG-markierte Sonde für die Detektion des *etr1-1*-Gens und des *nptII*-Gens angefertigt. Als Ausgangsmaterial dienten die spezifischen Primerpaare aus Tab. 2.5.

### Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde zunächst mit der Hybridisierungslösung der Firma New England Biolabs für 60 min bei 68°C prähybridisiert. Anschließend wurde die Biotin-markierte Sonde für 5 min denaturiert und zur Hybridisierungslösung hinzugefügt. Diese Lösung wurde zur Membran gegeben, worauf die Hybridisierung über Nacht bei 68°C im Hybridisierungsofen (Fa. Labnet ProBlot) erfolgte. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zuerst zweimal 5 min in Low Stringency Puffer und darauf zweimal 5 min in High Stringency Puffer (Tab. 2.28) gewaschen, um nicht hybridisierte Sonden zu entfernen.

**Tab. 2.28: Zusammensetzungen der Low und High Stringency Puffer**

<b>Low Stringency Puffer:</b>		<b>High Stringency Puffer:</b>	
2 x	SSC	0,5 x	SSC
0,1 %	SDS	0,1 %	SDS

Nach dem Waschen wurde die Membran in Waschlösungen equilibriert, indem folgende Inkubationsschritte durchgeführt wurden:

5 min in 15 ml Blocking-Lösung (Tab. 2.29)

5 min in der Antikörper-Lösung (Tab. 2.29)

zweimal 5 min in 77 ml Waschlösung I (Tab. 2.29)

5 min Inkubation mit biotiniertes alkalischer Phosphatase (Tab. 2.29)

5 min in 77 ml Blocking-Lösung (Tab. 2.29)

zweimal 5 min in 77 ml Waschlösung II (Tab. 2.29)

**Tab. 2.29: Zusammensetzungen der Wasch-, Blocking- und Antikörper-Lösung, sowie der biotinierten alkalischen Phosphatase**

Waschlösung I:	Waschlösung II:	Blocking-Lösung:	Biotinierte Alkalische Phosphatase:	Antikörper-Lösung:
0,5 % SDS 1,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,8 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 12,5 mM NaCl (pH 7,5)	100 mM Tris 100 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> (pH 9,5)	5 % SDS 17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 125 mM NaCl (pH 7,2)	7,7 µl biotinierte, alkalische Phosphatase 7,7 ml Blockinglösung	7,7 µl Streptavidin 7,7 ml Blockinglösung

### Detektion

Die Detektion wird im Folgenden erläutert:

- Zugabe von 38,5 µl CDPstar in 3,85 ml CDP-Star Assay Puffer (Fa. New England Biolabs)
- Verteilen der Lösung auf der Membran und für 5 min bei RT inkubieren lassen
- Entfernen von überschüssiger Flüssigkeit und mit einer zweiten Plastikfolie verschließen

Anschließend wurde die Membran bei der Durchführung des ersten Southern Blots mit dem ChemiImager (Fa. Alpha Innotech) für zweimal 45 min belichtet und digital dokumentiert.

Bei der zweiten Southern Blot Analyse wurde die in der Plastikfolie befindliche Membran für 30 bis 60 min auf einem X-Ray Film (Hyperfilm<sup>TM</sup>, Fa. Amersham Biosciences) exponiert. Der Röntgenfilm wurde abschließend in einer Dunkelkammer entsprechend den Angaben des Herstellers (Fa. Tetanal) entwickelt und fixiert.

## **2.5.7 Klonierungen und Transformation von Vektoren**

### Restriktion

Beim „Verdau“ von DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen linearisierte DNA-Fragmente charakteristischer Größe. Je nach Erkennungssequenz des eingesetzten Restriktionsenzymen weisen die Fragmente definierte Enden auf.

Die Versuche wurden mit Restriktionsenzymen der Firma MBI Fermentas nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### Gelelution

Die präparative Gelelektrophorese dient der Darstellung unterschiedlicher Bandenmuster. Die Auftrennung von Fragmenten bestimmter Größe aus einem mit Restriktionsenzymen restringierten Plasmid zielt auf die Isolierung der gewünschten DNA ab.

Die DNA-Fragmente gewünschter Größe wurden unter dem UV-Transilluminator aus „Low melting“ Agarosegelen ausgeschnitten und mit dem Nucleo Spin II Kit der Firma Macherey - Nagel nach Angaben des Herstellers eluiert.

### Dephosphorylierung von Vektoren

Die Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen des linearisierten Vektors erfolgte anschließend nach der Linearisierung desselben durch die Zugabe von 1 U SAP (shrimp alkaline phosphatase) für 30 Minuten bei 37°C. Im Anschluss wurde erneut 1 U SAP zugefügt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Behandlung wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 15 Minuten abgebrochen. Anschließend wurde eine Aufreinigung mit dem Nucleo Spin II Kit der Firma Macherey - Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### Ligation

Die Ligation wurde mit DNA-Mengen in den Verhältnissen der folgenden Formel durchgeführt:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{bp Insert}}{\text{bp Vektor}} \times 3 = \text{ng Insert}$$

Die Ligation der Plasmid-DNA mit dem Insert erfolgte mit Hilfe der T<sub>4</sub>-Ligase und dem 10 x T<sub>4</sub>-Ligase-Puffer entsprechend der Angaben des Herstellers (Firma MBI Fermentas) entweder bei 22°C für 3 Stunden oder bei 14°C über Nacht.

### Transformation von *E. coli*

Die verwendeten chemisch kompetenten TOP10F'-Zellen der Firma Invitrogen wurden nach Angaben des Herstellers transformiert.

### Transformation von *A. tumefaciens*

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen von *A. tumefaciens* wurde mit dem Elektroporator ECM 395 der Firma BTX bei einem Puls von 1,0 kV für 5-6 ms durchgeführt.

**Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* Zellen**

Die Elektroporation stellt eine einfache und reproduzierbare Methode mit hohen Transformationsraten zur Übertragung von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien (*A. tumefaciens* oder *E. coli*) dar. Die Herstellung elektrokompenter Bakterien der Bakterienstämme EHA105 und LBA4404 erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 4 ml einer gut gewachsenen ÜNK wurden zum Animpfen von 400 ml LB-Medium verwendet
- Die Bakteriensuspension wurde bei 28°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 wachsen gelassen
- Die Bakteriensuspension wurde für 10 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei 4°C und 4.000 g zentrifugiert
- Das Pellet wurde dreimal mit einer kalten HEPES-Lösung (200 ml, 1 mM, pH 7,5) gewaschen und in 5 ml HEPES-Glycerin-Lösung (1 mM, pH 7,5, 10 % Glycerin) resuspendiert
- Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 800 µl der HEPES-Glycerin-Lösung aufgenommen, in 50 µl Aliquots portioniert und bei - 80°C eingefroren

**Transformation kompetenter *A. tumefaciens* Zellen**

- Die kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10-50 ng Plasmid-DNA vermischt und in die vorgekühlte Küvette pipettiert
- die Elektroporation wurde bei 1,0 kV für 5-6 ms durchgeführt
- Sofort wurde 500 µl vorgewärmtes (28°C) LB-Medium zugegeben, vermischt und in ein Reaktionsgefäß überführt
- Die Suspension wurde für 2 h bei 28°C und 200 rpm geschüttelt und dann auf LB-Medium mit selektiven Antibiotika (Kap. 2.4.1) ausplattiert
- Nach 2-3 Tagen bei 28°C sollten einzelne Kolonien wachsen

**Klonierung des Vektors pCambiaPeMADS5etr1-1**

Die Klonierung des Vektors pCambiaPeMADS5etr1-1 erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde der Promotor von PeMADS5 aus *Phalaenopsis equestris* mittels *sticky end*-PCR (Kap. 2.5.2) amplifiziert, wobei den Enden des Amplifikates die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Sal*I hinzugefügt wurden. Für die *sticky end*-PCR wurden die spezifischen Primerpaare Pro1PeMADS5 und Pro1PeMADS5b (Tab. 2.5) verwendet.

Gleichzeitig wurde das Plasmid pCambia2300 mittels einer Doppelrestriktion mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *Sall* und dem 10 x Puffer 0 für eine Stunde bei 37°C restringiert. Anschließend wurden die restringierte Plasmid-DNA und das Amplifikat aus der *sticky end*-PCR bei 22°C für 3 Stunden ligiert und in *E. coli* transformiert. Die Überprüfung der gewünschten Kolonie erfolgte mittels *colony*-PCR (Kap. 2.5.2) mit dem spezifischen Primerpaar Pro1PeMADS5b (Tab. 2.5) der vorangegangenen *sticky end*-PCR.

Der zweite Schritt bestand in der Klonierung des *etr1-1* Gens aus pBEO210 in pCambiaPeMADS5. Dazu wurde zunächst das Plasmid pCambiaPeMADS5 mit *BamHI* linearisiert und mit der shrimp alkalinen Phosphatase (SAP) dephosphoryliert, um das Religieren des linearisierten Vektors ohne Einbindung des gewünschten Fragments zu verhindern. Anschließend wurde pBEO210 mit *BamHI* restringiert und nach der Extraktion des *etr1-1* Gens aus dem Gel, wurden das Insert und der Vektor bei 14°C über Nacht ligiert und in *E. coli* transformiert. Die Überprüfung der gewünschten Kolonie erfolgte mittels *colony*-PCR (Kap. 2.5.2) mit dem spezifischen sense-Primer Pro1PeMADS5\_s (Tab. 2.5) aus dem Promotor PeMADS5 und dem antisense-Primer fbpetr1-1\_as aus *etr1-1*. Somit konnte die Kolonie mit dem Insert in der richtigen Orientierung ausgewählt werden.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Minitab 15. Es wurden mehrfaktorielle Varianzanalysen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  errechnet. Für den Vergleich der Mittelwerte wurde der Bonferroni-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  herangezogen.

Die Darstellung der Daten erfolgte graphisch oder tabellarisch. Dabei wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen dargestellt. Bei Vorliegen von signifikanten Unterschieden wurden solche mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Sofern es zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen keine signifikanten Unterschiede gab, wurden die Daten gemittelt und in einer Grafik oder Tabelle dargestellt.

### 3 Ergebnisse

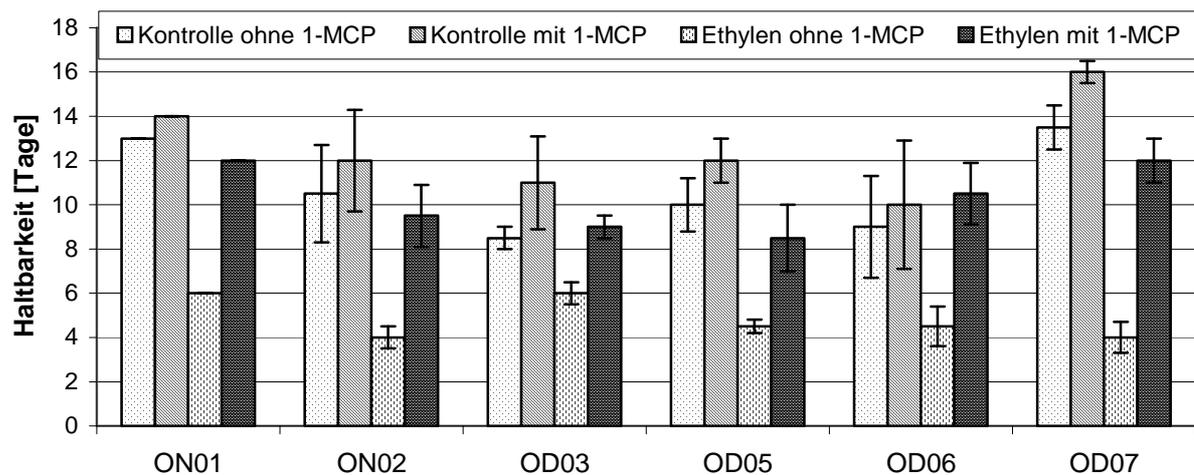
#### 3.1 Untersuchungen zum Einfluss von Ethylen und 1-MCP auf die Seneszenz

Die Rolle von Ethylen bei der Seneszenz von *Oncidium* wurde bisher nur bei Schnittblumen untersucht. Bei *Odontoglossum* hingegen wurde bisher keine Untersuchung zum Einfluss von Ethylen durchgeführt. Aus diesem Grund war es zunächst nötig, den Einfluss von Ethylen und 1-MCP auf die Alterung von Blüten und der gesamten Pflanze bei beiden Orchideengattungen und deren Hybriden zu erforschen.

##### 3.1.1 Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Blütenrispen

Die Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf die Alterung von Blütenstielen wurde erfasst, indem die Tage bis zur Welke der Blüten ermittelt wurden (Kap. 2.2.1).

Die Haltbarkeit der Blütenstiele verhielt sich bei allen Genotypen ähnlich. Die Begasung mit  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen führte zur schnellsten Welke, darauf folgten die unbehandelte Kontrolle und die mit 1-MCP vorbehandelten Blütenstiele unter Einfluss von Ethylen (Abb. 3.1). Die längste Haltbarkeit wiesen die mit 1-MCP vorbehandelten Blütenstiele in Raumluft auf. Einzig bei OD03 waren die Plätze zwei und drei vertauscht und bei OD06 wiesen die mit 1-MCP vorbehandelten Blütenstiele unter Einfluss von Ethylen die längste Haltbarkeit auf. Die mit  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen begasten Blütenstiele wiesen, abhängig vom Genotypen, Symptome der Welke bereits vier bis sechs Tage nach dem Beginn des Versuchs auf. Die Knospen konnten sich nicht mehr zur Blüten entwickeln und fielen ab. Blütenstiele ohne Ethylenbegasung hingegen begannen 2,5 bei OD03 bis 9,5 Tage bei OD07 später zu welken als jene unter Einfluss von Ethylen. Durch die Vorbehandlung mit 1-MCP trat die Seneszenz der Blütenstiele später ein, wobei dies mit einer Verzögerung von drei bis acht Tagen bei den Genotypen ON01 und OD07 bei der zusätzlichen Behandlung mit Ethylen besonders deutlich war (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Einfluss von Ethylen auf die Haltbarkeit der Blütenstiele von ON01, ON02, OD03, OD05, OD06 und OD07 in Tagen mit und ohne Vorbehandlung mit  $200 \text{ nL L}^{-1}$  1-MCP bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  für 6 h und unter Einwirkung von 0 (Kontrolle) oder  $1 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen.** Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Bei ON01 stammen die Daten aus einem Versuch, bei OD03 bis OD07 aus zwei unabhängigen Versuchen und bei ON02 aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Standardabweichung war zum Teil sehr hoch, da die Haltbarkeit der Blütenrispen zwischen den Versuchen stark variierte. Innerhalb eines Versuches hingegen waren die Daten sehr ähnlich. Bei ON01 fehlt die Standardabweichung vollständig, da hier nur ein Versuch mit zwei Wiederholungen gezeigt wird, bei dem sich die Haltbarkeit der Blütenstiele identisch verhielt.

Das Vergilben der Stängel der Einzelblüten von *Oncidium* und *Odontoglossum* konnte als ein weiteres Merkmal für die Seneszenz beobachtet werden. Diese Seneszenzerscheinung zeigte sich unter Einfluss von Ethylen bereits nach einem bis drei Tagen, abhängig vom Genotypen. Im Vergleich dazu wirkten die Kontrolle und die mit 1-MCP vorbehandelten Blütenstiele viel frischer und vitaler (Abb. 3.2). Dieses Merkmal wurde rein visuell erfasst.

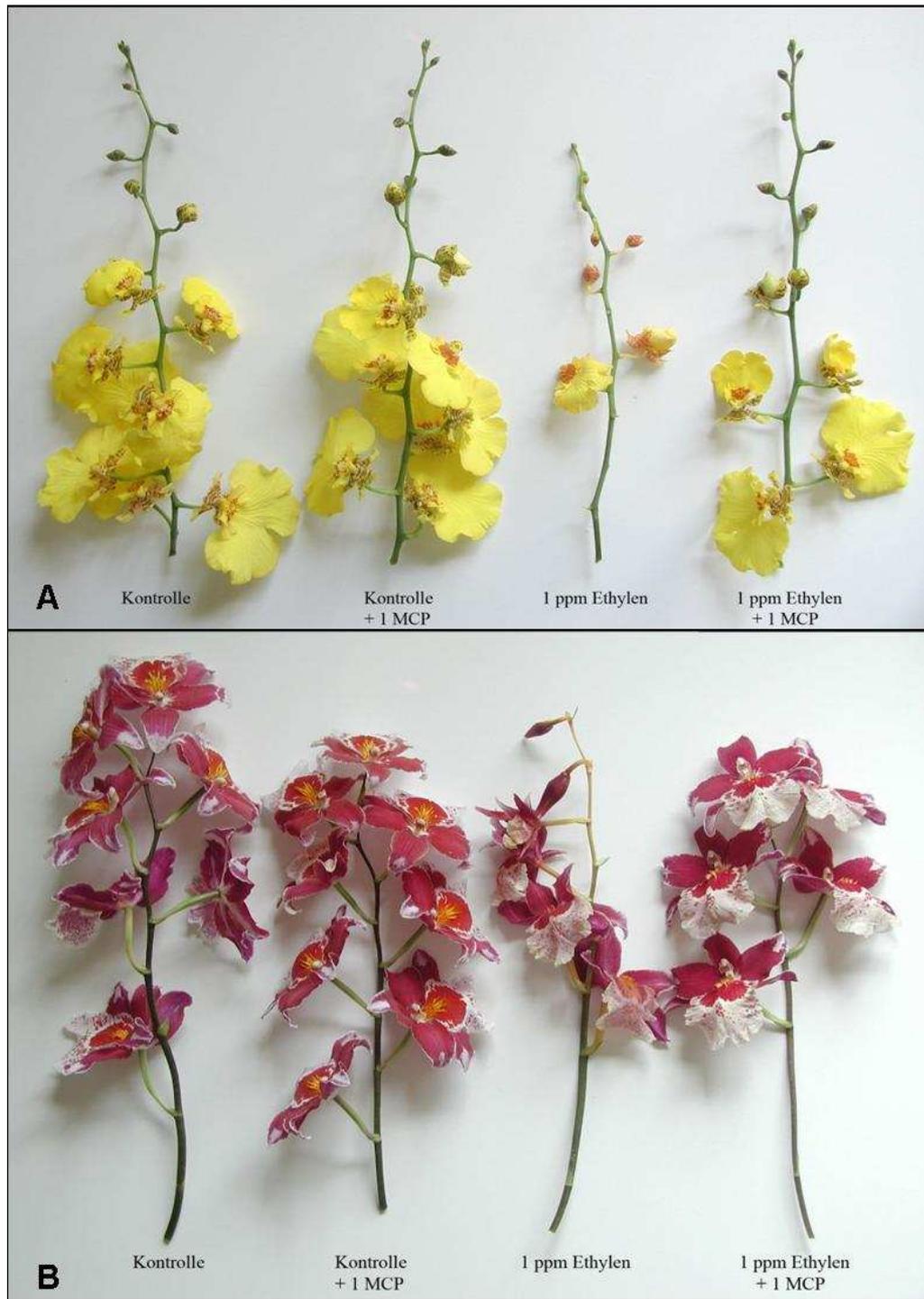


Abb. 3.2: Blütenstiele von ON02 (A) und OD07 (B) mit und ohne Vorbehandlung mit  $200 \text{ nL L}^{-1}$  1-MCP bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  für 6 h und unter Einwirkung von 0 oder  $1 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen nach 7 Tagen.

### 3.1.2 Untersuchung der Wirkung von Ethylen und 1-MCP auf Topfpflanzen

Bei den Topfpflanzen wurden wiederum die Tage bis zum Beginn der Welke (Welke der ersten Blüte) und bis zur Welke der letzten Blüte ermittelt (Kap. 2.2.2).

Die Dauer der Haltbarkeit zeigte bei den Topfpflanzen bei den verschiedenen Behandlungen dieselbe Reihenfolge wie bei den Blütenrispen (Abb. 3.3). Auch hier führte die Begasung mit  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen am schnellsten zur Welke, darauf folgten die Kontrolle und die mit 1-MCP vorbehandelten Blütenstiele unter Einfluss von Ethylen. Die längste Haltbarkeit wiesen die mit 1-MCP vorbehandelten Pflanzen in Raumluft auf. Die mit Ethylen behandelten Pflanzen ohne 1-MCP zeigten nach zwei Tagen bei ON02 bis vier Tagen bei OD04 erste Welkeerscheinungen (Beginn Welkephase 1), während in der unbehandelten Kontrolle die Pflanzen ein bis vier Tage später welkten. Durch die Vorbehandlung mit 1-MCP konnte trotz der Einwirkung von Ethylen eine Verlängerung der Haltbarkeit um zwei bis sieben Tage erzielt werden. Bei Raumluft betrug die Verzögerung des Beginns der Welke ebenfalls zwei bis sieben Tage.

Der Zeitraum von der Welke der ersten bis zur letzten Blüte war zwischen den verschiedenen Genotypen und Behandlungen sehr variabel (Abb. 3.3). Die mit 1-MCP behandelten Pflanzen wiesen unter Einwirkung von Ethylen mit bis zu sechs Tagen durchgängig die kürzeste Zeitspanne auf, während der Zeitraum bis zur Welke bei den unbehandelten Kontrollpflanzen mit bis zu 15 Tagen bei ON02 am längsten dauerte.

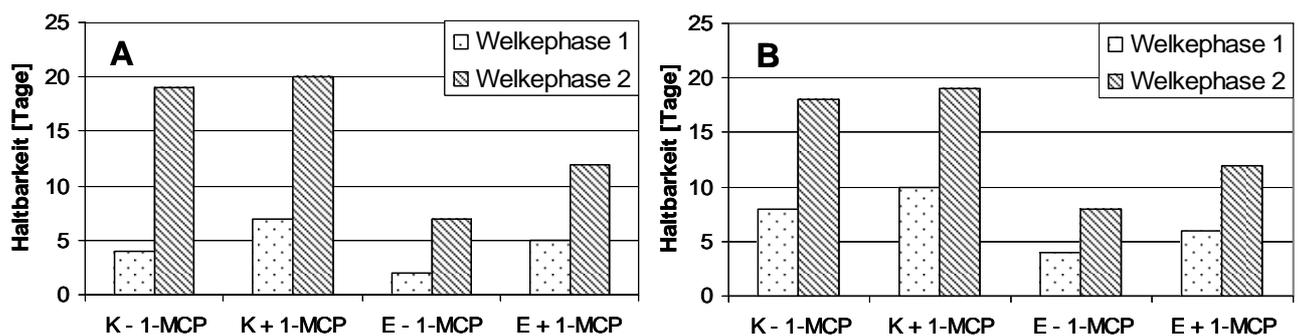


Abb. 3.3: Einfluss von Ethylen auf die Haltbarkeit der Topfpflanzen von ON02 (A) und OD04 (B) eines Versuches mit und ohne Vorbehandlung mit  $200 \text{ nL L}^{-1}$  1-MCP bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  für 6 h und unter Einwirkung von 0 oder  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen. Behandlungen: Kontrolle mit und ohne 1-MCP (K +/- 1-MCP),  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen mit und ohne 1-MCP (E +/- 1-MCP). Welkephasen: 1 – Welke der 1. Blüte und 2 – Welke der letzten Blüte.

Die Entwicklung der Knospen hin zu Blüten wurde bei den mit Ethylen begasten Pflanzen durch die schnelle Welke unterbunden, während bei den mit 1-MCP vorbehandelten Pflanzen eine Weiterentwicklung beobachtet werden konnte.

Bei den Topfpflanzen konnte als ein weiteres Merkmal der Seneszenz ein Abwerfen von vergilbten Knospen und verblühten Blüten beobachtet und erfasst werden. Die Pflanzen begannen unter Einwirkung von Ethylen als erstes Knospen und Blüten abzuwerfen, gefolgt von der unbehandelten Kontrolle und den 1-MCP behandelten Pflanzen mit Ethylenbegasung wie am Beispiel von ON02 in Tab. 3.1 ersichtlich wird. Dieses Merkmal konnte auch bei OD04 und OD05 in ähnlicher Weise beobachtet werden.

**Tab. 3.1: Prozentualer Anteil abgeworfener Knospen und Blüten bei Topfpflanzen von ON02 mit und ohne Vorbehandlung mit 200 nL L<sup>-1</sup> 1-MCP bei 20 °C für 6 h und unter Einwirkung von 0 oder 1 µL L<sup>-1</sup> Ethylen.** Behandlungen: Kontrolle mit und ohne 1-MCP (K +/- 1-MCP), 1 µL L<sup>-1</sup> Ethylen mit und ohne 1-MCP (E +/- 1-MCP). Prozentuale Angaben in Bezug auf die Gesamtzahl an Knospen und Blüten zu Beginn des Versuches.

Behandlung	Tage																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
E - 1-MCP	0	0	0	0	0	0	5	46	84	89	100							
E + 1-MCP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	10	26	74	100			
K - 1-MCP	0	0	0	0	0	0	0	4	20	49	67	81	94	100				
K + 1-MCP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	16	38	51	78	100

Bei den Versuchen mit Topfpflanzen waren die Welkeerscheinungen bei den mit Ethylen behandelten Genotypen ziemlich homogen verteilt über die gesamte Pflanze zu beobachten. Die einzelnen Pflanzen zeigten zeitgleich die Welke von Knospen und Blüten. Die Topfpflanzen wiesen allerdings nicht nur verwelkte Knospen und Blüten auf, sondern auch die Blätter begannen nach ein paar Tagen zu vergilben. Chlorosen waren über das gesamte Blatt zu beobachten, wie in Abb. 3.4 dargestellt ist. Auch dieses Merkmal wurde rein visuell erfasst.

Die Untersuchungen des Einflusses von Ethylen und 1-MCP auf die Seneszenz von Blüten haben sowohl bei den Versuchen mit Blütenrispen als auch mit Topfpflanzen eine deutlich beschleunigte Seneszenz bei den mit Ethylen begasten *Oncidium* und *Odontoglossum* gezeigt. Der Wirkstoff 1-MCP hingegen wirkte hemmend auf die Alterung von Blüten.



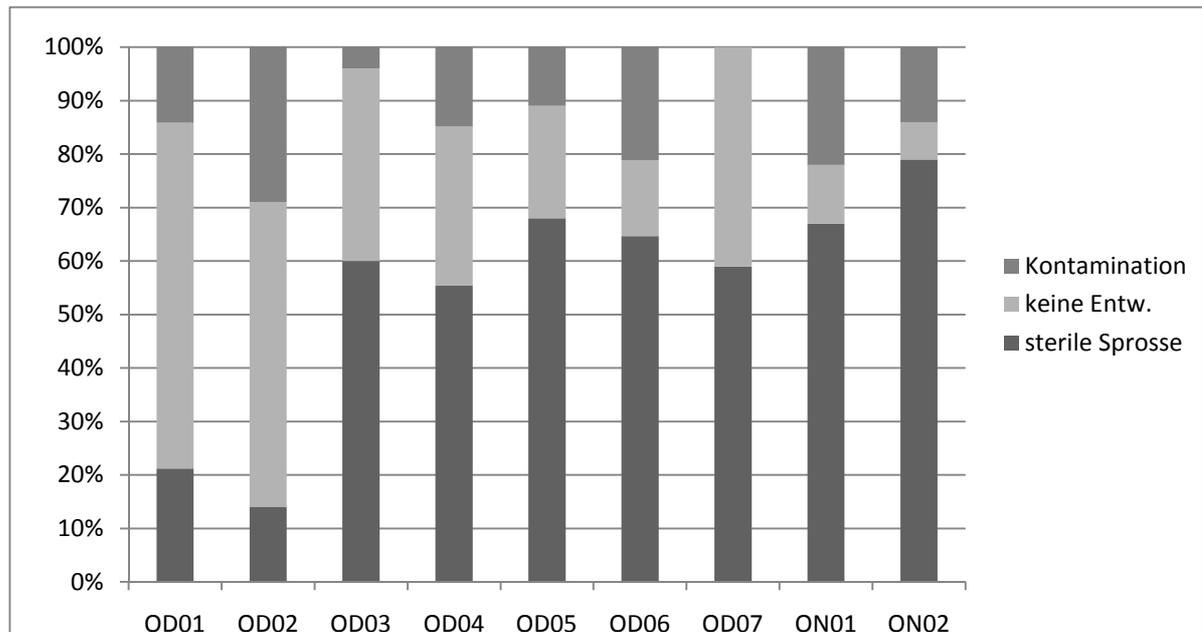
Abb. 3.4: Topfpflanzen von ON02 mit und ohne Vorbehandlung mit  $200 \text{ nL L}^{-1}$  1-MCP bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  für 6 h und unter Einwirkung von 0 oder  $1 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen nach 10 Tagen.

## 3.2 Entwicklung von In-vitro-Kulturtechniken

### 3.2.1 Etablierung steriler Sprosskulturen

Als Basis für die Durchführung von Regenerations- und Transformationsversuchen war die Etablierung steriler, homogener und genetisch identischer Sprosskulturen zur Schaffung reproduzierbarer und vergleichender Versuchsbedingungen notwendig. Aus diesem Grund wurden zu Beginn der Arbeit In-vitro-Sprosse aus den Seitenknospen der Pseudobulben von Topfpflanzen etabliert und klonal vermehrt.

Es wurden von jedem Genotypen aus *Oncidium* und *Odontoglossum* (Kap. 2.1.1) sterile Sprosskulturen aufgebaut. Allerdings war dabei die Etablierungsrate an sterilen Sprossen sehr unterschiedlich. Während ON01 und ON02 mit 67 %, bzw. 79 % an sterilen Sprossen eine sehr hohe Etablierungsrate aufwiesen, zeigten die *Odontoglossum*-Hybriden ein sehr heterogenes Bild mit Anteilen von 14 % bei OD02 bis 68 % bei OD05 (Abb. 3.5). Der Anteil an Sprossspitzen, die Kontaminationen aufwiesen, hielt sich mit 0 % bei OD07 bis maximal 29 % bei OD02 in Grenzen. Die Rate an Sprossspitzen ohne Entwicklung hingegen lag bei ON02 mit 7 % bis hin zu 64 % bei OD01 deutlich höher.



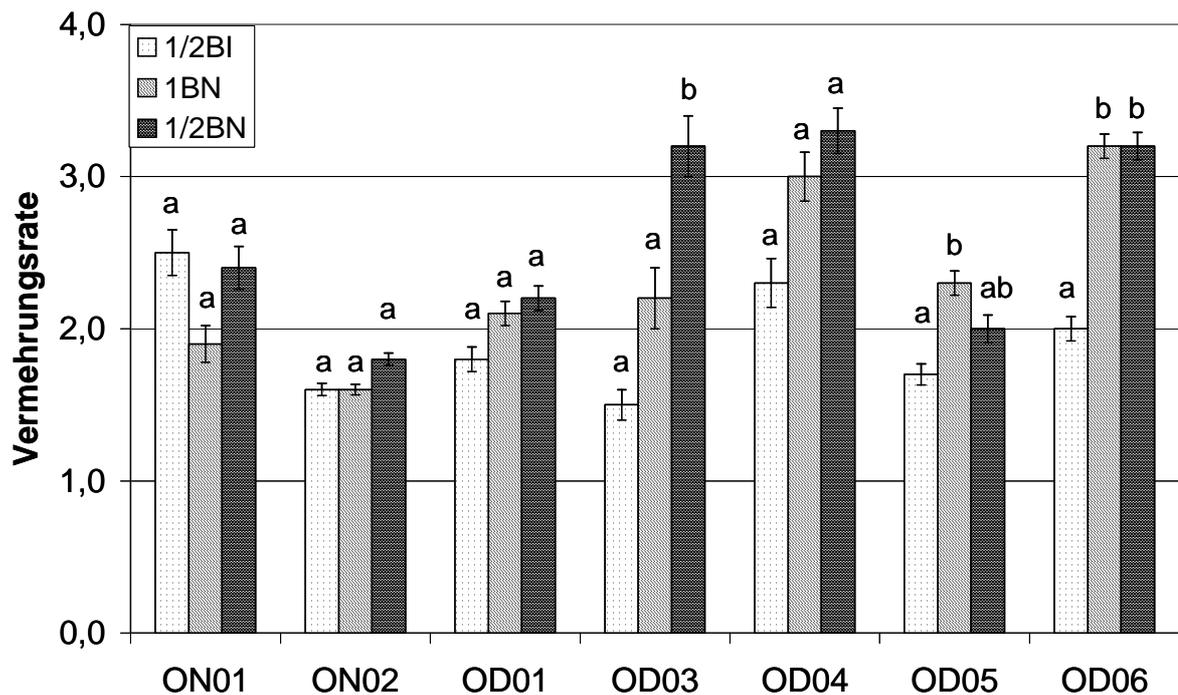
**Abb. 3.5: Prozentuale Darstellung der Etablierung steriler Sprosskulturen der Genotypen ON01, ON02, OD01 bis OD07 aufgeteilt auf die prozentualen Anteile steriler Sprosse, kontaminierter Sprosse und Sprosse ohne Entwicklung.** n: OD01 = 14, OD02 = 14, OD03 = 25, OD04 = 27, OD05 = 28, OD06 = 14, OD07 = 17, ON01 = 18, ON02 = 14.

### 3.2.2 Vermehrung von In-vitro-Sprosskulturen

Die Subkultur der In-vitro-Sprosse erfolgte alle drei Monate, wobei die Sprosse immer auf frisches Medium derselben Zusammensetzung überführt wurden. Die Sprosse wurden beim Teilen visuell immer in drei Größenklassen eingeteilt: G (ab 3 cm), M (1,5 - 3 cm) und K (< 1,5 cm). In Abb. 3.6 und Abb. 3.7 wurde daher zwischen den Vermehrungsraten, die für mittelgroße (M) und kleine Sprosse (K) erzielt wurden, unterschieden. Die Sprosse der Größenklasse G wurden nicht weiter vermehrt, sondern auf Bewurzelungsmedium überführt.

Die Vermehrungsraten der Sprosse mittlerer Größenklasse lagen allgemein mit bis zu 3,3 etwas höher als jene der kleinen mit bis zu 2,8. Es war jedoch kein Medium für alle Genotypen am besten geeignet (Abb. 3.6 und Abb. 3.7).

Die Vermehrungsraten der mittelgroßen Sprosse erwiesen sich bei den Genotypen ON01, ON02, OD01 und OD04 auf den verschiedenen Medien als nicht signifikant verschieden (Abb. 3.6). Es konnte dargestellt werden, dass die *Odontoglossum*-Hybriden OD03, OD04 und OD06 etwas höhere Vermehrungsraten aufwiesen als die *Oncidium*-Genotypen.



**Abb. 3.6:** Einfluss der Medien 1/2BI, 1BN und 1/2BN (Tab. 2.6) auf die Vermehrungsraten der mittelgroßen Sprosse (M) der Genotypen ON01, ON02, OD01, OD03, OD04, OD05 und OD06 nach drei Monaten Kultur bei 20°C. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei Subkulturen. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  innerhalb der Genotypen signifikant.

OD03, OD05 und OD06 ließen signifikante Unterschiede bei der Vermehrungsrate der verschiedenen Medien beobachten. Während OD03 auf dem Medium mit den Phytohormonen BAP und NAA und MS-Salze in halber Konzentration (1/2BN) deutlich die höchste Rate mit 3,2 erkennen ließ, waren bei OD05 das BAP- und NAA-haltige Medium mit MS-Salzen in voller Konzentration (1BN) mit 2,3 und bei OD06 die beiden Medien 1BN und 1/2BN mit 3,2 am besten geeignet (Abb. 3.6).

Bei den Vermehrungsraten der Sprosse kleiner Größenklasse wurden nur bei OD04 signifikante Unterschiede zwischen den Medien ermittelt, wobei 1BN als bestes Medium abschnitt (Abb. 3.7). Bei allen anderen Genotypen ON01, ON02, OD01, OD03, OD05 und OD06 waren die Unterschiede zwischen den Medien in der Vermehrungsrate zu vernachlässigen.

Tendenziell vermehrten sich die *Oncidium*-Genotypen auf dem Medium mit der Hormonkombination BAP und IAA und MS-Salze in halber Konzentration (1/2BI) am besten, während bei OD01, OD03 und OD06 eine leichte Steigerung der Vermehrungsrate von bis zu

0,4 im Vergleich zu den anderen Medien bei 1/2BN mit erhöhter BAP-Konzentration beobachtet werden konnte.

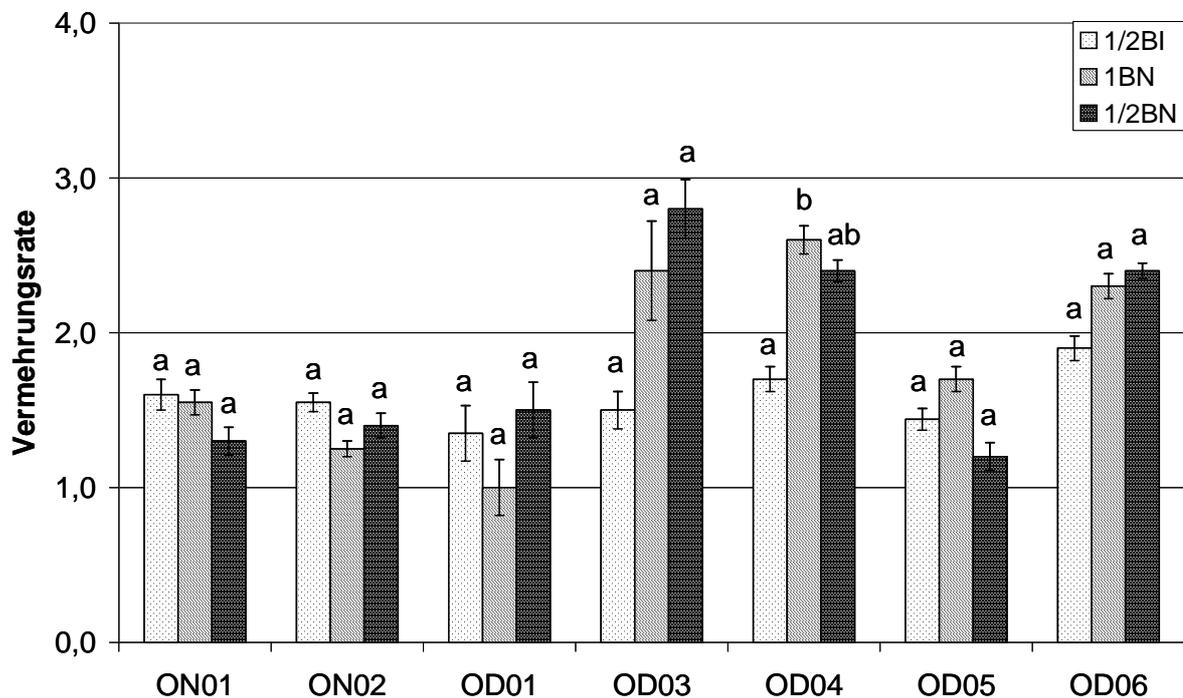


Abb. 3.7: Einfluss der Medien 1/2BI, 1BN und 1/2BN (Tab. 2.6) auf die Vermehrungsraten der kleinen Sprosse (K) der Genotypen ON01, ON02, OD01, OD03, OD04, OD05 und OD06 nach drei Monaten Kultur bei 20°C. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei Subkulturen. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  innerhalb der Genotypen signifikant.

### 3.2.3 Bewurzelung und Akklimatisierung im Gewächshaus

Die Bewurzelung der In-vitro-Sprosse erfolgte auf dem Basismedium mit 0,8 % Agar ohne jegliche Hormonzusätze. Es wurden dazu Sprosse verwendet, die bereits eine Länge von mindestens drei Zentimeter aufwiesen und qualitativ eine gut entwickelte Pflanze mit mindestens drei Blättern darstellten. Die Kulturdauer auf diesem oben genannten Bewurzelungsmedium betrug drei Monate und nach diesem Zeitraum erfolgte bei allen Genotypen eine Bewurzelung zu 100 %.

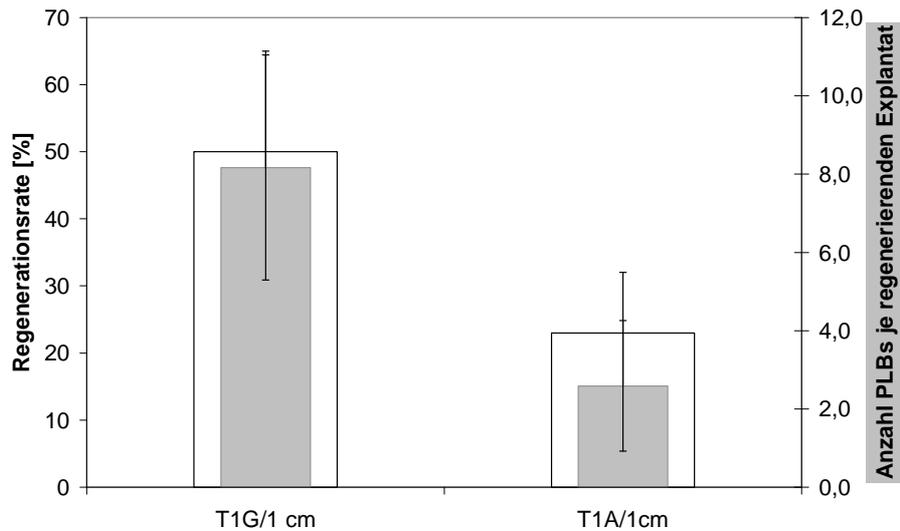
Das Substrat der Fa. Raffener (hergestellt von der Fa. Slingerland) konnte in der Arbeit von KLEIN (2007) sehr gute Akklimatisierungsraten zwischen 93 und 100 % erzielen und wurde daher bei der Akklimatisierung von *Oncidium* und den *Odontoglossum*-Hybriden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

### 3.2.4 Regeneration von PLBs über somatische Embryogenese

Die Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Regeneration von PLBs bei *Oncidium* und *Odontoglossum* ist für die Etablierung eines Transformationssystems Voraussetzung. Neben der Schaffung und Verwendung eines möglichst homogenen Ausgangsmaterials sind außerdem ein geeignetes Medium zur Induktion von PLBs und optimale Kulturbedingungen notwendig. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden zum einen die Orientierung und Größe des Ausgangsmaterials, zum anderen verschiedene Medien mit unterschiedlichen Verfestigungsmitteln und verschiedene Kulturbedingungen wie Belichtung und Temperatur untersucht. Zur Erfassung der Effizienz der verschiedenen Bedingungen wurden die Regenerationsrate sowie die Anzahl regenerierter PLBs pro Explantat erfasst (Kap. 2.3.2.).

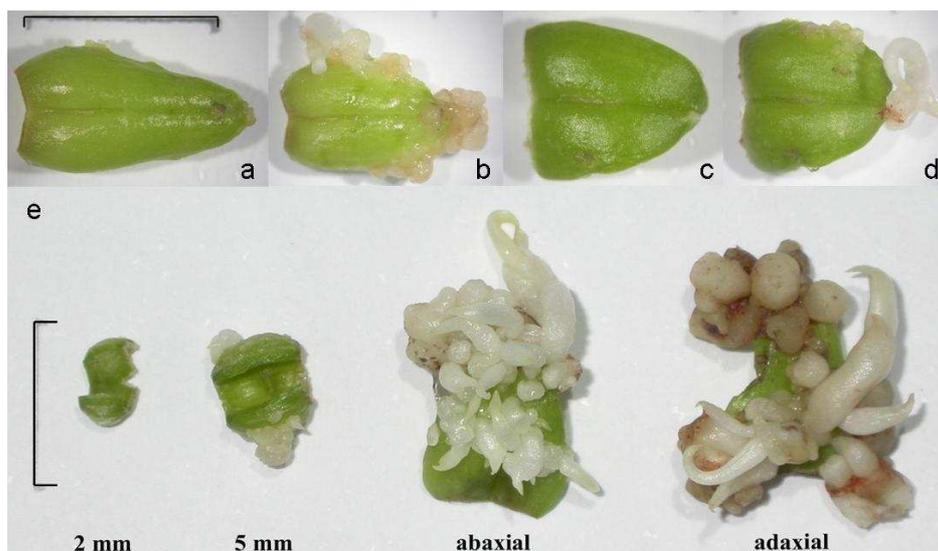
Bei der Ermittlung der optimalen Kulturbedingungen wurden 1 cm lange Blattspitzen verwendet. Zunächst wurde die Belichtung untersucht. Entsprechend den Angaben von CHEN ET AL. (1999) wurden die Blattexplantate anfänglich bei einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden kultiviert. Da bei diesem Licht/Dunkel-Rhythmus keine Regeneration stattfand, wurde versucht, eine PLB-Induktion im Dunkeln zu erzielen. Der Verzicht auf Licht in der Anfangsphase führte zu sehr guten Regenerationsraten, weshalb die Blattexplantate für zwei bis drei Monate (bis zur Induktion der ersten PLBs) im Dunkeln kultiviert und erst dann in den Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden überführt wurden. Auch der Vergleich der Qualität der regenerierten PLBs in den verschiedenen Temperaturstufen zeigte eindeutig ein besseres Wachstum unter 20°C im Vergleich zu 24°C.

Zur Untersuchung des Einflusses der Gelierungsmittel Agar und Gelrite im TDZ-haltigen Medium auf die Effizienz der Bildung von PLBs wurden als Ausgangsmaterial 1 cm lange Blattspitzen verwendet. Sowohl bei der Regenerationsrate als auch bei der mittleren Anzahl Embryonen pro Explantat ließen sich beim mit Gelrite verfestigten Medium höhere Werte erzielen als bei der Verwendung von Agar. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  erwies sich der Einfluss des Verfestigungsmittels im Medium als signifikant (Abb. 3.8).



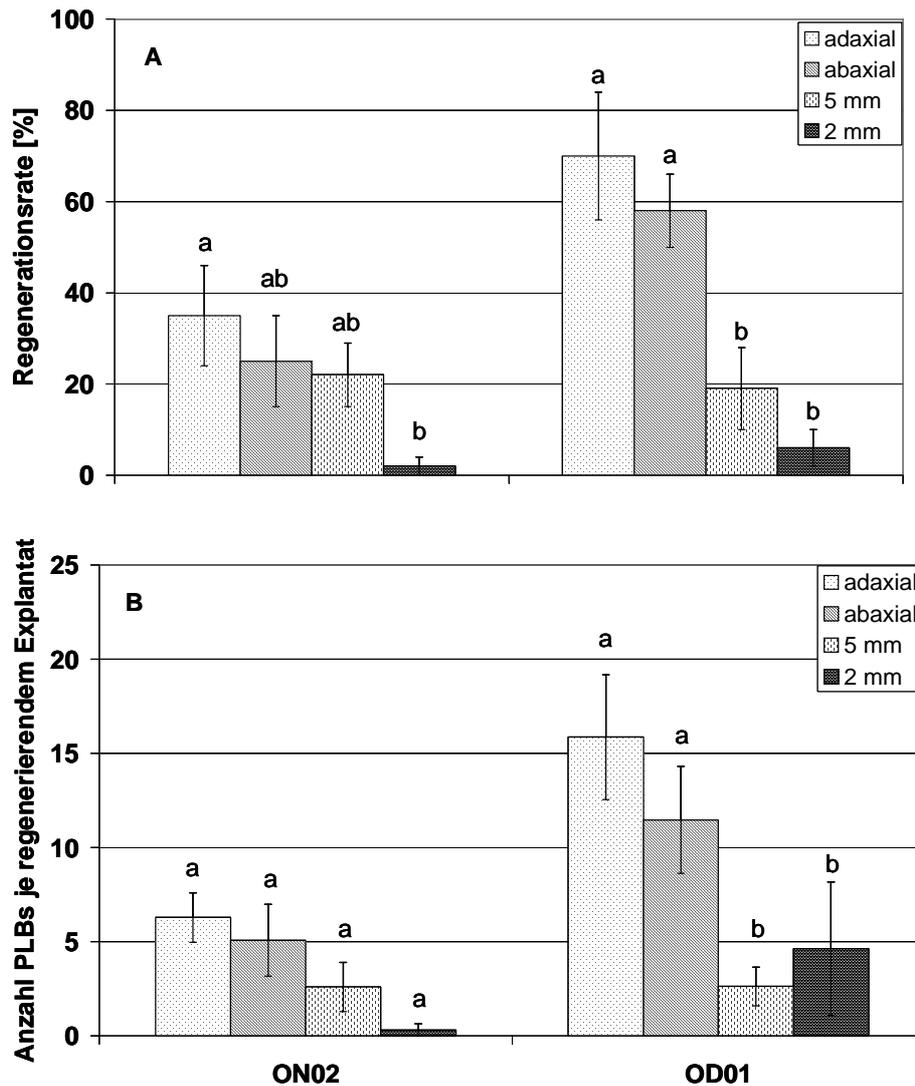
**Abb. 3.8:** Regenerationsrate und mittlere Anzahl PLBs pro Explantat (1 cm Blattspitze) von ON02 auf Gelrite (T1G) und Agar (T1A) nach 90 Tagen. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Für eine optimale Regenerationsrate ist das Ausgangsmaterial von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurden zum einen die Orientierung und zum anderen die Größe des Ausgangsmaterials bei ON02 und OD01 untersucht. Bei der Orientierung wurde zwischen adaxialer und abaxialer Auflage aufs Medium von 1 cm langen Blattspitzen unterschieden, bei der Größe und Art der Explantate zwischen 2 und 5 mm breiten Blattstreifen und 1 cm langen Blattspitzen (Abb. 3.9e).



**Abb. 3.9:** Induktion von PLBs bei zwei verschiedenen Blattspitzen von ON02 in Dunkelheit bei 20°C nach acht Wochen (a und c) und nach drei Monaten Kultur (b und d). Vergleich der Orientierung und Größe der Blattexplantate von ON02 nach drei Monaten (e). Die Balken stellen einen cm - Größenstandard dar. *adaxial*: adaxial aufgelegte 1 cm Blattspitzen, *abaxial*: abaxial aufgelegte 1 cm lange Blattspitzen, *5 mm*: 5 mm breite Blattstreifen, *2 mm*: 2 mm breite Blattstreifen.

Die Untersuchung der Orientierung zeigte bei den adaxial aufgelegten Blattspitzen von ON02 jeweils an den Spitzen der Blätter und nicht an den Schnittkanten sowohl die höchste Regenerationsrate als auch die größte Anzahl an PLBs (Abb. 3.9, Abb. 3.10). Die Regenerationsrate unterschied sich allerdings nicht signifikant von der bei den abaxial aufgelegten Blattspitzen und den 5 mm Blattstreifen erzielten. Auch bei der Anzahl PLBs waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Explantaten zu ermitteln.



**Abb. 3.10:** Einfluss der Explantatart, -größe und -Orientierung auf die Regenerationsrate (A) und mittlere Anzahl PLBs je regenerierendem Explantat (B) von ON02 und OD01 auf T1G (Tab. 2.7) nach 90 Tagen. *adaxial*: adaxial aufgelegte 1 cm lange Blattspitzen, *abaxial*: abaxial aufgelegte 1 cm lange Blattspitzen, *5 mm*: 5 mm breite Blattstreifen, *2 mm*: 2 mm breite Blattstreifen. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich nach dem Bonferroni-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  innerhalb der Genotypen signifikant.

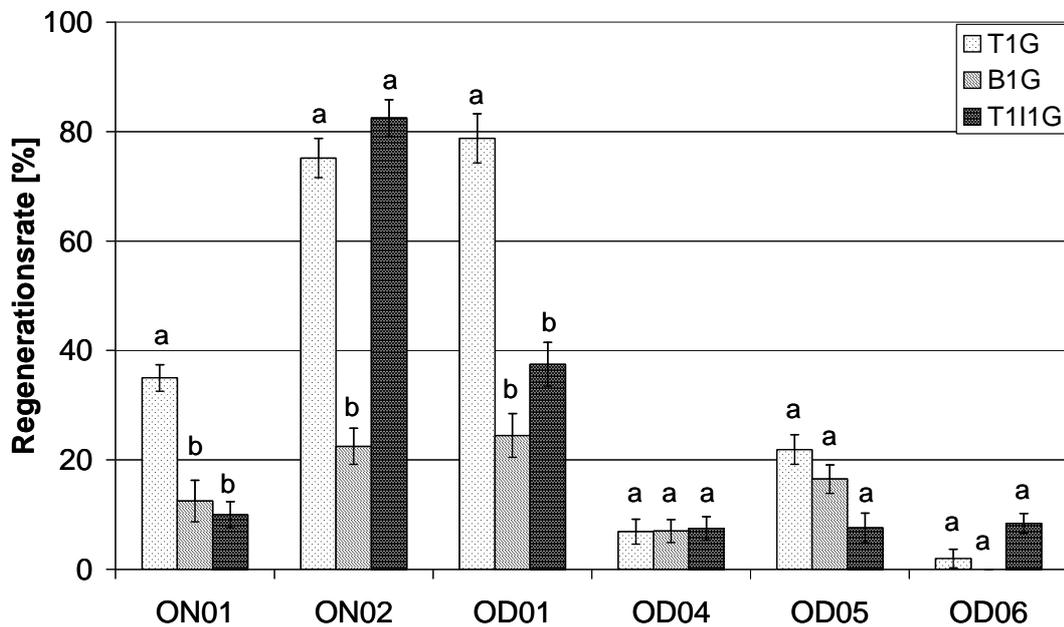
Bei OD01 wurden bei den 1 cm Blattspitzen sowohl die höchsten Regenerationsraten als auch mit bis zu 15,9 PLBs die größte Anzahl regenerierter PLBs beobachtet (Abb. 3.9, Abb. 3.10). Die Werte der Blattspitzen unterschieden sich signifikant von jenen der 2 und 5 mm Blattstreifen. OD01 wies mit 70 % regenerierender Explantate eine doppelt so hohe Rate im Vergleich zu 35 % bei ON02 auf. Auch bei der Anzahl an regenerierenden PLBs je Explantat waren die 1 cm langen Blattspitzen - adaxial und abaxial auf das Medium aufgelegt - von OD01 deutlich denen von ON02 überlegen. Bei beiden Genotypen konnte eine beinahe identische Rangfolge für die Orientierung und Größe der Explantate beobachtet werden: auf die adaxial aufgelegten Blattspitzen folgten die abaxial aufgelegten und die 5 mm breiten Blattstreifen. Die niedrigste Regenerationsrate und Anzahl an PLBs je Explantat wiesen die 2 mm breiten Blattstreifen auf. Nur bei der Anzahl PLBs war diese Reihenfolge bei OD01 bei den Blattstreifen vertauscht.

Aufgrund der guten Regenerationsrate und der hohen Anzahl PLBs der adaxial aufgelegten 1 cm langen Blattspitzen wurde diese Explantatart auch für die weiteren Versuche zur Untersuchung der verschiedenen Medien hinsichtlich ihrer Effizienz zur Induktion von PLBs herangezogen.

Bei der Regeneration von PLBs wurden zwischen den verschiedenen Genotypen und den untersuchten Medien große Unterschiede in der Effizienz festgestellt (Abb. 3.11). Die Regenerationsraten variierten zwischen den verschiedenen Genotypen sehr stark. Die beste Regeneration wiesen ON02 und OD01 mit bis zu 83 %, bzw. 79 % auf, gefolgt von ON01 mit bis zu 35 % und OD05 mit bis zu 22 %. Die Genotypen OD04, und OD06 waren durch sehr schwache Regenerationsraten von maximal 8 % gekennzeichnet.

Zwischen den untersuchten Medien konnten teilweise signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.11). Kein Medium erzielte bei allen Genotypen die höchste Regenerationsrate, und es zeigten sich auch Unterschiede innerhalb der beiden Gattungen *Oncidium* und *Odontoglossum*. ON01, OD01 und OD05 regenerierten am besten auf dem Medium mit 4,5  $\mu$ M TDZ (T1G), während die zusätzliche Zugabe von 5,7  $\mu$ M IAA (T1I1G) bei ON02 und OD06 die Regeneration verbessern konnte. Das Medium B1G (4,4  $\mu$ M BAP) wies bei OD04 und OD05 eine ähnlich gute Regeneration von PLBs auf wie die beiden Alternativmedien. Bei ON01 war das Medium B1G am zweitbesten geeignet, während die restlichen Genotypen auf B1G im Vergleich zu T1G und T1I1G wenige bis gar keine PLBs bildeten (Abb. 3.11).

Da auf dem Medium T1G bei den meisten Genotypen die höchsten Regenerationsraten erzielt wurden, wurde dieses Medium für die weiteren Versuche verwendet.



**Abb. 3.11:** Einfluss der Medien T1G, B1G und T1I1G (Tab. 2.7) auf die Regenerationsraten an Blattspitzen der Genotypen ON01, ON02, OD01, OD04, OD05 und OD06 nach 90 Tagen. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  innerhalb der Genotypen signifikant.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Regeneration ist auch die mittlere Anzahl an regenerierten PLBs je Explantat. Wiederum waren sowohl zwischen den Genotypen als auch bei den Medien Unterschiede festzustellen (Abb. 3.12). Die größte Anzahl an PLBs je regenerierendem Explantat konnte auf dem Medium T1G beobachtet werden, ausgenommen bei den beiden Genotypen OD04 und OD06. Als Spitzenreiter erwies sich hierbei OD01 mit bis zu 10,9 PLBs je Blattspitze, gefolgt von ON02, OD05 und ON01 mit jeweils 8,4, 4,7 und 2,9 PLBs. Die beiden Genotypen OD04 und OD06 ließen zusätzlich zu geringen Regenerationsraten auch eine niedrige Anzahl an regenerierten PLBs je Explantat beobachten. Bei OD04 regenerierten auf B1G im Schnitt 1,2 PLBs und bei OD06 auf T1I1G 0,3 PLBs je regenerierendem Explantat.

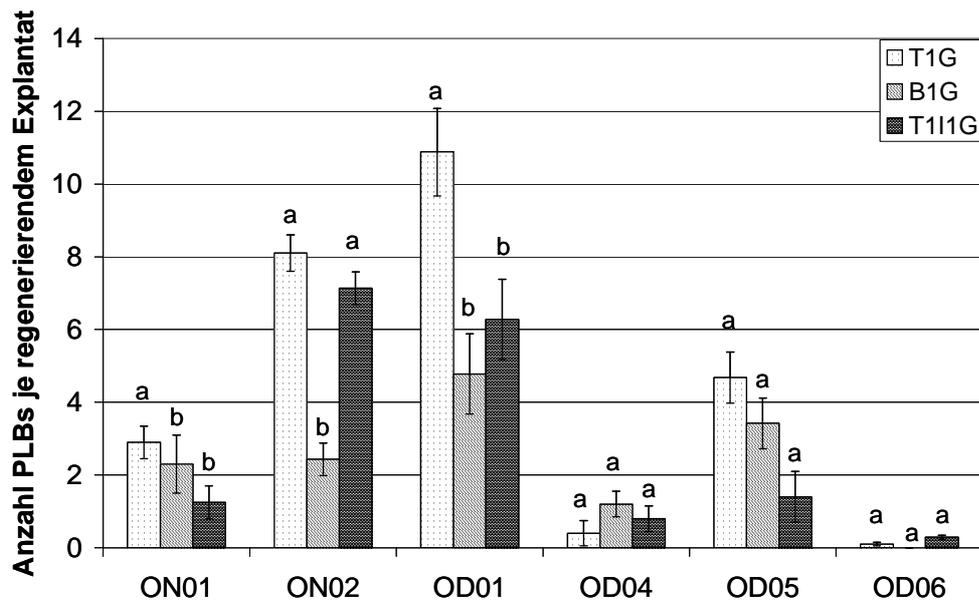


Abb. 3.12: Einfluss der Medien T1G, B1G und T1I1G (Tab. 2.7) auf die mittlere Anzahl PLBs je regenerierendem Explantat der Genotypen ON01, ON02, OD01, OD04, OD05 und OD06 bei der Regeneration von Blattspitzen nach 90 Tagen. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  innerhalb der Genotypen signifikant.

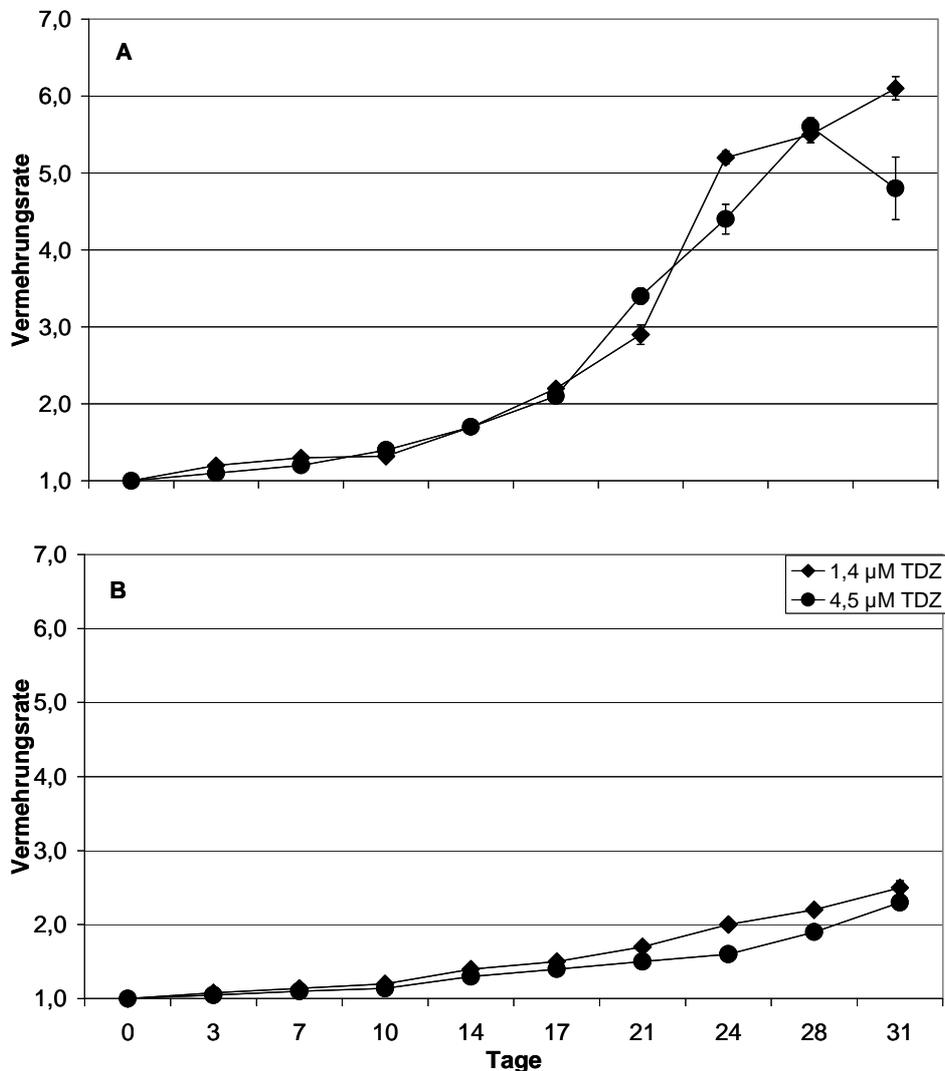
### 3.2.5 Regeneration von Sprossen aus der Flüssigkultur

Für die Flüssigkultur wurden die aus Blattmaterial regenerierten PLBs verwendet, die mit einem Skalpell zerkleinert wurden. Anschließend wurden 0,5 g Frischmasse an zerkleinerten PLBs in 20 ml Flüssigmedium in Weithalslerlenmeyerkolben auf einem permanent laufenden Schüttler kultiviert.

Die Untersuchung der Regeneration von PLBs in Flüssigkultur erfolgte für *Oncidium* mit ON02 und für *Odontoglossum* mit OD01. Anhand dieser beiden Genotypen wurden zweimal wöchentlich die Frischmasse und die Trockenmasse bei den Medien mit 1,4  $\mu\text{M}$  TDZ (T03) und 4,5  $\mu\text{M}$  TDZ (T1) erfasst. Ziel dieser Untersuchung war dieses Regenerationssystem später bei einem *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer zu verwenden.

Zwischen den Wiederholungen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, weshalb die Ergebnisse in einer Grafik zusammengefasst wurden. Da die Versuche einen sehr ähnlichen Verlauf und damit sehr ähnliche Daten aufwiesen, sind die Standardabweichungen in den Grafiken kaum bis gar nicht zu erkennen.

Die in Abb. 3.13 dargestellten Vermehrungsraten ergeben sich aus der zweimal wöchentlichen Ermittlung der Frischmasse, die auf das Ausgangsgewicht von 0,5 g zu Beginn des Versuches bezogen wurde.



**Abb. 3.13:** Einfluss der Medien T03 (1,4 µM TDZ) und T1 (4,5 µM TDZ) auf die Vermehrungsrate von PLBs der Genotypen ON02 (A) und OD01 (B) in Flüssigkultur bezogen auf die Frischmasse. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen bei ON02 und aus zwei unabhängigen Versuchen bei OD01.

Bei der Zunahme an Frischmasse ließen sich zwischen den beiden verwendeten Medien T03 und T1 sowohl bei ON02 als auch bei OD01 keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abb. 3.13). Zwischen den beiden Genotypen wurden jedoch signifikant unterschiedliche Entwicklungen der Vermehrungsraten beobachtet. Während bei ON02 nach dem 10. Tag des Versuches die exponentielle Phase der Vermehrung begann, war bei OD01 eher ein linearer Anstieg zu verzeichnen. Am 28. Tag des Versuches erreichte ON02 beim Medium T1 den Höhepunkt der Vermehrung und ging in die stationäre Phase über, während bei T03 bis zum

Ende des Versuches immer noch eine positive Entwicklung der Vermehrung festzustellen war. Bei OD01 hingegen war bis zum letzten Tag des Versuches ein leichter Anstieg in der Vermehrungsrate zu beobachten.

Der prozentuale Anteil an Trockenmasse zeigt bei beiden Genotypen ON02 und OD01 Veränderungen im Verlauf der Kultur der PLBs (Tab. 3.2). Zunächst wurde ein exponentieller Zuwachs an Trockenmasse ermittelt, der bei ON02 nach 14, bzw. 10 Tagen entsprechend der Medien T03 und T1 seinen Höhepunkt erreichte. Bei OD01 wurde nach 24, bzw. 21 Tagen der höchste Trockenmassegehalt erreicht. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Vermehrungsraten der Frischmasse, bei dem auch ON02 vor OD01 den höchsten Punkt der Wachstumskurve erreichte. Nach den jeweiligen Höhepunkten im prozentualen Zuwachs an Trockenmasse erfolgte ein Absinken der Werte.

Während die Werte der prozentualen Anteile an Trockenmasse sich bei beiden Genotypen kaum unterschieden (Tab. 3.2), zeigten sie dennoch einen sehr unterschiedliche Verlauf bei den Vermehrungsraten (Abb. 3.13).

**Tab. 3.2: Einfluss der Medien T03 (1,4  $\mu$ M TDZ) und T1 (4,5  $\mu$ M TDZ) auf den prozentualen Anteil an Trockenmasse (% TM) von ON02 und OD01.** Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen bei ON02 und aus zwei unabhängigen Versuchen bei OD01.

		Tage									
		0	3	7	10	14	17	21	24	28	31
<b>ON02</b>	T03 TM [%]	5,78	8,34	9,41	14,31	14,81	12,5	11,46	6,92	6,78	6,39
	T1 TM [%]	6,13	8,57	9,06	13,22	12,52	11,21	9,65	7,51	7,38	6,37
<b>OD01</b>	T03 TM [%]	3,53	5,10	9,72	11,33	11,80	12,53	12,66	13,00	11,90	11,31
	T1 TM [%]	3,49	5,93	8,72	11,31	11,49	11,49	13,13	12,75	11,50	11,45

Der Vergleich der Vermehrungsraten ließ sowohl bei der Frischmasse als auch beim prozentualen Anteil an Trockenmasse keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Medien T03 und T1 erkennen (Abb. 3.13, Tab. 3.2). Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Versuche zur Untersuchung der Selektionsbedingungen und die Transformationsversuche das Medium mit der geringeren Konzentration an TDZ (T03) verwendet. Das Medium T03 wurde sowohl für die Regeneration von *Oncidium* ON01 und ON02 als auch von den *Odontoglossum*-Hybriden OD01 und OD04 herangezogen. Die PLBs in Flüssigkultur wurden alle drei Wochen subkultiviert, da sie sich dort gemäß der

Vermehrungskurve in der exponentiellen Phase befanden und auch der prozentuale Anteil an Trockenmasse sehr hoch war (Tab. 3.2).

Die Regeneration der zerkleinerten PLBs aus der Flüssigkultur zu Sprossen war ein wichtiger Schritt für die Etablierung des Transformationssystems, da nämlich nicht nur Blattspitzen, sondern auch zerkleinerte PLBs aus der Flüssigkultur nach mehrtägiger Vorkultur zur Transformation herangezogen wurden. Die Regeneration erfolgte auf dem Basismedium nach MURASHIGE & SKOOG (1962) mit 0,4 % Gelrite ohne jegliche Hormonzusätze. Die Effizienz dieses Mediums wurde in der Diplomarbeit von KLEIN (2007) untersucht. In seiner Untersuchung regenerierten auf dem mit Gelrite verfestigten Medium bis zu 75 Sprosse pro 0,2 g bei ON02 und bis zu 34 Sprosse pro 0,2 g bei OD01.

### **3.3 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Gentransfer**

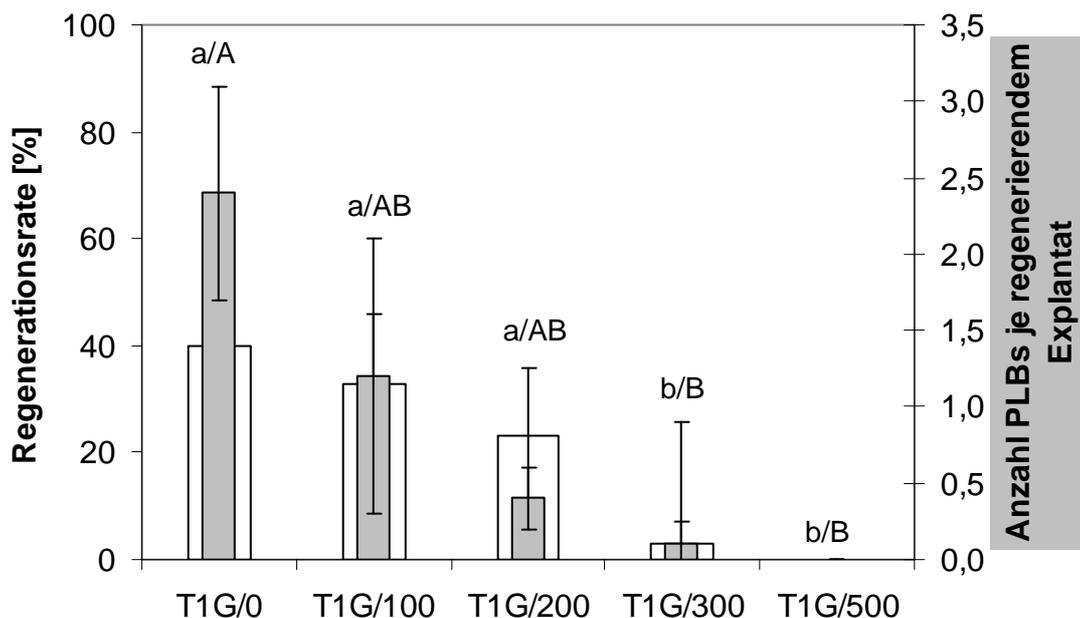
#### **3.3.1 Selektionsbedingungen**

Um eine effektive Selektion transgener Zellen bei gleichzeitiger Eliminierung nicht-transgener Zellen zu gewährleisten, wurde die geeignete Konzentration des selektiven Agens Kanamycin ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Selektion das Markergen *nptII*, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin bewirkt, verwendet. Reguliert wurde *nptII* durch einen *nptII* nos-Promotor. In dieser Arbeit wurden zur Etablierung eines effizienten Transformationssystems verschiedene Transformationsprotokolle mit unterschiedlichem Ausgangsmaterial verwendet. Aus diesem Grund wurde die geeignete Konzentration sowohl für die Transformation der Blattspitzen und PLBs auf festem Medium als auch der PLBs in Flüssigmedium ermittelt.

Bei der Untersuchung der geeigneten Konzentration an Kanamycin wurden bei den Blattspitzen von ON02 die Regenerationsrate und die Anzahl PLBs (Kap. 2.3.4) als Bewertungskriterien nach 60 Tagen Kultur im Dunkeln herangezogen. Beim Vergleich der Regenerationsraten auf den Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Kanamycin zeigte sich sehr deutlich eine Abnahme an regenerierenden Explantaten bei zunehmender

Konzentration an selektivem Agens (Abb. 3.14). Dies konnte durch den signifikanten Unterschied zwischen 0, 100 und 200 zu 300 und 500 mg/l Kanamycin statistisch belegt werden. Auch bei der Anzahl PLBs je regenerierendem Explantat konnte mit zunehmender Konzentration an Kanamycin eine deutliche Abnahme an regenerierenden PLBs verzeichnet werden. Die Regenerationsraten der PLBs auf Medium mit 300 und 500 mg/l Kanamycin unterschieden sich signifikant von der Kontrolle (T1G/0, Tab. 2.12). Allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede von 100 und 200 mg/l Kanamycin zu 0, 300 und 500 mg/l Kanamycin.

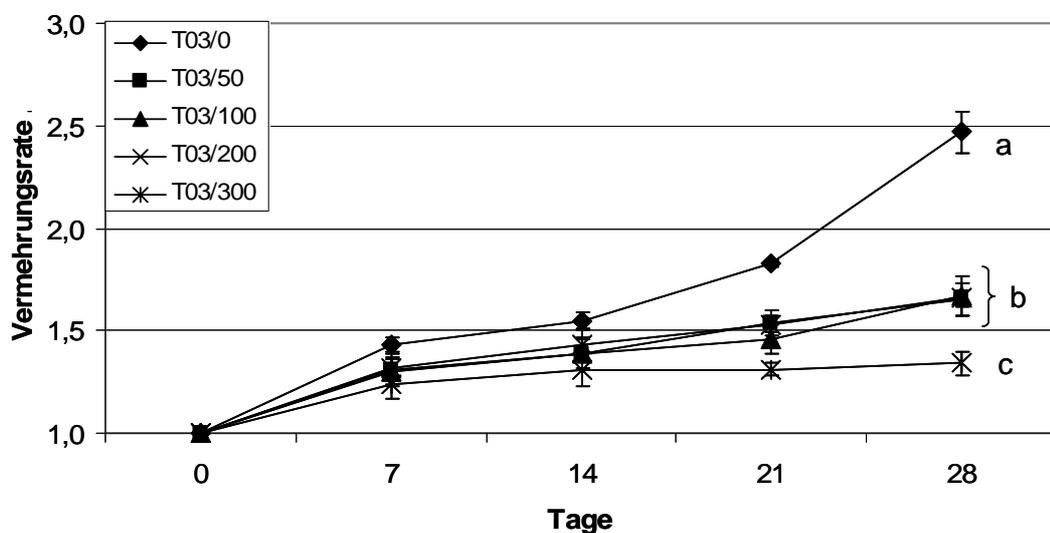
Die Konzentration von 300 mg/l Kanamycin im Medium wies das gewünschte Ergebnis auf (Abb. 3.14). Sowohl die Regenerationsrate als auch die Anzahl an PLBs je regenerierendem Explantat war deutlich eingeschränkt und trotzdem blieben die Blattspitzen vital. Aus diesem Grund wurde das Medium T1G/300 für die weiteren Transformationsversuche bei der Selektion eingesetzt.



**Abb. 3.14: Einfluss von Kanamycin auf die Regenerationsrate und die Anzahl PLBs je regenerierendem Explantat von 1 cm langen Blattspitzen des Genotyps ON02 nach 60 Tagen im Dunkeln.** Medien: Zugabe von 0 bis 500 mg/l Kanamycin (T1G/0 bis T1G/500, Tab. 2.12). Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus einem Versuch mit jeweils 30 Blattspitzen. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Balken unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant. Die kleingeschriebenen Buchstaben beziehen sich auf die Regenerationsrate, die großgeschrieben auf die Anzahl PLBs je regenerierendem Explantat.

Bei der Ermittlung der geeigneten Konzentration an Kanamycin bei den zerkleinerten PLBs von OD01 in Flüssigkultur als Ausgangsmaterial für die Transformation wurde die Vermehrungsrate bezogen auf die Frischmasse dieser PLBs als Bewertungskriterium herangezogen (Kap. 2.3.5). Die Vermehrungsraten stiegen bei allen verwendeten Konzentrationen an Kanamycin im Medium bis zum Tag sieben an, danach gab es deutliche Unterschiede in der Wachstumskurve zu beobachten (Abb. 3.15). Während die Kontrolle (T03/0) nach vier Wochen eine Vermehrungsrate von 2,5 aufwies, fielen die Raten der Medien mit 50, 100 und 200 mg/l Kanamycin (Tab. 2.12) deutlich niedriger, aber mit 1,7 gleich aus. Bei einer Konzentration von 300 mg/l Kanamycin im Medium konnte mit einer Vermehrungsrate von 1,3 nach vier Wochen wiederum ein geringerer Wert verzeichnet werden, der sich signifikant von den anderen Medien unterschied.

Die Konzentration von 300 mg/l Kanamycin im Medium führte auch bei der Kultur in Flüssigmedium zum gewünschten Ergebnis (Abb. 3.15). Die Vermehrungsrate der PLBs war deutlich eingeschränkt und trotzdem blieb ein Teil vital. Aus diesem Grund wurde das Medium T03/300 für die weiteren Transformationsversuche zur Selektion eingesetzt.



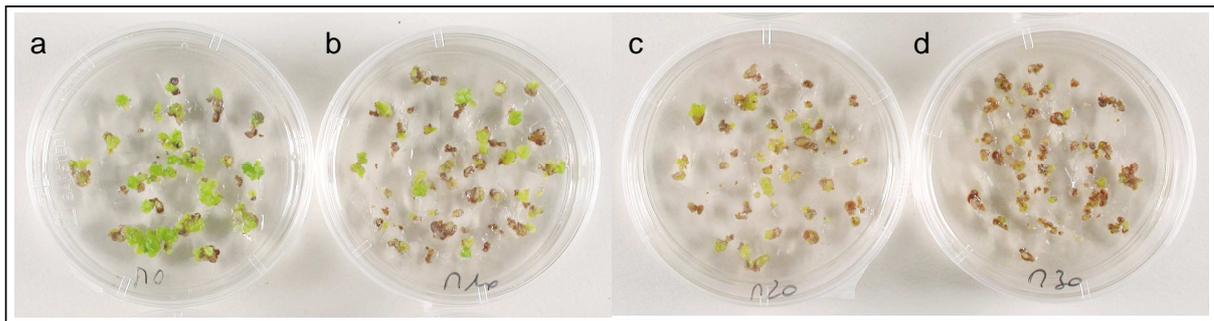
**Abb. 3.15:** Einfluss von Kanamycin auf die Vermehrungsrate des Genotypen OD01 in Flüssigkultur bezogen auf die Frischmasse bei Verwendung der Medien mit 0 bis 300 mg/l Kanamycin (T03/0 - T03/300, Tab. 2.12). Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte am 28. Tag unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant.

Aufgrund der Übereinstimmung der optimalen Konzentration von 300 mg/l Kanamycin sowohl bei den Blattspitzen auf festem Medium als auch bei den zerkleinerten PLBs in Flüssigkultur, wurde diese Konzentration auch bei der Selektion transformierter PLBs auf festem Medium eingesetzt.

Zur Selektion wurde dem Medium das selektive Agens Kanamycin zugegeben. Als weitere Zugabe wurde dem Medium das Antibiotikum Cefotaxim hinzupipettiert, das ein Auswachsen von *A. tumefaciens* während der Kulturphase nach der Transformation verhindern sollte. Als Alternative wurde Timentin im Vergleich zu Cefotaxim untersucht.

Die dem hormonfreien Medium T0G (Kap. 2.3.5) zugegebenen Konzentrationen an Cefotaxim und Timentin sind Tab. 2.13 zu entnehmen. Die Konzentration an Kanamycin betrug 300 mg/l. Wie erwartet schnitt das Medium S1, die Kontrolle, am schlechtesten ab. Bereits nach drei Wochen waren die PLBs von *A. tumefaciens* überwachsen. Nach 15 Wochen waren auch zwei der sechs Petrischalen mit Medium S2 (250 mg/l Cefotaxim) mit *A. tumefaciens* überwachsen. Die restlichen vier Petrischalen zeigten bis zum Ende des Versuchs nach 6 Monaten kein Auswachsen des Bakteriums. Alle weiteren Kombinationen an Antibiotika im Medium zeigten kein Auswachsen von *A. tumefaciens*. Dieser Versuch zeigte demnach die gute antibakterielle Wirkung von Timentin. Bereits bei einer Konzentration von 250 mg/l (S4) konnte das Wachstum von *A. tumefaciens* gehemmt werden, während bei derselben Menge an Cefotaxim (S2) zwei der sechs Petrischalen ausfielen. Alle weiteren Medien (S3, S5-S9) zeichneten sich durch noch höhere Konzentrationen an Antibiotika aus. Demnach könnte ein Medium mit 250 mg/l Timentin aufgrund der guten Wirkung dem bisherigen Medium mit 500 mg/l Cefotaxim vorgezogen werden.

Kanamycin ist aufgrund seiner Eigenschaft als Antibiotikum ab dem Jahr 2008 in Europa als Selektionsgen nicht mehr zugelassen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auch eine Möglichkeit der positiven Selektion, die Selektionswirkung von Mannose, untersucht. Abb. 3.16 zeigt, dass mit zunehmender Konzentration an Mannose (0, 10, 20 und 30 g/l) im hormonfreien Medium T0G (Kap. 2.3.5), die Regeneration der zerkleinerten PLBs zu Sprossen eingeschränkt war. Die PLBs verfärbten sich zunehmend braun und starben ab. Daher wurde die Selektionswirkung bei einer Konzentration von 30 g/l Mannose im Medium als gut befunden und könnte für Transformationsversuche mit dem entsprechenden Vektor angewendet werden.



**Abb. 3.16:** Selektionswirkung von Mannose in den Konzentrationen 0 (a), 10 (b), 20 (c) und 30 g/l (d) bei PLBs von ON02 nach vier Wochen Kultur. Medium: T0G (Kap.2.3.5).

### 3.3.2 Transformation der Blattspitzen von *Oncidium* und *Odontoglossum*

Die Regeneration von PLBs aus Blattspitzen von *Oncidium* und *Odontoglossum* erzielte zum Teil sehr hohe Raten (Kap. 3.2.4), weshalb die Transformation dieser Blattspitzen als erstes Verfahren des Gentransfers untersucht wurde. Die Blattspitzen wurden für 1, 14 und 28 Tage vorkultiviert, da die Bildung von PLBs erst nach einem Monat begann. Zur Untersuchung der Effizienz dieser Transformationsmethode wurden die Blattspitzen zunächst mit EHA105 und dem Plasmid pIBGUS (Kap. 2.1.3) transformiert, da dieser Vektor das *gus*-Gen für den histochemischen GUS-Test beinhaltet und damit Aufschluss über einen möglichen Gentransfer und seine Effizienz liefern konnte.

Die Auswertung des histochemischen GUS-Tests ergab bei ON02 eine optimale Vorkultur von 14 Tagen, gefolgt von 28 Tagen (Tab. 3.3). Bei 14-tägiger Vorkultur wurden sowohl die meisten Explantate mit „spots“, den Bereichen mit GUS-Expression, als auch die höchste Anzahl an „spots“ je Explantat beobachtet. Die Auswertung des histochemischen GUS-Tests sechs Wochen nach der Transformation ließ bei allen Vorkulturen (1, 14 und 28 Tagen) mit 6,7 zu 5,3, 8,5 zu 8,1, bzw. 7,7 zu 7,2 „spots“ je Blattspitze höhere Werte als nach vier Wochen ermitteln. Aufgrund der guten Ergebnisse wurde die Vorkultur von 14 und 28 Tagen bei weiteren Versuchen mit anderen Vektoren beibehalten.

Bei OD01 waren einige Unterschiede in der Auswertung nach vier und sechs Wochen (Tab. 3.3) zu beobachten. So wurden die 14 und 28 Tage vorkultivierten Blattspitzen nach vier Wochen mit 71 % Explantaten mit „spots“ gleich gut bewertet und damit besser als die eintägige Vorkultur mit 58 %. Bei der Anzahl „spots“ je Blattspitze im Mittel lag jedoch die 28-tägige Vorkultur mit 9,5 „spots“ vor den anderen beiden Behandlungen, unterschied sich jedoch nur von der eintägigen Vorkultur signifikant. Sechs Wochen nach der Transformation

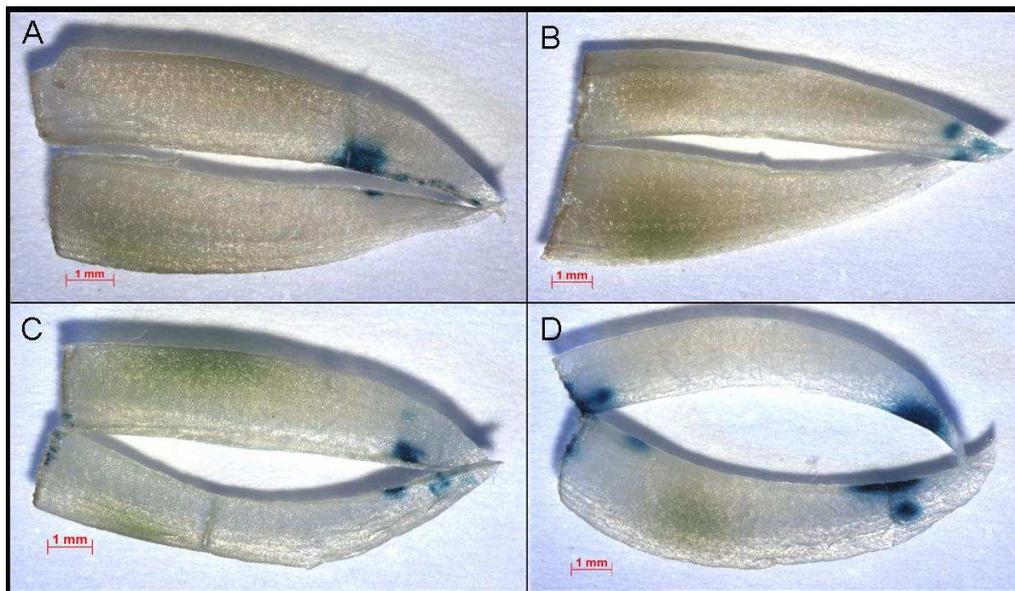
wurden bei der eintägigen Vorkultur überraschenderweise mehr Explantate mit GUS-Expression beobachtet als bei der 14- und 28-tägigen Vorkultur. Bei der Anzahl an „spots“ je Blattspitze im Mittel hingegen konnte die Vorkultur von 14 Tagen mit 9,6 „spots“ als beste Vorkulturdauer bewertet werden. Auch bei OD01 wurde aufgrund der guten Ergebnisse nach vier Wochen die Vorkultur von 14 und 28 Tagen für die weiteren Transformationsversuche beibehalten.

**Tab. 3.3: Auswertung des histochemischen GUS-Tests der Transformation von Blattspitzenexplantaten von ON02 und OD01 mit EHA105 und pIBGUS vier und sechs Wochen nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte eines Versuches mit  $n = 24$  und die Standardabweichungen der Anzahl „spots“ je Blattspitze (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als spots werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet. Die Anzahlen „spots“ pro Blattspitze, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant.

Vorkultur [Tage]	4 Wochen nach Transformation			6 Wochen nach Transformation		
	1	14	28	1	14	28
<b>ON02</b>						
Explantate mit „spots“ [%]	67	71	56	27	39	34
Anzahl „spots“ je Blattspitze (gemittelt über die Explantate mit „spots“)	$5,3 \pm 1,4^a$	$8,1 \pm 4,0^a$	$7,2 \pm 2,8^a$	$6,7 \pm 2,1^a$	$8,5 \pm 3,6^a$	$7,7 \pm 2,4^a$
<b>OD01</b>						
Blätter mit spots [%]	58	71	71	34	27	22
Anzahl „spots“ je Blattspitze (gemittelt über die Explantate mit „spots“)	$3,8 \pm 1,0^a$	$7,7 \pm 4,1^{ab}$	$9,5 \pm 3,2^b$	$3,5 \pm 1,2^a$	$9,6 \pm 3,6^a$	$6,8 \pm 2,8^a$

Die Abbildungen des histochemischen GUS-Tests von ON02 (Abb. 3.17) zeigten die Lokalisierung der GUS-positiven Zellen genau an den Blattspitzen. Da an den Blattspitzen auch vorwiegend die Regeneration von PLBs stattfindet (Abb. 3.9) und damit die Regeneration von transgenen Zellen zu PLBs zu erwarten war, war dieses Ergebnis als sehr positiv für die weiteren Transformationsversuche zu bewerten.

In weiteren Transformationsversuchen von Blattspitzen wurden ON02 und OD01 mit den Agrobakterienstämmen EHA105, AGL0 und LBA4404 mit dem Vektor pBEO210 transformiert, der den mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* unter Kontrolle des blütenspezifischen Promotors *fbp* enthielt. Aus Mangel an Blattspitzen musste auf die parallele Transformation mit dem Reporter gen *gus* verzichtet werden. Aus diesem Grund konnte kein GUS-Test zur Überprüfung der Etablierung und Effizienz der Transformation angefertigt werden.



**Abb. 3.17: Histochemischer GUS-Test bei den Blattspitzen von ON02 vier Wochen nach der Transformation mit EHA105 und pIBGUS.** A: 1 Tag Vorkultur, B + C: 14 Tage Vorkultur, D: 28 Tage Vorkultur. Die Blaufärbung zeigt die Bereiche mit GUS-Expression („spots“).

Die Regeneration von PLBs aus transformierten Blattspitzen erfolgte erst nach einem halben Jahr und war damit sehr langwierig. Die Entwicklung von möglichen transgenen Sprossen erfolgte bei keiner der Blattspitzen auf Selektionsmedium, da die regenerierten PLBs nach Abtrennen von der Blattspitze und Auflegen der PLBs direkt auf das Selektionsmedium abstarben. Die aus den Blattspitzen regenerierten PLBs wurden daher nicht mit Hilfe von PCR-Technik auf Insertion des gewünschten Gens ins pflanzliche Genom überprüft. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde diese Transformationsmethode nicht weiter optimiert, sondern nach Alternativen (Kap. 3.3.3, Kap. 3.3.5) gesucht.

### 3.3.3 Transformation der PLBs von *Oncidium* und *Odontoglossum* auf Festmedium

Die Transformation von PLBs auf Festmedium stellte die zweite große Versuchsreihe als Alternative zu der Transformation von Blattspitzen dar. Auch hier war das Ausgangsmaterial, PLBs aus der Flüssigkultur, aus den Regenerationsversuchen mit Blattmaterial (Kap. 3.2.4) und die erfolgreiche Vermehrung dieser PLBs in Flüssigmedium (Kap. 3.2.5) in ausreichender Menge vorhanden.

Zunächst wurden die beiden Agrobakterienstämme EHA105 und LBA4404 mit den Vektoren pIBGUS und pBI121 (EHA/gus, LBA/gus und EHA/gus2, Kap. 2.1.3) mit dem Reporter-gen *gus* in Versuchen mit PLBs der Genotypen ON02 und OD01 (Tf1 bis Tf4, Tab. 2.8) verwendet. Die Dauer der Vorkultur von sieben Tagen orientierte sich an den Arbeiten von LIAU ET AL. (2003a, 2003b).

Die Auswertung des histochemischen GUS-Tests ließ bei ON02 bei allen Auswertungen einen deutlich höheren Anteil an GUS-positiven Explantaten beobachten (Tab. 3.4). Das Ergebnis von LBA/gus (LBA4404 mit pBI121) war mit einer GUS-Expression von 25 % nach sechs Monaten signifikant von der Kontrolle sowie den beiden Vektoren pBI121 (EHA/gus) und pIBGUS (EHA/gus2), bei denen der Agrobakterienstamm EHA105 verwendet wurde, verschieden. Demnach erzielte der Bakterienstamm LBA4404 beim Genotypen ON02 deutlich mehr GUS-positive PLBs und ließ damit auch höhere Transformationsraten erwarten.

Beim Genotypen OD01 hingegen unterschieden sich die verschiedenen Versuchsvarianten nicht signifikant (Tab. 3.4). Die Kontrolle und die mit der Kombination EHA/gus2 (EHA105 mit pIBGUS) transformierten Explantate ließen keine GUS-Expression beobachten. Jene PLBs, die mit dem Vektor pBI121 und den Agrobakterienstämmen EHA105 und LBA4404 (EHA/gus und LBA/gus) transformiert wurden, zeigten hingegen GUS-positive Zellen. Der prozentuale Anteil GUS-positiver Zellen war bei der Kombination LBA/gus etwas höher als bei EHA/gus. Damit erwies sich der Agrobakterienstamm LBA4404 auch bei OD01 als gut geeignet für die Transformation von PLBs auf Festmedium.

Während bei ON02 bis zum letzten GUS-Test nach sechs Monaten GUS-positive PLBs nachgewiesen werden konnten, war dies bei OD01 am letzten Auswertungstermin nicht mehr möglich. Insgesamt wurde jedoch ein Rückgang des Anteils von blau gefärbten Zellen bei beiden Genotypen im Verlaufe des Versuchs beobachtet (Tab. 3.4).

Im Anschluss an die Untersuchung der geeigneten Kombination von Agrobakterienstamm und Vektor wurden die PLBs mehrerer Genotypen im Vergleich transformiert. Für *Oncidium* wurden die Genotypen ON01 und ON02 und für *Odontoglossum* OD01 und OD04 untersucht. Zur Transformation wurde der Agrobakterienstamm LBA4404 mit den Plasmiden pBI121 (LBA/gus) und pBEO210 (LBA/etr, Kap. 2.1.3) aufgrund der guten Ergebnisse des histochemischen GUS-Tests verwendet.

**Tab. 3.4: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tf1 von PLBs auf Festmedium (Tf1 bis Tf4, Tab. 2.8) von ON02 und OD01 mit EHA105 und LBA4404 mit pBI121 (EHA/gus und LBA/gus, Tab. 2.11), bzw. EHA105 mit pIBGUS (EHA/gus2, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit  $n = 20$  und die Standardabweichungen der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet. Die Anzahlen „spots“ je Explantat, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant. Der histochemische GUS-Test der Wiederholung Tf2 befindet sich im Anhang (Tab. 6.8).

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		%	Anzahl „spots“ je Expl.	%	Anzahl „spots“ je Expl.	%	Anzahl „spots“ je Expl.
<b>OD01</b>	Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	EHA/gus	11 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	LBA/gus	43 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	3,3 ± 1,6 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	EHA/gus2	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>ON02</b>	Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	EHA/gus	80 <sup>b</sup>	10,9 ± 4,1 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
	LBA/gus	100 <sup>b</sup>	8,6 ± 4,0 <sup>b</sup>	39 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	2,6 ± 1,7 <sup>b</sup>
	EHA/gus2	67 <sup>b</sup>	7,1 ± 1,9 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>b</sup>

Bei der Auswertung des histochemischen GUS-Tests nach zwei und vier Monaten zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den transformierten PLBs von ON01, ON02, OD01 und OD04, während der prozentuale Anteil GUS-positiver PLBs zwischen den transformierten Genotypen sehr ähnlich war (Tab. 3.5). Nach sechs Monaten wurden hingegen signifikante Unterschiede der beiden Genotypen ON02 und OD01 verglichen mit ON01 und der Kontrollen beim prozentualen Anteil an GUS-positiven PLBs beobachtet. Während bei der Auswertung nach zwei und vier Monaten noch alle Genotypen ähnlich hohe GUS-Expressionen aufzeigten, nahm der prozentuale Anteil GUS-positiver Zellen im Verlauf des Versuches bei ON01 und OD04 deutlich ab bis nach sechs Monaten keine, bzw. nur noch eine 9 %-ige GUS-Expression nachgewiesen werden konnte. Die beiden Genotypen ON02 und OD01 erzielten nach sechs Monaten mit 23 %, bzw. 22 % positiv gestesteter PLBs eine sehr hohe GUS-Expression (Tab. 3.5).

**Tab. 3.5: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tf5 von PLBs auf Festmedium (Tf5 bis Tf8, Tab. 2.8) von ON01, ON02, OD01 und OD04 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit  $n = 20$  und die Standardabweichungen der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet. Die Anzahlen „spots“ je Explantat, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant. Der histochemische GUS-Test der drei Wiederholungen Tf6, Tf7 und Tf8 befindet sich im Anhang (Tab. 6.9, Tab. 6.10 und Tab. 6.11).

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>ON01</b>	Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>ON02</b>	Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>OD01</b>	Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>OD04</b>	Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>ON01</b>	LBA/gus	50 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	17 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>ON02</b>	LBA/gus	65 <sup>b</sup>	2,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	3,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	2,0 ± 1,0 <sup>a</sup>
<b>OD01</b>	LBA/gus	50 <sup>b</sup>	5,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	25 <sup>b</sup>	3,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	22 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
<b>OD04</b>	LBA/gus	55 <sup>b</sup>	3,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	2,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	9 <sup>ab</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>

Bei der Transformation von PLBs auf Festmedium wurde sechs Monate nach der Transformation eine Integration des gewünschten Gens ins pflanzliche Genom mittels PCR-Technik nachgewiesen (Tab. 3.6). Das Gen *etr1-1* wurde bei den Versuchen Tf1, Tf2, Tf3 und Tf4 (Tab. 2.8) erfolgreich ins Genom von ON02 mit einer Transformationseffizienz von 1,1 %, 0,6 %, 0,4 % und 0,1 % integriert. In vier der fünf transgenen Linien aus Tf1, Tf2 und Tf3 wurde die Kombination EHA/etr (EHA105 mit pBEO210) und bei der transgenen Linie aus Tf4 die Kombination LBA/etr (LBA4404 mit pBEO210) für die Transformation der PLBs verwendet. Das *gus*-Gen wurde nur beim Versuch Tf1 mit einer Transformationseffizienz von 2,2 % beim Genotypen ON02 nachgewiesen. Die dabei verwendete Kombination aus Agrobakterienstamm und Vektor war LBA/gus (LBA4404 mit pBI121). Eine Überprüfung der Insertion des *nptII*-Gens wurde durchgeführt und konnte erfolgreich nachgewiesen werden.

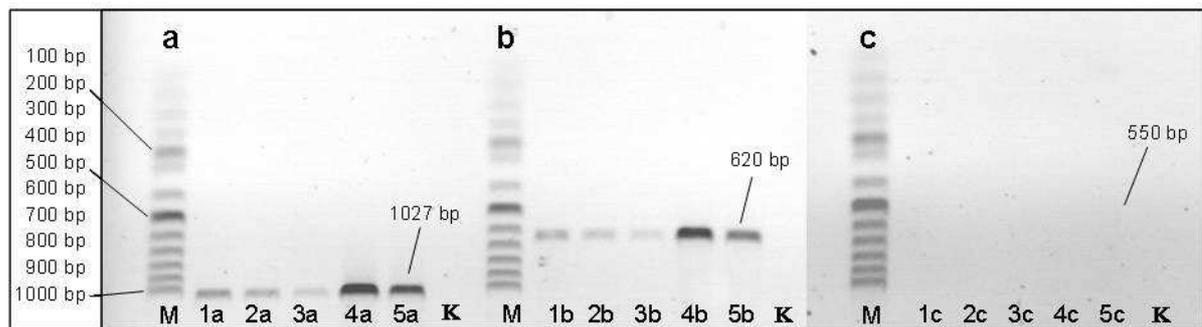
Die erfolgreiche Integration von *etr1-1* war bei den Versuchen Tf1, Tf2 und Tf3 mit Hilfe des Agrobakterienstamms EHA105 (EHA/etr) und beim Versuch Tf4 durch LBA4404 (LBA/etr) zu beobachten, wobei die Transformationseffizienz bei EHA/etr mit bis zu 1,1 % deutlich über dem Ergebnis von LBA/etr mit 0,1 % lag (Tab. 3.6). Das *gus* Gen wurde mit Hilfe des Vektors LBA/gus (LBA4404 mit pBI121) erfolgreich ins pflanzliche Genom integriert. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass der Agrobakterienstamm EHA105 für die Transformation des Plasmides pBEO210 (*etr1-1*) besser geeignet war, wohingegen für die

Übertragung des Vektors pBI121 der Agrobakterienstamm LBA4404 als erfolgreicher ermittelt wurde.

**Tab. 3.6: PCR-Nachweis der transgenen Linien (TL) und der Transformationseffizienz (TE) aus den Versuchen Tf1 bis Tf4 (Tab. 2.8) von ON02 und OD01 sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die durchschnittliche Anzahl eingesetzter PLBs (Anz. PLBs, Kap. 2.4.6), die Anzahl mit PCR getestete PLBs und jeweils die Anzahl transgener Linien (TL) und die Transformationseffizienz (TE) für die zwei Gene *etr1-1* und *gus*. Die Kombination Agrobakteriumstamm (Agro.-Stamm) und Vektor ist in Tab. 2.11 ersichtlich.

Versuch	Genotyp	Agro.-stamm + Vektor	Anz. PLBs	Anz. getest. PLBs	<i>etr1-1</i>		<i>gus</i>		
					TL	TE [%]	TL	TE [%]	
Tf1	ON02	EHA/etr	180	2	2	1,1	-	-	
		AGL0/etr	180	2	0	0,0	-	-	
		LBA/etr	180	4	0	0,0	-	-	
		EHA/gus	180	10	-	-	0	0,0	
		LBA/gus	180	2	-	-	4	2,2	
		EHA/gus2	180	0	-	-	-	-	
		OD01	EHA/etr	180	0	-	-	-	-
	AGL0/etr	180	0	-	-	-	-		
	LBA/etr	180	0	-	-	-	-		
	EHA/gus	180	0	-	-	-	-		
	LBA/gus	180	0	-	-	-	-		
	EHA/gus2	180	0	-	-	-	-		
	Tf2	ON02	EHA/etr	180	4	1	0,6	-	-
			AGL0/etr	180	1	0	0,0	-	-
LBA/etr			180	1	0	0,0	-	-	
EHA/gus			180	1	-	-	0	0,0	
LBA/gus			180	1	-	-	0	0,0	
EHA/gus2			180	0	-	-	-	-	
OD01			EHA/etr	180	0	-	-	-	-
AGL0/etr		180	0	-	-	-	-		
LBA/etr		180	0	-	-	-	-		
EHA/gus		180	0	-	-	-	-		
LBA/gus		180	1	-	-	0	0,0		
EHA/gus2		180	0	-	-	-	-		
Tf3		ON02	EHA/etr	240	2	1	0,4	-	-
			AGL0/etr	240	0	-	-	-	-
	LBA/etr		240	0	-	-	-	-	
	OD01	EHA/etr	240	0	-	-	-	-	
		AGL0/etr	240	0	-	-	-	-	
		LBA/etr	240	0	-	-	-	-	
Tf4	ON02	EHA/etr	1.080	9	0	0,0	-	-	
		AGL0/etr	1.080	7	0	0,0	-	-	
		LBA/etr	1.080	7	1	0,1	-	-	

Bei Untersuchung der *etr1-1*-transgenen Sprosse von ON02 mittels PCR-Analyse lieferten die spezifischen Primer für das Gen *etr1-1* ein Amplifikat von 1.027 bp, beim Nachweis von *nptII* ein Amplifikat von 620 bp und bei PCR-Amplifikation eines Agrobakterien-spezifischen Fragments keine Bande (Abb. 3.18). Dies lieferte den Nachweis der erfolgreichen Integration von *etr1-1* und *nptII* ins pflanzliche Genom, ohne Rückstände von *A. tumefaciens*. Das Primerpaar PicA (Tab. 2.5) für den Nachweis des Agrobakterien-spezifischen Hintergrundes wurde zuvor bereits bei den in dieser Arbeit verwendeten Agrobakterienstämme EHA105, LBA4404 und AGL0 mittels *colony* PCR positiv getestet.



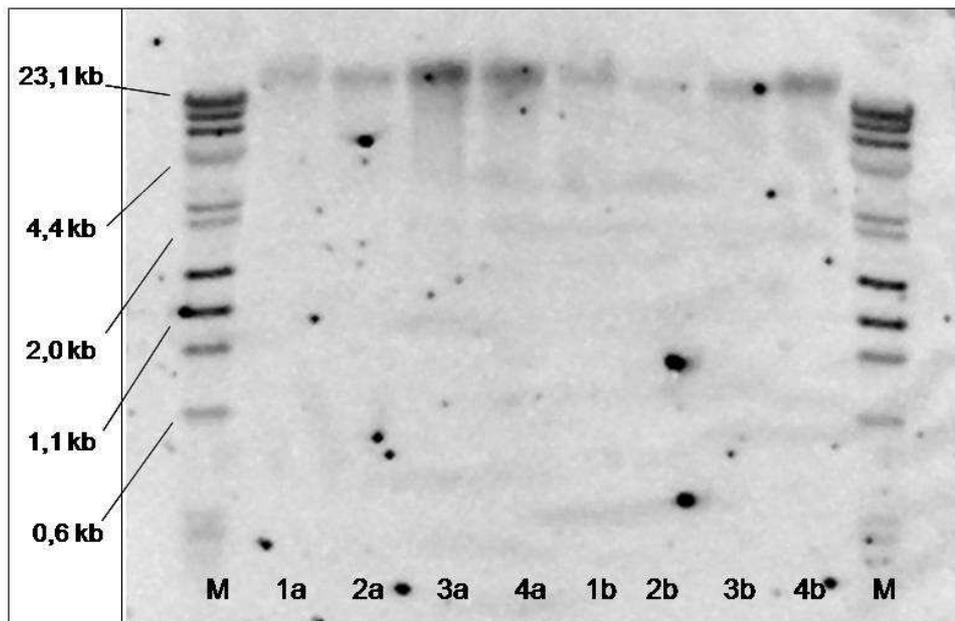
**Abb. 3.18: PCR-Analyse aus DNA-Proben potenziell transgener Sprosse von ON02 sechs Monate nach der Transformation.** a) PCR-Amplifikation des *etr1-1*-Fragments, b) PCR-Amplifikation des *nptII*-Fragments c) PCR-Amplifikation eines Agrobakterien-spezifischen Fragments. 1a,b,c: aus Versuch Tf1 (Tab. 3.6) mit EHA/etr (Tab. 2.11), 2a,b,c: aus Versuch Tf1 mit EHA/etr, 3a,b,c: aus Versuch Tf2 mit EHA/etr, 4a,b,c: aus Versuch Tf3 mit EHA/etr, 5a,b,c: aus Versuch Tf4 mit LBA/etr (Tab. 2.11).

Das Erscheinungsbild dieser fünf mittels PCR als transgen getesteten Linien zeigte sich entsprechend der nicht-transformierten PLBs normal, die PLBs wurden entsprechend der langen Entwicklungsdauer von *Oncidium* alle drei Monate subkultiviert. Am Ende der vorliegenden Arbeit maßen die transgenen Sprosse maximal einen Zentimeter, ein paar Ausnahmen sogar bis zu drei Zentimeter (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** Transgene Sprosse aus einem transformierten PLB aus Versuch Tf2 mit der Kombination EHA/etr (EHA105 mit pBEO210, Tab. 2.11) ein Jahr nach der Transformation. Der Becherrand hat einen Durchmesser von 11,5 cm.

Die Southern Blot-Analyse diente zum Nachweis der Integration des Transgens ins Pflanzengenom und der Untersuchung der Anzahl integrierter Genkopien im Genom. Die genomische DNA von *Oncidium* wurde mit den sechs Basenpaar Restriktionsenzymen *PstI* und *PshAI* verdaut, die eine singuläre Schnittstelle im Plasmid besitzen. Die untersuchten transgenen ON02-Linien aus den Versuchen Tf1, Tf3 und Tf4 (Tab. 2.8) zeigten eine erfolgreiche Integration des Transgens auf und konnten damit das PCR-Ergebnis aus Tab. 3.6 bestätigen (Abb. 3.20). Bei allen untersuchten Linien wurde das *etr1-1* Gen jeweils einmal integriert. Bei den Linien 1b bis 4b aus Abb. 3.20 deutete die leichte Variation der Banden in der Größe auf unterschiedliche Integrationsorte der T-DNA hin.

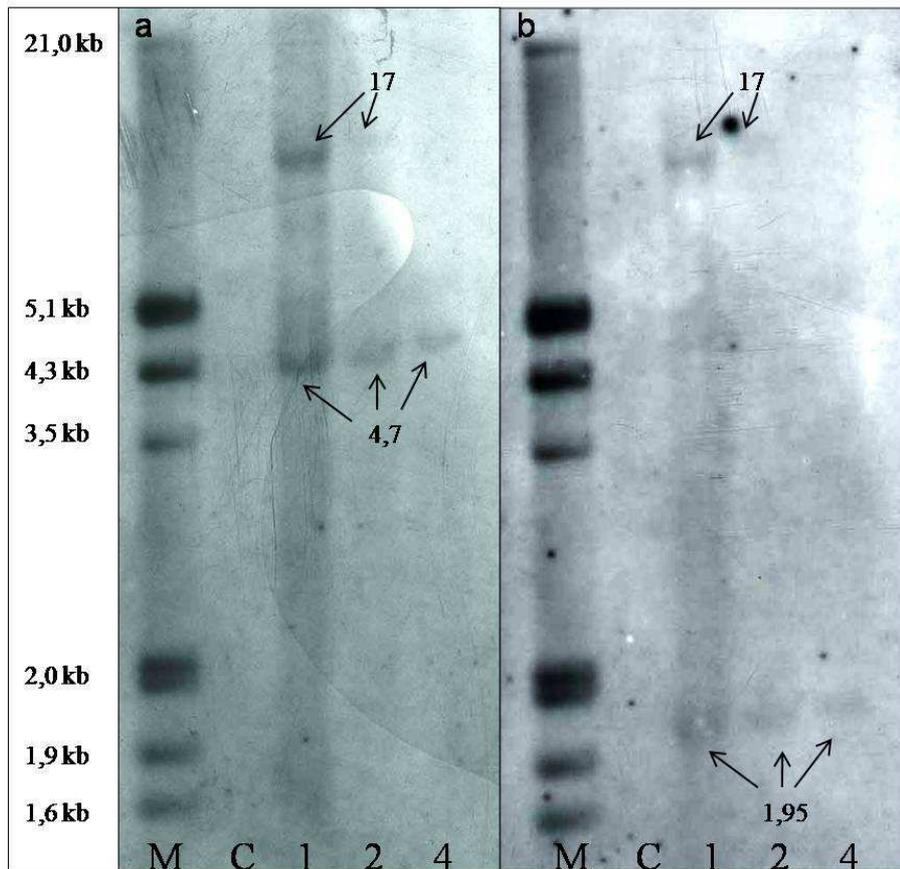


**Abb. 3.20:** Nachweis der Integration des *etr1-1*-Gens in die genomische DNA *etr1-1*-transgener ON02-Pflanzen mittels Southern Blot Analyse. a) Verdau der genomischen DNA mit *Pst*I, b) Verdau der genomischen DNA mit *Psh*AI, M: Marker, 1a,b: aus Versuch Tf1 (Tab. 3.6) mit EHA/*etr* (Tab. 2.11), 2a,b: aus Versuch Tf1 mit EHA/*etr*, 3a,b: aus Versuch Tf3 mit EHA/*etr*, 4a,b: aus Versuch Tf4 mit LBA/*etr* (Tab. 2.11).

Mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI wurde eine weitere Southern Blot Analyse durchgeführt (Abb. 3.21). Dabei wurde die verdaute DNA sowohl mit dem *etr1-1*-Gen als auch mit dem *nptII*-Gen detektiert. Dieser Southern Blot wurden mit den Sprossen 1, 2 und 4 aus Abb. 3.20 wiederholt.

Das Restriktionenzym *Bam*HI schnitt inmitten der Sonde, weswegen bei einer singulären Insertion der T-DNA des *etr1-1*-Gens eine Bande bei 4,7 kb und bei > 5,2 kb zu erwarten war. Die transgenen Sprosse 1 und 2 wiesen zusätzlich zu der Bande bei 4,7 kb eine Bande bei 17 kb auf (Abb. 3.21a). Der transgene Spross 4 zeigte nur eine Bande bei 4,7 kb auf und bei der untransformierten Kontrolle wurde kein Signal detektiert.

Die Southern Blot Analyse mit der *nptII*-Sonde zeigte die zu erwartenden Banden und damit dasselbe Bild wie zuvor mit der *etr1-1*-Sonde (Abb. 3.21b) und bestätigte damit das Ergebnis der Untersuchung.



**Abb. 3.21:** Nachweis der Integration des *etr1-1*-Gens (a) und des *nptII*-Gens (b) in die genomische DNA *etr1-1*-transgener ON02-Pflanzen mittels Southern Blot Analyse. M: Marker, C: Kontrolle, 1: aus Versuch Tf1 (Tab. 3.6) mit EHA/etr (Tab. 2.11), 2: aus Versuch Tf1 mit EHA/etr, 4a,b: aus Versuch Tf4 mit LBA/etr (Tab. 2.11).

Bei der Transformation von PLBs der Genotypen ON01, ON02, OD01 und OD04 auf Festmedium (Tf5 bis Tf8, Tab. 2.8) konnte die Integration des *etr1-1* Gens ins pflanzliche Genom mittels PCR-Technik nicht nachgewiesen werden (Tab. 3.7). Das Markergen *gus* hingegen wurde bei einigen Explantaten aus den Versuchen Tf5, Tf6, Tf7 und Tf8 erfolgreich ins Pflanzengenom integriert. Der Genotyp ON02 wurde mit einer Effizienz von bis zu 2,7 %, OD01 bis zu 1,3 % und OD04 bis zu 1,0 % beim Versuch Tf5, bzw. Tf6 mit dem *gus*-Gen transformiert. Wiederum wurde auch in dieser Versuchsreihe das *nptII*-Gen häufiger nachgewiesen. Einzig beim Genotypen ON01 regenerierten keine Sprosse und daher konnte keines der untersuchten drei Gene mittels PCR-Technik ermittelt werden.

**Tab. 3.7: Nachweis transgener Linien (TL) und der Transformationseffizienz (TE) mittels PCR-Technik bei vier Wiederholungen Tf5 bis Tf8 der Transformation auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON01, ON02, OD01 und OD04 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus), bzw. pBEO210 (LBA/etr) sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die durchschnittliche Anzahl eingesetzter PLBs (Anz. PLBs, Kap. 2.4.6), die Anzahl mit PCR getesteter PLBs und jeweils die Anzahl transgener Linien (TL) und die Transformationseffizienz (TE) für die zwei Gene *etr1-1* und *gus*. Die Kombination Agrobakteriumstamm (Agro.-Stamm) und Vektor ist in Tab. 2.11 ersichtlich.

Versuch	Genotyp	Agro.-stamm + Vektor	Anz. PLBs	Anz. getest. PLBs	<i>etr1-1</i>		<i>gus</i>	
					TL	TE [%]	TL	TE [%]
Tf5	ON01	LBA/gus	30	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	ON02	LBA/gus	300	11	-	-	8	2,7
		LBA/etr	300	2	-	-	-	-
	OD01	LBA/gus	300	9	-	-	4	1,3
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	OD04	LBA/gus	300	5	-	-	3	1,0
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
Tf6	ON01	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	ON02	LBA/gus	300	17	-	-	4	1,3
		LBA/etr	300	4	-	-	-	-
	OD01	LBA/gus	300	8	-	-	3	1,0
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	OD04	LBA/gus	300	10	-	-	3	1,0
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
Tf7	ON01	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	ON02	LBA/gus	300	16	-	-	1	0,3
		LBA/etr	300	1	-	-	-	-
	OD04	LBA/gus	300	4	-	-	1	0,3
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
Tf8	ON01	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	ON02	LBA/gus	300	3	-	-	1	0,3
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	OD04	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-

### 3.3.4 Vergleich der Transformation auf Fest- und in Flüssigmedium

Bei den weiteren Transformationsversuchen wurde die Transformation von PLBs in Flüssigkultur und auf Festmedium verglichen. Dabei wurden zunächst in den Versuchen Tfvsl1, Tfvsl2 und Tfvsl3 (Tab. 2.8) die Medienvarianten fest versus flüssig bei der Vorkultur, Kokultur und Selektion (Tab. 2.9) und die Effizienz der Agrobakterienstämme EHA105 und LBA4404 (EHA/gus, EHA/etr, LBA/gus, LBA/etr, Tab. 2.11) untersucht. In den Versuchen Tfvsl4 und Tfvsl5 (Tab. 2.8) wurden zusätzlich die Dichte (OD<sub>600</sub>) der Bakteriensuspension während der Inkubation und die Dauer der Kokultur von zwei bis drei Tagen variiert (Tab. 2.10). Es wurden für die Versuche Tfvsl4 und Tfvsl5 der Agrobakterienstamm LBA4404 mit den Plasmiden pBI121 und pBEO210 (LBA/gus und LBA/etr, Tab. 2.11) verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Transformationsversuche Tfvsl wurden zerkleinerte PLBs des *Oncidium*-Genotypen ON02 herangezogen.

Die Auswertung des histochemischen GUS-Tests zeigte bei den Kontrollen des Versuches Tfvsl1 (Tab. 2.8) keinerlei GUS-Expression (Tab. 3.8). Die Behandlung Tfvsl-D (Tab. 2.9), bei der die PLBs auf Festmedium vorkultiviert, kokultiviert und selektiert wurden, wies deutlich die höchste GUS-Expression auf. Bei EHA/gus betrug der prozentuale Anteil GUS-positiver PLBs nach sechs Monaten immer noch 28 % und bei LBA/gus mit signifikantem Unterschied zu den anderen Behandlungen 20 %. Die Behandlungen Tfvsl-B und Tfvsl-C, bei denen die PLBs nach der Kokultur im Licht, bzw. im Dunkeln zur Selektion auf Festmedium plattiert wurden, ließen deutlich mehr GUS-positive PLBs als Variante Tfvsl-A beobachten, bei der die PLBs zusätzlich drei Wochen in flüssigen Selektionsmedium geschüttelt wurden. Die GUS-Expression war zwischen Tfvsl-B und Tfvsl-C nicht signifikant verschieden. Den geringsten Anteil GUS-positiver Explantate mit bis zu 25 % nach zwei Monaten wies die Behandlung Tfvsl-A auf.

Beim Vergleich der GUS-Expression der beiden Agrobakterienstämme wurden bei den Auswertungen nach zwei und vier Monaten bei LBA4404 (LBA/gus) die höheren prozentualen Anteile an GUS-positiven PLBs nachgewiesen, während nach sechs Monaten tendenziell EHA105 (EHA/gus) eine höhere GUS-Expression aufwies (Tab. 3.8).

Die Unterschiede bei der Anzahl „spots“ je Explantat zwischen den verschiedenen Behandlungsvarianten waren nach vier und sechs Monaten nicht signifikant und damit insgesamt zu vernachlässigen (Tab. 3.8).

**Tab. 3.8: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tfvsl1 des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssig- und auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON02 mit EHA105, bzw. LBA4404 und pBI121 (EHA/gus und LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** A bis D: verschiedene Transformationsbehandlungen von Tfvsl1, Tab. 2.9. Dargestellt sind die Mittelwerte mit  $n = 20$  und die Standardabweichungen der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet. Die Anzahlen „spots“ je Explantat, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant. Es wurden jeweils die Behandlungen A-D mit demselben Vektor, bzw. der Kontrolle miteinander verglichen. Der histochemische GUS-Test der zwei Wiederholungen Tfvsl2 und Tfvsl3 befindet sich im Anhang (Tab. 6.12 und Tab. 6.13).

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>ON02</b>	A / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	B / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	C / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	D / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	A / EHA/gus	25 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,7 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	5,7 ± 1,3 <sup>a</sup>
	B / EHA/gus	70 <sup>b</sup>	6,1 ± 1,6 <sup>c</sup>	18 <sup>bc</sup>	4,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	13 <sup>bc</sup>	4,1 ± 0,8 <sup>a</sup>
	C / EHA/gus	65 <sup>b</sup>	5,6 ± 1,6 <sup>bc</sup>	13 <sup>bc</sup>	3,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	13 <sup>bc</sup>	3,5 ± 1,6 <sup>a</sup>
	D / EHA/gus	60 <sup>b</sup>	5,1 ± 1,9 <sup>bc</sup>	33 <sup>c</sup>	2,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	28 <sup>c</sup>	2,5 ± 1,3 <sup>a</sup>
	A / LBA/gus	25 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	2,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	B / LBA/gus	60 <sup>b</sup>	9,9 ± 3,3 <sup>c</sup>	28 <sup>bc</sup>	4,5 ± 1,0 <sup>a</sup>	13 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,7 <sup>a</sup>
	C / LBA/gus	65 <sup>b</sup>	12,3 ± 3,0 <sup>c</sup>	25 <sup>b</sup>	6,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	17 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,9 <sup>a</sup>
	D / LBA/gus	90 <sup>b</sup>	3,8 ± 1,9 <sup>bc</sup>	50 <sup>c</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	20 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,6 <sup>a</sup>

Bei den Versuchen Tfvsl1 bis Tfvsl3 des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssigkultur und auf Festmedium konnte die Integration des gewünschten Gens *etrI-1* ins pflanzliche Genom mittels PCR-Technik nicht nachgewiesen werden (Tab. 3.9). Das *gus*-Gen hingegen wurde bei einigen Explantaten der Behandlungsvariante Tfvsl-D (Tab. 2.10), der Transformation von PLBs auf Festmedium, aus den Versuchen Tfvsl1, Tfvsl2 und Tfvsl3 (Tab. 2.8) erfolgreich ins Pflanzengenom integriert. Beim Vergleich der Transformationseffizienz fällt auf, dass der Agrobakterienstamm LBA4404 (LBA/gus) mit bis zu 8,8 % bessere Raten aufwies als EHA105 (EHA/gus) mit bis zu 6,3 %. Das *nptII*-Gen wurde bei den Versuchen Tfvsl1, Tfvsl2 und Tfvsl3 und dort vor allem bei der Behandlung Tfvsl-D, die der Transformation von PLBs auf Festmedium entspricht, nachgewiesen.

Bei der Behandlungsvariante Tfvsl-A, bei der die PLBs zusätzlich drei Wochen in flüssigem Selektionsmedium geschüttelt wurden, konnte keine erfolgreiche Integration des Markergens *gus* nachgewiesen werden (Tab. 3.9).

**Tab. 3.9: Nachweis transgener Linien (TL) und der Transformationseffizienz (TE) mittels PCR-Technik bei den Versuchen Tfvsfl1 bis Tfvsfl3 (Tab. 2.8) des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssig- und auf Festmedium von ON02 sechs Monate nach der Transformation.** Tfvsfl-A bis Tfvsfl-D: verschiedene Transformationsbehandlungen, Tab. 2.9. Dargestellt sind die durchschnittliche Anzahl eingesetzter PLBs (Anz. PLBs, Kap. 2.4.6), die Anzahl mittels PCR getesteter PLBs und jeweils die Anzahl transgener Linien (TL) und die Transformationseffizienz (TE) für die zwei Gene *etr1-1* und *gus*. Die Kombination Agrobakteriumstamm und Vektor ist in Tab. 2.11 ersichtlich.

Versuch	Behandlung	Vektor	Nr. PLBs	Anz. getest. PLBs	<i>etr1-1</i>		<i>gus</i>	
					TL	TE [%]	TL	TE [%]
Tfvsfl1	Tfvsfl-A	EHA/gus	240	0	-	-	-	-
		LBA/gus	240	0	-	-	-	-
		EHA/etr	240	0	-	-	-	-
		LBA/etr	240	0	-	-	-	-
	Tfvsfl-B	EHA/gus	240	0	-	-	-	-
		LBA/gus	240	0	-	-	-	-
		EHA/etr	240	1	0	0,0	-	-
		LBA/etr	240	2	0	0,0	-	-
	Tfvsfl-C	EHA/gus	240	3	-	-	0	0,0
		LBA/gus	240	7	-	-	0	0,0
		EHA/etr	240	0	0	0,0	-	-
		LBA/etr	240	1	0	0,0	-	-
	Tfvsfl-D	EHA/gus	240	0	-	-	-	-
		LBA/gus	240	9	-	-	2	0,8
		EHA/etr	240	0	-	-	-	-
		LBA/etr	240	0	-	-	-	-
Tfvsfl2	Tfvsfl-A	EHA/gus	240	0	-	-	-	-
		LBA/gus	240	0	-	-	-	-
		EHA/etr	240	0	-	-	-	-
		LBA/etr	240	0	-	-	-	-
	Tfvsfl-B	EHA/gus	240	0	-	-	-	-
		LBA/gus	240	0	-	-	-	-
		EHA/etr	240	1	0	0,0	-	-
		LBA/etr	240	0	-	-	-	-
	Tfvsfl-C	EHA/gus	240	0	-	-	-	-
		LBA/gus	240	1	-	-	0	0,0
		EHA/etr	240	3	0	0,0	-	-
		LBA/etr	240	4	0	0,0	-	-
	Tfvsfl-D	EHA/gus	240	10	-	-	2	0,8
		LBA/gus	240	12	-	-	3	1,3
		EHA/etr	240	1	0	0,0	-	-
		LBA/etr	240	2	0	0,0	-	-
Tfvsfl3	Tfvsfl-A	EHA/gus	240	0	-	-	-	-
		LBA/gus	240	0	-	-	-	-
		EHA/etr	240	0	-	-	-	-
		LBA/etr	240	0	-	-	-	-
	Tfvsfl-B	EHA/gus	240	0	-	-	-	-
		LBA/gus	240	0	-	-	-	-
		EHA/etr	240	8	0	0,0	-	-
		LBA/etr	240	2	0	0,0	-	-
	Tfvsfl-C	EHA/gus	240	10	-	-	0	0,0
		LBA/gus	240	5	-	-	0	0,0
		EHA/etr	240	0	-	-	-	-
		LBA/etr	240	0	-	-	-	-
	Tfvsfl-D	EHA/gus	240	19	-	-	15	7,9
		LBA/gus	240	23	-	-	21	9,6
		EHA/etr	240	0	-	-	-	-
		LBA/etr	240	1	0	0,0	-	-

Der histochemische GUS-Test ließ bei den Kontrollen des Versuches Tfvsl4 (Tab. 2.8), bei dem die Dichte ( $OD_{600}$ ) der Bakteriensuspension während der Inkubation untersucht wurde, keinerlei GUS-Expression beobachten (Tab. 3.10). Die Behandlung Tfvsl-I (Tab. 2.10), bei der die PLBs auf Festmedium vorkultiviert, kokultiviert und selektiert wurden, wies an allen Auswertungsterminen mit bis zu 82 % die höchste GUS-Expression auf. Alle anderen Behandlungsvarianten Tfvsl-E bis Tfvsl-H, bei denen in Flüssigmedium vor- und kokultiviert wurde, die Kokultur zwischen zwei bis drei Tagen und die Bakteriendichte ( $OD_{600}$ ) von 0,1 bis 0,5 variierte, unterschieden sich nicht signifikant in den prozentualen Anteilen GUS-positiver PLBs. Einzig die Variante Tfvsl-F, bei der die Kokultur zwei Tage und die Bakteriendichte 0,5 betrug, zeigte eine leicht höhere GUS-Expression als Tfvsl-E, Tfvsl-G und Tfvsl-H.

Beim Vergleich der Anzahl „spots“ je Explantat unterschieden sich die Behandlungen Tfvsl-E bis Tfvsl-I nicht signifikant voneinander (Tab. 3.10).

**Tab. 3.10: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tfvsl4 des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssig- und auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON02 mit EHA105, bzw. LBA4404 und pBI121 (EHA/gus und LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** F bis I: verschiedene Transformationsbehandlungen von Tfvsl, Tab. 2.10. Dargestellt sind die Mittelwerte mit  $n = 20$  und die Standardabweichungen der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet. Die Anzahlen „spots“ je Explantat, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant. Der histochemische GUS-Test der Wiederholung Tfvsl5 befindet sich im Anhang (Tab. 6.14).

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>ON02</b>	E / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	F / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	G / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	H / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	I / Kontrolle	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	E / LBA/gus	50 <sup>b</sup>	6,2 ± 1,6 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	4,7 ± 1,6 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	3,2 ± 1,0 <sup>b</sup>
	F / LBA/gus	60 <sup>b</sup>	5,4 ± 1,9 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>	4,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>	5,5 ± 1,2 <sup>b</sup>
	G / LBA/gus	35 <sup>b</sup>	6,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	6,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	4,5 ± 0,9 <sup>b</sup>
	H / LBA/gus	35 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	6,5 ± 1,3 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	4,3 ± 1,5 <sup>b</sup>
	I / LBA/gus	82 <sup>b</sup>	2,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	2,2 ± 1,2 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>	3,4 ± 1,9 <sup>b</sup>

Die Integration des gewünschten Gens *etr1-1* konnte bei den Versuchen Tfvsl4 und Tfvsl5 (Tab. 2.8) des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssigkultur und auf Festmedium erneut nicht nachgewiesen werden (Tab. 3.11). Das *gus*-Gen hingegen wurde bei den Versuchen Tfvsl4 und Tfvsl5 jeweils bei der Behandlungsvariante Tfvsl-I und damit bei der Transformation von PLBs auf Festmedium erfolgreich mittels PCR-Technik amplifiziert. Die Transformationseffizienz betrug bei Tfvsl4 2,0 % und bei Tfvsl5 4,0 %. Eine unvollständige Übertragung der T-DNA, die durch den Nachweis des *nptII* Gens bei mehreren Explantaten als jenen mit Zielgen belegt wurde, konnte auch bei dieser Versuchsreihe aufgezeigt werden.

**Tab. 3.11: Nachweis transgener Linien (TL) und der Transformationseffizienz (TE) mittels PCR-Technik bei den Versuchen Tfvsl4 und Tfvsl5 (Tab. 2.8) des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssig- und auf Festmedium von ON02 zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Tfvsl-E bis Tfvsl-I: verschiedene Transformationsbehandlungen, Tab. 2.10. Dargestellt sind die durchschnittliche Anzahl eingesetzter PLBs (Anz. PLBs, Kap. 2.4.6), die Anzahl mittels PCR getesteter PLBs und jeweils die Anzahl transgener Linien (TL) und die Transformationseffizienz (TE) für die zwei Gene *etr1-1* und *gus*. Die Kombination Agrobakteriumstamm und Vektor ist in Tab. 2.11 ersichtlich.

Versuch	Behandlung	Vektor	Nr. PLBs	Anz. getest. PLBs	<i>etr1-1</i>		<i>gus</i>	
					TL	TE [%]	TL	TE [%]
Tfvsl1	Tfvsl-E	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	1	0	0,0	-	-
	Tfvsl-F	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	Tfvsl-G	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	5	0	0,0	-	-
	Tfvsl-H	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
	Tfvsl-I	LBA/gus	300	19	-	-	6	2,0
		LBA/etr	300	0	-	-	-	-
Tfvsl2	Tfvsl-E	LBA/gus	300	1	-	-	0	0,0
		LBA/etr	300	2	0	0,0	-	-
	Tfvsl-F	LBA/gus	300	0	-	-	-	-
		LBA/etr	300	1	0	0,0	-	-
	Tfvsl-G	LBA/gus	300	1	-	-	0	0,0
		LBA/etr	300	3	0	0,0	-	-
	Tfvsl-H	LBA/gus	300	2	-	-	0	0,0
		LBA/etr	300	1	0	0,0	-	-
	Tfvsl-I	LBA/gus	300	23	-	-	12	4,0
		LBA/etr	300	2	0	0,0	-	-

Die Versuche Tfvsl, bei denen die Transformation von PLBs in Flüssigkultur und auf Festmedium verglichen wurde, zeigten eindeutig, dass die Transformationseffizienz bei der Transformation von PLBs auf Festmedium am höchsten war (Tab. 3.8, Tab. 3.10). Der Erfolg dieser Behandlung wurde sowohl durch den histochemischen GUS-Test als auch mittels PCR-Technik bestätigt (Tab. 3.9, Tab. 3.11).

### 3.3.5 Transformation der PLBs von *Oncidium* und *Odontoglossum* in Flüssigkultur

Die weiteren Versuche konzentrierten sich auf den *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer von PLBs in Flüssigkultur mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung oder einer Vakuuminfiltration. Die Transformation von PLBs in Flüssigkultur stellte aus der Sicht des Anwenders eine sehr einfache und schnelle Methode dar. Das Ausgangsmaterial, PLBs aus der Flüssigkultur, war aus den Regenerationsversuchen mit Blattmaterial (Kap. 3.2.4) und die erfolgreiche Vermehrung dieser PLBs in Flüssigmedium (Kap. 3.2.5) in ausreichender Menge vorhanden.

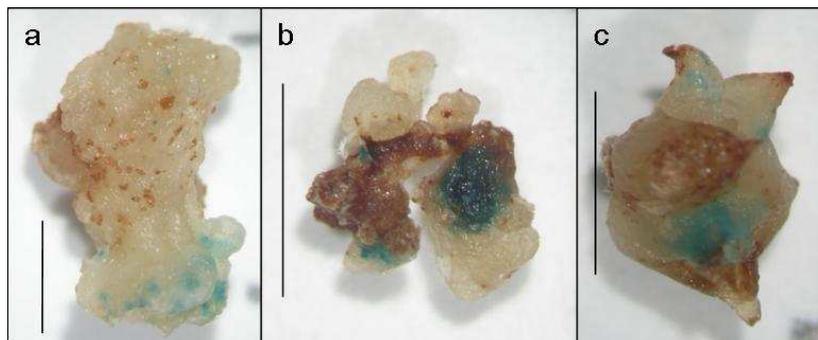
#### Transformation mit Hilfe der Ultraschallbehandlung

Mit Hilfe einer zusätzlichen Ultraschallbehandlung wurde versucht, PLBs in Flüssigkultur zu transformieren und dadurch die Transformationsrate zu erhöhen. Die Parameter der Versuche TflU (Transformation flüssig mit Ultraschall) sind der Tab. 2.8 zu entnehmen. Die Behandlungsdauer der Ultraschallbehandlung wurde mit 0, 5, 10, 30 und 60 Sekunden variiert. Für diese Untersuchung wurde der *Oncidium*-Genotyp ON02 verwendet.

Die Dauer der Ultraschallbehandlung wirkte sich signifikant auf das Ergebnis im histochemischen GUS-Test aus (Tab. 3.12). Mit zunehmender Behandlungsdauer wurden auch mehr blau gefärbte Zellen erfasst (Abb. 3.22). Dabei unterschied sich nach zwei Monaten die Versuchsvariante ohne Ultraschallbehandlung im prozentualen Anteil GUS-positiver Zellen signifikant von der 30 und 60 Sekunden andauernden Behandlung. Weder die Behandlungen von 5 und 10 Sekunden mit 35 %, bzw. 40 % blau gefärbter PLBs, noch jene von 30 und 60 Sekunden mit 65 %, bzw. 60 % positiver GUS-Expression unterschieden sich signifikant voneinander. Damit zeigte sich nach zwei Monaten eine optimale Ultraschallbehandlung von 30 Sekunden, die laut dem histochemischen GUS-Test eine deutlich bessere Transformationsrate erwarten ließ. Nach vier und sechs Monaten ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsdauern beobachten. Der prozentuale Anteil an GUS-positiven Explantaten war jedoch mit bis zu 18 % deutlich geringer als nach zwei Monaten. Die mit Ultraschall behandelten Kontrollen (K0/K5/K10/K30/K60) unterschieden sich an allen drei Auswertungsterminen aufgrund ihrer fehlenden GUS-Expression signifikant von den anderen Behandlungen.

**Tab. 3.12: Einfluss einer Ultraschallbehandlung auf das Ergebnis des histochemischen GUS-Tests aus Versuch TflU3 (n = 20, Tab. 2.8) von ON02 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als spots werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet. Die Anzahlen „spots“ je Explantat, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant. K0/K5/K10/K30/K60: Kontrolle mit 0, 5, 10, 30 und 60 Sekunden Ultraschallbehandlung. Der histochemische GUS-Test der beiden Wiederholungen TflU1 und TflU2 befindet sich im Anhang (Tab. 6.4 und Tab. 6.5).

Behandlungsdauer [s]	2 Monate		4 Monate		6 Monate	
	[%]	Anzahl „spot“ je Expl.	[%]	Anzahl „spot“ je Expl.	[%]	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>K0/K5/K10/K30/K60</b>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>0</b>	10 <sup>b</sup>	3,5 ± 1,1 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,7 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	2,3 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>5</b>	35 <sup>bc</sup>	2,3 ± 0,6 <sup>bc</sup>	5 <sup>b</sup>	3,5 ± 1,1 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>	5,3 ± 1,4 <sup>b</sup>
<b>10</b>	40 <sup>bc</sup>	1,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,7 <sup>b</sup>
<b>30</b>	65 <sup>c</sup>	5,2 ± 1,5 <sup>c</sup>	8 <sup>b</sup>	5,3 ± 1,3 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	5,4 ± 1,6 <sup>b</sup>
<b>60</b>	60 <sup>c</sup>	4,8 ± 1,4 <sup>bc</sup>	13 <sup>b</sup>	4,4 ± 1,3 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	4,9 ± 1,4 <sup>b</sup>



**Abb. 3.22: Histochemischer GUS-Test der PLBs von ON02 sechs Monate nach der Transformation.** a) und b) ON02 mit EHA105 und pBI121, c) ON02 mit EHA105 und pIBGUS. Die Balken zeigen einen Längenstandard von 0,5 cm.

Der Nachweis auf Insertion des gewünschten Gens ins pflanzliche Genom mittels PCR-Technik ergab bei der Transformation mit Hilfe der Ultraschallbehandlung keine Integration der Gene *etr1-1* und *gus* ins pflanzliche Genom. Die Insertion des *nptII*-Gens wurde bei den Versuchen TflU2 und TflU3 teilweise mittels PCR-Analyse nachgewiesen.

### Transformation mit Hilfe der Vakuuminfiltration

Der Einfluss einer Vakuuminfiltration wurde in einem weiteren Transformationsversuch mit Flüssigkulturen von PLBs geprüft. Die Kontrollen (K0/K1/K2/K4) unterschieden sich an allen drei Auswertungsterminen aufgrund ihrer fehlenden GUS-Expression signifikant von den anderen Behandlungen (Tab. 3.13). Die transformierten PLBs mit und ohne Vakuuminfiltration (0, 1, 2 und 4 Minuten) ließen bei der zweiminütigen Behandlungsdauer eine geringfügig höhere GUS-Expression beobachten. Diese Beobachtung konnte allerdings nicht statistisch belegt werden.

**Tab. 3.13: Einfluss einer Vakuuminfiltration auf den histochemischen GUS-Test aus Versuch TflV8 (n = 20, Tab. 2.8) von ON02 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als spots werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet. Die Anzahlen „spots“ je Explantat, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nach dem Bonferroni Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant. K0/K1/K2/K4: Kontrolle mit 0, 1, 2 und 4 Minuten Vakuum Infiltration. Der histochemische GUS-Test der beiden Wiederholungen TflV2 und TflV3 befindet sich im Anhang (Tab. 6.6 und Tab. 6.7).

Behandlungsdauer [min]	2 Monate		4 Monate		6 Monate	
	[%]	Anzahl „spot“ je Expl.	[%]	Anzahl „spot“ je Expl.	[%]	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>K0/K1/K2/K4</b>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>0</b>	45 <sup>b</sup>	5,2 ± 1,7 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,8 <sup>b</sup>
<b>1</b>	55 <sup>b</sup>	5,0 ± 1,5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	2,5 ± 0,4 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>2</b>	70 <sup>b</sup>	6,9 ± 1,4 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	4,5 ± 2,2 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,7 <sup>b</sup>
<b>4</b>	55 <sup>b</sup>	6,4 ± 1,7 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	3,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	5,2 ± 1,6 <sup>b</sup>

Bei der Transformation mit Hilfe einer Vakuuminfiltration konnte bei keiner Wiederholung und Behandlung die Integration der Gene *etr1-1* und *gus* ins Genom mittels PCR-Technik nachgewiesen werden. Eine Überprüfung der Insertion des *npII*-Gens wurde durchgeführt und nur bei der vierminütigen Vakuum Infiltration beim Versuch TflV1 nachgewiesen. Möglicherweise wurde die T-DNA bei diesem Explantat nur teilweise ins Genom integriert.

### 3.4 Vergleich verschiedener DNA- und RNA-Isolierungsmethoden

Die DNA-Isolierung erfolgte in großem Umfang zur Identifizierung transgener Sprosse. Aus diesem Grund wurden mehrere DNA-Isolierungsverfahren verglichen, um eine möglichst einfache und schnelle Methode zu etablieren, die eine hohe Ausbeute an DNA liefert.

Die Ergebnisse der DNA-Isolierungen aus In-vitro-Blattmaterial von ON02 mit den verschiedenen Verfahren (Kap. 2.5.1), mit dem Kit der Firma Qiagen, nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) und CHEN ET AL. (1998) sind in Tab. 3.14 dargestellt. Die deutlich besten Ergebnisse mit einer geringen Standardabweichung wurden mit dem Verfahren nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) mit einer durchschnittlichen DNA-Ausbeute von 105  $\mu\text{g} / \text{g}$  Frischmasse erzielt. Die DNA-Ausbeuten der Isolierungsverfahren nach CHEN ET AL. (1998) und mit dem Kit der Firma Qiagen fielen mit 55, bzw. 17  $\mu\text{g} / \text{g}$  deutlich niedriger aus. Die Standardabweichung der Methode nach CHEN ET AL. (1998) war außerdem etwas höher als jene des Kits und nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997).

Die DNA-Isolierung nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) wurde als sehr gut im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Methoden befunden, da sie zum einen eine sehr hohe DNA-Ausbeute lieferte und zum anderen einfach, schnell, preisgünstig und ohne gesundheitsschädliche Chemikalien durchgeführt werden konnte (Tab. 3.14).

**Tab. 3.14: Vergleich der DNA-Ausbeuten der verschiedenen DNA-Isolierungsverfahren aus In-vitro-Blattmaterial von ON02.** Dargestellt sind die Einwaage zu Beginn der Isolierung, die einzelnen Werte aus vier Isolierungen in  $\mu\text{g}/\text{g}$  Frischmasse, der Mittelwert und die Standardabweichung. *Wdh.*: Wiederholung.

		Kit (Qiagen)	DOROKHOV UND KLOCKE (1997)	CHEN ET AL. (1998)
Einwaage [mg]	Wdh.	100	20	300
DNA-Ausbeute [ $\mu\text{g}$ DNA / g Frischmasse]	Wdh.1	21	118	58
	Wdh.2	11	110	40
	Wdh.3	18	105	73
	Wdh.4	17	88	46
Mittelwert		$17 \pm 2,1$	$105 \pm 6,3$	$55 \pm 7,9$

Orchideen besitzen einen hohen Gehalt an phenolischen Substanzen und Polysacchariden, die die Isolierung der RNA aus Blüten-, Knospen- und Blattmaterial erschweren. Aus diesem Grund wurden verschiedene RNA-Isolierungsmethoden auf ihre Eignung untersucht.

In Tab. 3.15 sind die Ergebnisse der Isolierung der RNA aus Blütenmaterial von ON02 mit den verschiedenen Verfahren (Kap. 2.5.1), mit dem Kit der Firma Invitek, nach MÜHLHARDT (2002), YU UND GOH (2000) und KRIEG (1996) dargestellt. Die höchste Ausbeute erzielte das Verfahren nach MÜHLHARDT (2002) mit durchschnittlich 218  $\mu\text{g}$  RNA / g Frischmasse. Die Erträge der übrigen Isolierungsverfahren fielen mit durchschnittlich 190, 167 und 90  $\mu\text{g/g}$  Frischmasse entsprechend dem Kit der Firma Invitek, dem Verfahren nach KRIEG (1996) und dem Protokoll nach YU UND GOH (2000) niedriger aus.

Zu beachten waren allerdings die hohen Standardabweichungen bei Verwendung des Kits und der Verfahren nach MÜHLHARDT (2002) und YU UND GOH (2000). Die Standardabweichung der RNA-Isolierung nach KRIEG (1996) hingegen war deutlich niedriger, und diese Methode lieferte damit stabilere Erträge (Tab. 3.15).

**Tab. 3.15: Vergleich der RNA-Ausbeute der verschiedenen RNA-Isolierungsverfahren aus der Blüte von ON02-Topfpflanzen.** Dargestellt sind die Einwaage zu Beginn der Isolierung, die einzelnen Werte aus vier Isolierungen in  $\mu\text{g/g}$  Frischmasse, der Mittelwert und die Standardabweichung.

		Kit (Invitek)	MÜHLHARDT (2002)	YU UND GOH (2000)	KRIEG (1996)
Einwaage [mg]	Wdh.	30	100	100	1.000
RNA-Ausbeute [ $\mu\text{g}$ RNA / g Frischmasse]	Wdh.1	30	107	51	122
	Wdh.2	330	266	67	191
	Wdh.3	133	190	176	167
	Wdh.4	268	307	67	187
Mittelwert		190 $\pm$ 67	218 $\pm$ 44	90 $\pm$ 29	167 $\pm$ 16

### 3.5 Klonierung des Promotors PeMADS5 und des *etr1-1*-Gens in pCambia

Der Promotor des bereits vorhandenen Vektors pBEO210 stammt aus *Petunia hybrida*. Aufgrund der Tatsache, dass *Petunia* mit der Orchidee nur sehr weit entfernt verwandt ist, könnte es für die Expression des Gens von Vorteil sein, wenn der Promotor, der das Zielgen induziert, aus dem Orchideengenom entstammt. Ein weiterer Grund für die Konstruktion eines neuen Vektors war die Verwendung eines Plasmides, bei dem zuerst das jeweilige Gen und dann der Selektionsmarker übertragen wird, womit unvollständige Übertragungen der T-DNA bereits frühzeitig ausgemerzt werden können.

Für die Konstruktion des neuen Vektors pCambiaPeMADS5etr1-1 wurden zum einen der Promotor des MADS-Box-Gens *PeMADS5* aus *Phalaenopsis equestris* und zum anderen der mutierte Ethylenrezeptor *etr1-1* von *Arabidopsis thaliana* aus dem bereits vorhandenen Vektor pBEO210 benötigt. Die Klonierung des Vektors pCambiaPeMADS5etr1-1 erfolgte in zwei Schritten. Die Sequenz der Promotorregion des MADS-Box-Gens (Accessionsnummer AY496050) war bereits bekannt und somit konnten spezifische Primer für die Amplifikation des Promotors über PCR-Technik abgeleitet werden. Die gewünschte Promotorsequenz konnte allerdings erst amplifiziert werden, als der antisense Primer aus dem kodierenden Bereich des MADS-Box-Gens *PeMADS5* abgeleitet wurde.

Mit den geeigneten Primern Pro1PeMADS5\_s und ProPeMADS5\_as wurde ein 1.139 bp großes Amplikon amplifiziert, das zusätzlich zu der Promotorsequenz auch noch ein Fragment kodierenden Bereiches enthielt. Zur Überprüfung der gewünschten Sequenz wurde das Amplikon in *E. coli* kloniert, die Plasmid-DNA isoliert und diese sequenziert. Der Vergleich des Amplikons mit der Sequenz aus der Datenbank ergab eine sehr gute Übereinstimmung bis zur Base 950. Nach dieser Base konnten einige Unterschiede beobachtet werden (siehe Abb. 3.23), die aufgrund einer mangelnden Sequenziergenauigkeit ab circa 800 bp laut dem Anbieter (MWG Biotech) tolerabel sind.

```

Amplikon -----GGGAAATTGATTGGGATGTCCTAAGGGTCCCTCAGGGAAGCTCTCTGAAG 50
PeMADS5 ATTTGGTAGGGGGAAATTGATTGGGATGTCCTAAGGGTCCCTCAGGGAAGCTCTCTGAAG 120
*****

Amplikon AGTTTAGAAGGCCTCAGTGAAAAATTTTTTTACCACCCTCTCCATGGCCGTGAGGGGTA 110
PeMADS5 AGTTTAGAAGGCCTCAGTGAAAAATTTTTTTACCACCCTCTCCATGGCCGTGAGGGGTA 180
*****

Amplikon GATTTTATAGAAAATGACTATAAGGATGCTTAGCTGGCCAATTGAGAGCTTAGCCCCACT 170
PeMADS5 GATTTTATAGAAAATGCTATAAGGATGCTTAGCTGGCCAATTGAGAGCTTAGCCCCACT 240
*****

Amplikon GCTTAGGTGTCAAACAGAGGGGTCCTCAGCTCAATTCGAGCTGAGGTGGCCTCTTGGCAT 230
PeMADS5 GCTTAGGTGTCAAACAGAGGGGTCCTCAACTCAATTCGAGCTGAGGTGGCCTCTTGGCAT 300
*****

Amplikon GAATTTGGGTTCTAACCATGTGGGGCTCACGTTTTGAGCTTTAGCTTTGGGTTAAGGTG 290
PeMADS5 GAATTTGGGTTCTAACCATGTGGGGCTCACGTTTTGAGCTTTAGCTTTGGGTTAAGGTG 360
*****

Amplikon GTTAACCAAGACTTGAACCATGGTTAAGGTTTATGATGCTTAGTAAAAATGACATCATAG 350
PeMADS5 GTTAACCAAGACTTGGACCATGGTTAAGGTTTATGATGCTTAGTAAAAATGACACCATAG 420
*****

Amplikon AGTTTAGACATGTGGTATGACAAGTACATTGATTTAACCTCCTTATTATCTCTTTAAAAG 410
PeMADS5 AGTTTAGACATGTGGTATGACAAGTACATTGATTTAACCTCCTTATTATCTCTTTAAAAG 480
*****

Amplikon CTTTTTCAAAAATTTACCCATGGGATAAATATCAAGCCTAACCATGGGTTGATGACTGG 470
PeMADS5 CTTTTTCAAAAATTTACCCATGGGATAAATATCAAGCCTAACCATGGGTTGATGACTGA 540
*****

Amplikon CTGGAACCTAACCCTAGGGTCTAAGGTGAGTCAAGGTAGAGCTCATTGACCATACCAA 530
PeMADS5 CTGGAACCTAACCCTAGGGTCTAAGGTGAGTCAAGGTAGAGCTCATTGACCATACCAA 600
*****

Amplikon GCTTAATGGTTTGGATTTGGTCATAAGTCCAAAATGGTGTTCATGACCAAATCTTGTGT 590
PeMADS5 GCTTAATGGTTTGGATTTGGTCATAAGTCCAAAATGGTGTTCATGACCAAATCTTGTGT 660
*****

Amplikon TTGGGCTAGGTTAGGCATGTCAATTGGCCACATGTCTAAACCACATGTCCATTTGCGT 650
PeMADS5 TTGGGCTAGGTTAGGCATGTCAATTGGCCACATGTCTAAAGCACATGTCCATTTGCGT 720
*****

Amplikon TTCACAGAGAAGGAAATCACTTTCACTTAGGGAACTTTAGCTTTTGAATCTCTCCCTA 710
PeMADS5 TTCACAGAGAAGGAAATCACTTTCACTTAGGGAACTTTAGCTTTTGAATCTCTCCCTA 780
*****

Amplikon AAGTGAATTCCTTCTTCGTCTTCATCTTCTTCATCCGCTCCTCTCCACAACATCCAGTC 770
PeMADS5 AAGTGAATTCCTTCTTCGTCTTCATCTTCTTCATCCGCTCCTCTCCACAACATCCAGTC 840
*****

Amplikon TCCACTAACTGCCTCTTTATCACTTTAAAAATCCCTCCTTTTCACTTTCTACGTATGCG 830
PeMADS5 TCCACTAACTGCCTCTTTATCACTTTAAAAATCCCTCCTTTTCACTTTCTACGTATGCG 900
*****

Amplikon GGCCTTACCACCCATTGAATTGTAGAACACGACTTTGTGTCCTTTCACGGGGAGAGAGA 890
PeMADS5 G-CCTTACCACCCATTGAATTGTAGAACACGACTTTGTGTCCTTTCACGGGGAGAGAGA 959
* *****

Amplikon GGGAGAGGCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAAGTTGAATTTGTGGTGAAGTAGCTA 950
PeMADS5 GGGAGAGGCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAG---TGAATTTGTG-CTGAAGGAAGCTA 1014
*****

Amplikon AACGGGGGTTGGAGGGAATCGGGGAGAGGTAAGATCAGAATCAGAAGAATGGAATTC 1010
PeMADS5 A---GGGGGTTGGAGGGAATCGGGG-AGAGGGAAGATAGAGATAAGAAGATAGAGAATCC 1070
* *****

Amplikon AACAGCCAG-CAAGTACCGTATTCAAAGAGGCGACCTGG-ATCATGAATATGCTAAAGGA 1068
PeMADS5 AACAGCAGGCAAGTAACGTATTCAAAGAGGCGACTTGGGATCATGAAGAAGCAGAGGA 1130
**** *

Amplikon ACTCACAG-GCTCTGCGACGCC--ACTCTCAACTAA-ATATCTTTCAGCTCCG-----C 1118
PeMADS5 ACTCACAGTCTCTGCGACGCTCAACTCTCACTCATCATCTTCTCAAGCTCCGGCAAGT 1190
*****

Amplikon AGTTACGTATCGCAGCT-----AAGGCCAATCCCACTGGCGGCTTACCTATGTG 1170
PeMADS5 AGCTGATTTCTGCAGCCCTTCCACAGACGTTAAAGATATAGTTGAGAGGT-ACCAAAATG 1249
** *

```

**Abb. 3.23: ClustalW Alignment der Nukleotidsäuresequenzen der Promotorregion und des MADS-Box-Gens *PeMADS5* mit der Sequenz des über *Pro1PeMADS5\_s* und *ProPeMADS5\_as* amplifizierten Amplikons von *Phalaenopsis equestris*. Die Primersequenzen *Pro1PeMADS5\_s* und *ProPeMADS5\_as* sind rot, die Primersequenz *PeMADS5Pro2b\_as* ist blau und der Beginn der Gensequenz gelb hinterlegt. Die Sterne geben eine Übereinstimmung der Nukleotide beider Sequenzen an.**

Aus der soeben beschriebenen Plasmid-DNA wurde in einem zweiten Schritt die Promotorregion mit den Primern Pro1PeMADS5b\_s und PeMADS5Pro2b\_as (Abb. 3.23) mittels *sticky end*-PCR amplifiziert, wobei den Enden des Amplikons die Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Sal*I hinzugefügt wurden. Diese beiden Restriktionsenzyme wurden aus der "multiple cloning site" des Plasmids pCambia 2300 ausgewählt und ermöglichten den Einbau des Promotors in der richtigen Richtung. Der amplifizierte Promotor umfasste zusammen mit den Restriktionsstellen 901 bp. Die Größe des Amplikons wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt.

Gleichzeitig wurde das Plasmid pCambia 2300 mittels eines Doppelverdaus mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Sal*I restringiert. Ein Teil des Restriktionsverdaus wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fragmentgröße überprüft.

Anschließend wurden das restringierte pCambia-Plasmid und das Amplikon aus der *sticky end*-PCR miteinander ligiert. Für die Ligation wurde ein dreifacher Überschuss an Insert-DNA verwendet. Der Erfolg der *E. coli* Transformation wurde mittels *colony*-PCR mit den spezifischen Primern der vorangegangenen *sticky end*-PCR überprüft. Aus der gewünschten Kolonie wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit dem Namen pCambiaPeMADS5 versehen.

Der nächste Schritt bestand in der Klonierung des *etr1-1*-Gens aus pBEO210 in pCambiaPeMADS5. An beiden Enden des *etr1-1*-Gens befand sich die Schnittstelle *Bam*HI, die auch in der "multiple cloning site" des Vektors pCambia 2300 vorzufinden war. Aus diesem Grund wurde zunächst das Plasmid pCambiaPeMADS5 mit *Bam*HI geöffnet und dephosphoryliert. Gleichzeitig wurde der Vektor pBEO210 mit *Bam*HI restringiert und der Ansatz wurde mit einem Längenmarker als Kontrolle auf ein Gel aufgetragen. Nach dem Ausschneiden der Bande des *etr1-1*-Fragments aus dem Gel wurde dieses aufgereinigt. Aufgrund der geringern Ausbeute an DNA wurden die aufgereinigten Fragmente aus verschiedenen Restriktionsansätzen eingedampft und damit der DNA-Gehalt erhöht.

Nach diesen Vorbereitungen wurden die restringierte Plasmid-DNA pCambiaPeMADS5 und das aufgereinigte *etr1-1*-Fragment über Nacht bei 14°C ligiert. Für die Ligation wurde ein dreifacher Überschuss an Insert-DNA verwendet. Anschließend wurde der Ligationsansatz in *E. coli* transformiert. Die Überprüfung der gewünschten Kolonie erfolgte mittels *colony*-PCR mit dem spezifischen sense-Primer aus dem Promotor *PeMADS5* (Pro1PeMADS5\_s, Tab. 2.5) und dem antisense-Primer aus *etr1-1* (fbpetr1-1\_as, Tab. 2.5). Dadurch wurde die Kolonie mit

dem Insert in der richtigen Richtung ausgewählt. Die Größe des Amplikons wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt. Aus der Kolonie mit den gewünschten Eigenschaften wurde nach einer ÜNK das Plasmid isoliert und sequenziert. Der Übergang zwischen der Promotorsequenz und dem *etr1-1*-Gen war dabei von besonderer Bedeutung, weshalb die Primer für die Sequenzierung so gewählt wurden, dass der Übergang noch im genauen Sequenzierbereich lag.

Der Vergleich des Promotors *PeMADS5* und des *etr1-1*-Gens mit der Sequenz des neu konstruierten Vektors pCambiaPeMADS5etr1-1 ergab eine sehr gute Übereinstimmung bis zur Base 1000. Nach dieser Base wurden einige Unterschiede beobachtet (Abb. 3.24), die aufgrund einer mangelnden Sequenziergenauigkeit ab circa 800 bp laut dem Anbieter (MWG Biotech) tolerierbar sind. Der antisense Primer zur Amplifizierung des Promotors wurde in der nachfolgenden Abbildung Abb. 3.24 grün unterlegt. Dies zeigte den exakten Einbau des *sticky end*-Produktes. Die grau unterlegte Basenabfolge zeigte einen Bereich der "multiple cloning site". Die Restriktionsschnittstelle *Bam*HI wurde gelb unterlegt und wies auf den Beginn des *etr1-1*-Gens hin. Mit dem Vergleich der Sequenzen in Abb. 3.24 wurde der Übergang des Einbaus des Promotors aus *PeMADS5* und des *etr1-1*-Gens gezeigt und die erfolgreiche Klonierung bewiesen.

PromotorPeMADS5 Sequenzierung	AGGT <b>GTCAAACAGAGGGGTCTCTCA</b> ACTCAATTCGAGCTGAGGTGGCCTCTTGGCATGAAT 240 -----GGACCTAGCTGAG-TGGC-TCTTGGCATGA-T 29 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	TTGGTTCTAACCATGTGGGGGCTCAGGTTTGTAGCTTTAGCTTGGGTTAAGGTGGTTA 300 TTGGTTCTAACCATGTGGGGGCTCAGGTTTGTAGCTTTAGCTTGGGTTAAGGTGGTTA 89 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	ACCAAGACTTGGACCATGGTTAAGGTTTATGATGCTTAGTAAAAATGACACCATAGAGTT 360 ACCAAGACTTGAACCATGGTTAAGGTTTATGATGCTTAGTAAAAATGACATCATAGAGTT 149 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	TAGACATGTGGTATGACAAGTACATTGATTAACTCCTTATTATCTCTTTAAAAGCTTT 420 TAGACATGTGGTATGACAAGTACATTGATTAACTCCTTATTATCTCTTTAAAAGCTTT 209 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	TTTCAAAAATTTACCATGGGATAAATATCAAGCCTAACCATGGGTTGATGACTGACTTG 480 TTTCAAAAATTTACCATGGGATAAATATCAAGCCTAACCATGGGTTGATGACTGACTTG 269 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	GAACTCAACCCTAGGGTCTAAGGTGAGTCAAGGTAGAGCTCATTTGACCATACCAAGCTT 540 GAACTCAACCCTAGGGTCTAAGGTGAGTCAAGGTAGAGCTCATTTGACCATACCAAGCTT 329 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	AATTGGTTTGGATTGGTGCATAAGTCCAAAATGGTGTTCATGACCAAATCTTGTGTTTGG 600 AATTGGTTTGGATTGGTGCATAAGTCCAAAATGGTGTTCATGACCAAATCTTGTGTTTGG 389 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	GCTAGGTTAGGCATGTCAATTGGCCACATGTCTAAAGCACATGTTCACCTTCGCTTTCA 660 GCTAGGTTAGGCATGTCAATTGGCCACATGTCTAAAGCACATGTTCACCTTCGCTTTCA 449 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	CAGAGAAGGAAATCACTTTCACCTAGGGAACTTTCAGCTTTTGCAATCTCTCCCTAAAGT 720 CAGAGAAGGAAATCACTTTCACCTAGGGAACTTTCAGCTTTTGCAATCTCTCCCTAAAGT 509 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	GGAATTCCTTCTTCTCTTTCATCTTCTTCCATCCGCTCCTCTCCACAGCATCCAGTCTCCA 780 GGAATTCCTTCTTCTCTTTCATCTTCTTCCATCCGCTCCTCTCCACAACATCCAGTCTCCA 569 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	CTAACTGCCTCTTATCACTTTAAAATCCCTCCTTTTACACTTCTACGTATGCGGCCT 840 CTAACTGCCTCTTATCACTTTAAAATCCCTCCTTTTCACTTCTACGTATGCGGCCT 629 *
PromotorPeMADS5 Sequenzierung	TCACCACCATTGAATTGTAGAACACGACTTTG <b>TGCGCTTTCAGGGGGAGAGAGA</b> GGATC 900 TCACCACCATTGAATTGTAGAACACGACTTTG <b>TGCGCTTTCAGGGGGAGAGAGA</b> ----- 684 *
GGGAGAGGCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAGTGAATTTGTGCTGAAGGAAGCTAAGGGGGGTGGAGGGAATGGGGAGAGGCCAAGA TTGGAGATAAAGAAGATAGAGAATCCAACAAGCAGGCAAGTAACGTAATCAAAGAGGCGACTTGGGATCATGAAGAGGCAGAGGAATC ACAGTGCTCTGCGACGCTCACTTCTACTATCATCTTCTCAAGCTCCGGGAGGTAGCTGATTTCTTGGCGCCTAAGGCCAATTCACAT ACACTGGCCCGCTTACTAGT	
etr1-1 Sequenzierung	<b>GGATCC</b> TCTTCTCCGATCAATTCTTCCCAAGTAAGCTTCTTCTTCTCGATTTCTCTCCTC 60 <b>GGATCC</b> TCTTCTCCGATCAATTCTTCCCAAGTAGCTCCTTCTTC-TCGATTTCTTCTCCT 1028 *
etr1-1 Sequenzierung	AGATGTTTTCTGACTTCTTTATATATATTTCTTCACTTCCACAGTTTCTTCTGTGTTG 120 AGATCGTATCAGGACTTCTT-ATTAT-TTCCTCACTTCCACAGTTTCTTCTGTGTTG-G 1085 *
etr1-1 Sequenzierung	TCGTGATCTCAAATCATAGAGATTGATTAACTAATTGGTCTTATCTAGTGAATGCA 180 CCGCCATCTCAAATCCATCAGATCGATTAACCTTATTGG-CTTTAACCATGTAATGCA 1144 *
etr1-1 Sequenzierung	TCGTTATTAGGAAGCTTTAAATTAAGATTAAATCGTTAATTTTCATGATTTCGATTTCGAATT 240 CC-TTAT-ACGAAGTT-AAATTAATTAAGTT-AAATCGTTAATTTTCATGATTTCGATTTCGAATT 1196 *
etr1-1 Sequenzierung	TTACTGTTCTCGAGACTGAAATATGCAACCTATTTT-TTCGTAATCGTTGTGAT-CGAAT 298 TT-CCGGTCTCTAAACTAAA--TGCCACCCATTTTGTTCGAAATCAGTGTGATCAAAAT 1253 *
etr1-1 Sequenzierung	TCGATTCTTCAGAATTTATAGCAATTTTGATGCTCATGATCTGTCTACGCTACGTTCTCG 358 ACTA----- 1257 * *

Abb. 3.24: ClustalW Alignment der Nukleotidsäuresequenzen der Promotorregion des MADS-Box-Gens PeMADS5 und des etr1-1-Gens aus pCambiaPeMADS5etr1-1. Die Primersequenz PeMADS5Pro3\_s ist rot, die Primersequenz PeMADS5Pro2b\_as (Kap. 2.1.6) ist grün und die Schnittstelle BamHI gelb hinterlegt. Der grau unterlegte Bereich ist eine nicht bekannte Sequenz des Vektors. Die Sterne geben eine Übereinstimmung der Nukleotide beider Sequenzen an.

## 4 Diskussion

Die Orchideengattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* sind aufgrund ihres weiten Spektrums an Blütenfarben und -formen attraktive Zierpflanzen mit großem ökonomischen Potential. Der Seneszenzprozess beginnt unter anderem wegen ihrer Sensitivität gegenüber Ethylen allerdings sehr schnell im Vergleich zu anderen Orchideengattungen. Die klassische Züchtung ist gerade bei den langsam wachsenden Orchideen sehr zeitaufwendig, weshalb der *A. tumefaciens*-vermittelte Gentransfer eine gute Alternative zur klassischen Züchtung darstellt. Die Transformation von *Oncidium* mittels *A. tumefaciens* wurde bereits von LIAU ET AL. (2003a, 2003b) und YOU ET AL. (2003) beschrieben. Neben der Etablierung eines Transformationssystems unter Einsatz von visuell detektierbaren Reporter genen (LIAU ET AL., 2003a, 2003b, YOU ET AL., 2003) hatten die Untersuchungen auch die Merkmalsverbesserung erhöhte Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* (LIAU ET AL., 2003b, YOU ET AL., 2003) zum Ziel. Bei *Odontoglossum* wurden bislang keine wissenschaftlichen Untersuchungen über einen Gentransfer durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden *Oncidium* und *Odontoglossum* erstmals mit dem Ziel der Verbesserung der Blütenhaltbarkeit transformiert. Damit wurde die Grundlage geschaffen, die Haltbarkeit der Blüten dieser Orchideengattungen zu verlängern.

Der Transformation zugrunde liegt ein effizientes Regenerationssystem. Die Regeneration von PLBs von *Oncidium* über somatische Embryogenese konnte bereits aus Blattexplantaten von In-vitro-Pflanzen (CHEN ET AL. 1999, CHEN UND CHANG 2001, 2002, 2003A, 2003B, 2004, SU ET AL. 2006) gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Regeneration von PLBs aus Internodienabschnitten von Gewächshauspflanzen (CHEN UND CHANG 2000) und über Kallusbildung von Wurzelsegmenten (CHEN UND CHANG 2000, 2004) beschrieben. Bei der Gattung *Odontoglossum* wurde die Regeneration von PLBs noch nicht beschrieben. Die Bestrebung dieser Arbeit war die Etablierung und Optimierung dieser bisherigen Regenerationsprotokolle für ausgewählte Genotypen von *Oncidium* und *Odontoglossum*.

In den folgenden Kapiteln werden die Untersuchungen zum Einfluss von Ethylen, die Etablierung von sterilen Kulturen, einem effizienten Regenerations- und Transformationssystem bis hin zur molekularen Analyse der transgenen Sprosse beschrieben und diskutiert.

#### 4.1 Untersuchungen zum Einfluss von Ethylen auf die Seneszenz

Ethylen ist ein gasförmiges Hormon, das bei einer Vielzahl an Stoffwechselprozessen in der Pflanze eine wichtige Rolle spielt und unter anderem für die Seneszenz und damit für die Welke und das Abfallen von Knospen und Blüten verantwortlich ist. Die Untersuchung des Einflusses von Ethylen auf die Alterung von Blüten und der gesamten Pflanze war nötig, um die Rolle dieses Hormons bei der Seneszenz von *Oncidium* und *Odontoglossum* zu klären. Eine Sensitivität gegenüber exogenem Ethylen konnte bereits bei den Orchideengattungen *Cymbidium* (HEYES UND JOHNSTON, 1998, PHILOSOPH-HADAS ET AL., 2005), *Phalaenopsis* (PORAT ET AL., 1994, CHANG ET AL., 2003, LIN ET AL., 2003) und *Oncidium* (HUANG ET AL., 2003) nachgewiesen werden. In den vorliegenden Versuchen wurden die Bedingungen bezüglich der Konzentration an Ethylen während eines Transportes oder bei der Lagerung von Zierpflanzen nachgestellt. Das Ergebnis dieser Untersuchung war entscheidend für die weitere Vorgehensweise dieser Arbeit. Nur bei einer Sensitivität gegenüber Ethylen ist eine Transformation von *Oncidium* und *Odontoglossum* mit dem mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* aus *Arabidopsis* zur Verlängerung der Blütenhaltbarkeit sinnvoll.

Die Seneszenz der Blütenrispen äußerte sich in dieser Untersuchung im Welken der Blüten, im Vergilben von Blüten und Blütenstängel und im Abfallen von Blüten und Knospen (Abb. 3.2). Ethylen beschleunigte den Prozess der Seneszenz. Die mit  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  begasten Blütenstiele zeigten, abhängig vom Genotypen, eben genannte Symptome bereits vier bis sechs Tage nach Beginn des Versuches. Mithilfe einer Vorbehandlung der Blütenstiele mit 1-MCP wurde bei den hier untersuchten Orchideen eine Verlängerung der Haltbarkeit von drei bis acht Tagen erzielt (Abb. 3.1). Eine ähnlich schnelle Seneszenz und deren Effekte infolge der Einwirkung von Ethylen konnten auch SEREK ET AL. (1995a) bei verschiedenen Schnittblumen wie *Alstroemeria*, *Antirrhinum* und *Dianthus* beobachten. Dabei wurde die Haltbarkeit von 1-MCP behandelten *Alstroemeria*, *Antirrhinum* und *Dianthus* ebenfalls um zwei bis dreieinhalb Tage verlängert.

Eine hemmende Wirkung von 1-MCP bezüglich der Seneszenz wurde bei vielen Ethylen sensitiven Schnittblumen nachgewiesen, wie die Zusammenfassung von WATKINS UND MILLER unter [www.hort.cornell.edu/departement/faculty\\_watk/ethylene/index.htm](http://www.hort.cornell.edu/departement/faculty_watk/ethylene/index.htm), modifiziert von SEREK ET AL. (2006), zeigt.

Eine weitere Reaktion auf die Begasung mit Ethylen war die Hemmung der Weiterentwicklung der Knospen zu Blüten. Nur bereits voll entwickelte Knospen entwickelten sich zu Blüten. Die Entwicklung der jungen Knospen wurde unterbunden und die meisten von ihnen fielen ab (Tab. 3.1). Blütenstiele ohne Vorbehandlung mit 1-MCP begannen in Raumluft 2,5 bis 9,5 Tage später zu welken als unter Einfluss von Ethylen. Ein Ethylen-freies Umfeld konnte als förderlich für die Entwicklung der Knospen im Vergleich zu den mit Ethylen begasten Blütenstielen nachgewiesen werden. Auch die noch geschlossenen Knospen der mit 1-MCP vorbehandelten Blütenstiele entwickelten sich für einen langen Zeitraum von bis zu acht Tagen zu Blüten. Diese Entwicklung der mit 1-MCP vorbehandelten Knospen war auch unter Einfluss von Ethylen nicht beeinträchtigt. Bei den 1-MCP vorbehandelten Blütenstielen wurde auch ein späteres und vermindertes Abfallen von Knospen und Blüten beobachtet (Tab. 3.1). Die gehemmte Entwicklung der Knospen unter Einfluss von Ethylen wurde auch bei Schnittblumen von *Phlox* (PORAT ET AL., 1995) beschrieben. Durch die Vorbehandlung der Blütenstiele von *Phlox* mit 1-MCP wurde ein Abfallen von Blüten und Knospen völlig unterbunden. Außerdem öffneten sich die Knospen zu Blüten, die Anzahl geöffneter Blüten verglichen mit den nicht behandelten Blütenstielen in Raumluft verhielt sich ähnlich wie bei den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen (PORAT ET AL., 1995). Auch bei *Begonia*, *Antirrhinum* und *Chamelaucium* (SEREK ET AL., 1994, 1995a, 1995b) konnte das Abfallen von Knospen und Blüten durch das Behandeln der Schnittblumen mit 1-MCP vermieden werden.

Die verschiedenen hier untersuchten Genotypen von *Oncidium* und *Odontoglossum* reagierten unter Einfluss von Ethylen in ähnlicher Weise, auch wenn sich die Dauer der Haltbarkeit der vorbehandelten Blütenstiele von drei bis acht Tagen etwas unterschied. Eine Ausnahme bildete hierbei der Genotyp OD07, der durch die Vorbehandlung mit 1-MCP eine acht Tage längere Haltbarkeit der Blütenrispen aufwies und damit den besten Schutz vor exogenem Ethylen erkennen ließ (Abb. 3.1). Von variierenden Ergebnissen bei der Verlängerung der Haltbarkeit von 1-MCP behandelten Sorten und Gattungen gemessen in Tagen wurde auch in früheren Untersuchungen berichtet. Die Haltbarkeit der Blüten von *Cymbidium* wurde durch die Vorbehandlung mit 1-MCP, abhängig vom Genotypen, von sechs bis zu neunzehn Tagen verlängert (HEYES UND JOHNSTON, 1998), während bei *Oncidium* eine Verlängerung von zwei Tagen erzielt wurde (HUANG ET AL., 2003). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der die Haltbarkeit der Blütenstiele auch in Raumluft verlängert werden konnte, wurde bei 14 verschiedenen australischen Schnittblumen durch Vorbehandlung mit 1-MCP keine

Verlängerung der Haltbarkeit beim Fehlen von Ethylenbegasung erzielt (MACNISH ET AL., 2000). Das Ergebnis der Untersuchung von MACNISH ET AL. (2000) mit Schnittblumen führte zu der Überlegung, dass die Gattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* auch endogen Ethylen produzieren könnten. Die Vorbehandlung der Blütenstiele mit 1-MCP schützten diese auch in der Raumluft vor frühzeitigen Seneszenzerscheinungen. Außerdem wurde in der mit Raumluft gefüllten Klimakammer geringe Konzentrationen an Ethylen mittels Gaschromatographen gemessen. Die Annahme der endogenen Ethylenproduktion bei *Oncidium* und *Odontoglossum* wird von mehreren Arbeiten unterstützt, die sich mit dem Einfluss von endogenem Ethylen auf die Seneszenz der Blüten infolge einer Bestäubung bei den Orchideengattungen *Phalaenopsis* und *Dendrobium* (PORAT ET AL., 1994, ZHANG ET AL., 1996, HUANG ET AL., 1999, KETSA UND RUGKONG, 1999, 2000) beschäftigten. Nach der Bestäubung kommt es zu einem enormen Anstieg der Ausschüttung endogenen Ethylens und damit zur Welke der Blüte. Dies bedeutet, dass Orchideen im Allgemeinen endogenes Ethylen produzieren und während des Transports oder der Lagerung dieses Hormon ausschütten. Stress fördert laut ABELES (1973) die endogene Produktion von Ethylen bei vielen Pflanzen. Eine stressbedingte Ausschüttung von Ethylen bedingt durch die simulierten Bedingungen eines Transports konnte beispielsweise bei Rosen, sowohl Schnitt- als auch Topfrosen, nachgewiesen werden (MÜLLER ET AL., 2000).

Bei der Untersuchung der Wirkung von exogenem Ethylen auf Topfpflanzen von *Oncidium* und *Odontoglossum* welkten die Blüten der Kontrolle unter Einfluss von  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen nach zwei bis vier Tagen und verhielten sich daher ähnlich den Blütenstielen (Abb. 3.3). SEREK UND SISLER (2001) beschrieben vergleichbare Ergebnisse bei Topfpflanzen von *Campanula* und *Schlumbergera*.

Sowohl HEYES UND JOHNSTON (1998) als auch LIN ET AL. (2003) beschrieben bei *Phalaenopsis* eine Reduktion der Welke von Blüten und Knospen unter Einfluss von Ethylen aufgrund einer Vorbehandlung mit 1-MCP. Bei der Arbeit von LIN ET AL. (2003) wurde versucht, die Bedingungen während des Transports nachzustellen und bei den hier untersuchten *Phalaenopsis* konnte infolge des Stresses eine erhöhte Ausschüttung von endogenem Ethylen festgestellt werden. Die mit 1-MCP vorbehandelten *Phalaenopsis* zeigten im Vergleich zu den unbehandelten eine Verlängerung der Haltbarkeit von bis zu acht Tagen. Dieses Ergebnis entspricht dem dieser Untersuchung, bei der die Haltbarkeit der Topfpflanzen durch die Behandlung mit 1-MCP unter Einfluss von Ethylen um zwei bis sieben Tage verlängert werden konnte.

Die Wirkung von 1-MCP geht aufgrund der Synthese von neuen Ethylenrezeptoren nach einem bestimmten Zeitraum, durchschnittlich nach drei bis sieben Tagen, verloren (SEREK UND SISLER, 2001). Diese neuen Ethylenrezeptoren werden durch 1-MCP nicht mehr blockiert, weshalb es interessant wäre, die Behandlung mit 1-MCP zu wiederholen, um möglicherweise eine weitere Verlängerung der Haltbarkeit von Blüten zu erzielen.

Das Vergilben der Stängel der Einzelblüten und der Blätter von *Oncidium* und *Odontoglossum* konnte als ein weiteres Merkmal für die Seneszenz beobachtet werden. Diese Seneszenzerscheinung zeigte sich unter Einfluss von Ethylen bei den Blüten bereits nach einem bis drei Tagen und bei den Blättern nach vier bis sieben Tagen. Im Vergleich dazu wirkten die Kontrolle und die mit 1-MCP vorbehandelten Blütenstiele viel frischer und vitaler (Abb. 3.2). Dieses Merkmal wurde rein visuell erfasst.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität von *Oncidium* und *Odontoglossum* gegenüber exogenem Ethylen bestätigt. Neben der verfrühten Welke unter Einfluss von Ethylen zeigten die Blütenrispen und Topfpflanzen auch Vergilbungen an Stängeln und Blättern. Die inhibierende Wirkung von 1-MCP, den Inhibitor des Ethylenrezeptors, wurde ebenfalls erfolgreich demonstriert.

#### **4.2 Entwicklung von In-vitro-Kulturtechniken**

Die Etablierung steriler, homogener und genetisch identischer Sprosskulturen war eine Voraussetzung, um reproduzierbare und vergleichende Versuchsbedingungen für die Durchführung von Regenerations- und Transformationsversuchen zu schaffen. Aus diesem Grund wurden zu Beginn der Arbeit In-vitro-Sprosse aus den Seitenknospen der Pseudobulben von Topfpflanzen etabliert und klonal vermehrt. Leider gab es zu den hier untersuchten Orchideengattungen bisher keine Veröffentlichungen zur Beschreibung der Inkulturnahme von Meristemen oder Sprossspitzen. CHEN UND CHANG (2000a) beschrieben in ihrer Arbeit die Etablierung steriler Sprosse über Adventivsprossbildung oder somatische Embryogenese an 5 mm langen Internodiensegmenten. Aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr durch endogene Pathogene in den Leitgefäßen war diese Art der Etablierung steriler Sprosskulturen nicht wünschenswert.

Über die Kultur von Sprossspitzen der Seitenbulben wurden von jedem Genotypen erfolgreich sterile Sprosskulturen etabliert. Dabei war die Etablierungsrate an sterilen Sprossen sehr unterschiedlich. Während *Oncidium* eine sehr hohe Etablierungsrate aufwies, variierten die Raten der *Odontoglossum*-Hybriden (Abb. 3.5). Ursache dafür ist vermutlich der heterogene genetische Hintergrund der verschiedenen Hybriden, wie in Tab. 2.1 dargestellt.

#### 4.2.1 Regeneration von Protocorm Like Bodies (PLBs)

Ein effizientes und reproduzierbares Regenerationssystem ist Voraussetzung für die genetische Transformation mittels *A. tumefaciens*. Nur bei einem System mit einer hohen Anzahl regenerierender Zellen ist eine ausreichende Wahrscheinlichkeit für eine Regeneration aus transformierten Zellen gegeben. Aus diesem Grund wurde nach der Etablierung steriler Sprosskulturen an einem In-vitro-Regenerationssystem gearbeitet, das eine hohe Regenerationsrate und eine hohe Anzahl an phänotypisch normalen Sprossen pro Explantat erzielte. Die Regeneration von so genannten protocorm like bodies (PLBs) war zuvor bei *Oncidium* zum einen über die somatische Embryogenese aus Blattexplantaten von In-vitro-Pflanzen (CHEN ET AL. 1999, CHEN UND CHANG 2001, 2002, 2003A, 2003B, 2004, SU ET AL. 2006), zum anderen über Internodienabschnitte von Gewächshauspflanzen (CHEN UND CHANG 2000a) und über Kallusbildung von Wurzelsegmenten (CHEN UND CHANG 2000b, 2004) gezeigt worden. Bei der Gattung *Odontoglossum* war die Regeneration von PLBs noch nicht beschrieben.

Die Regeneration von PLBs über somatische Embryogenese wurde bereits bei *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* und auch *Oncidium* mit Hilfe von histologischen Aufzeichnungen nachgewiesen (CHEN ET AL., 1999, PARK ET AL., 2002B, CHEN UND CHANG, 2006). Aufgrund der bisherigen Untersuchungen wurde auch in der vorliegenden Arbeit von ausgegangen, dass PLBs somatischen Embryonen entsprechen.

Aufgrund dieses Vorwissens wurde an einem Regenerationssystem von PLBs gearbeitet. Die Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Regeneration von PLBs stützte sich zunächst auf die Arbeiten von CHEN ET AL. (1999), CHEN UND CHANG (2001, 2002, 2003A, 2003B, 2004) und SU ET AL. (2006). Nach den eben genannten Arbeiten wurden die Explantate in einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden kultiviert. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings bei diesen Kulturbedingungen keine Regeneration beobachtet werden. Der Verzicht

auf Licht in der Anfangsphase hingegen führte zu sehr guten Regenerationsraten, weshalb die Explantate für zwei bis drei Monate (bis zur Induktion der ersten PLBs) im Dunkeln kultiviert und erst dann in den Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden überführt wurden. In der Arbeit von KUO ET AL. (2005), in der somatische Embryonen aus Blattmaterial von *Phalaenopsis* regeneriert wurden, wurde ebenfalls in den ersten beiden Monaten auf Licht verzichtet. Erst dann wurden die Explantate bei einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden kultiviert. In weiteren Untersuchungen wurden *Phalaenopsis* für zwei Wochen (TANAKA UND SAKANASHI, 1980) und *Doritaenopsis* für eine Woche (PARK ET AL., 2002b) erfolgreich im Dunkeln inkubiert. PARK ET AL. (2002a) untersuchten in ihrer Arbeit die beste Belichtungsintensität für die Regeneration von PLBs aus Blattsegmenten von *Phalaenopsis* und fanden heraus, dass die geringste untersuchte Belichtungsstärke von  $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  die höchste Regenerationsrate bewirkte.

#### 4.2.2 Ausgangsmaterial für die Regeneration von PLBs

Die nächsten Optimierungsschritte lagen in der Auswahl des geeigneten Ausgangsmaterials für die Induktion der PLBs. Beim Vergleich von 2 und 5 mm langen Blattstreifen und abaxial und adaxial aufs Medium aufgelegten 1 cm Blattspitzen zeigten die adaxial aufgelegten Blattspitzen sowohl die höchste Regenerationsrate mit 35 % bei ON02 und 70 % bei OD01 als auch die größte Anzahl an PLBs je regenerierendem Explantat mit 6,3, bzw. 15,9 (Abb. 3.10 und Abb. 3.9). Dieses Ergebnis deckt sich sehr gut mit der Untersuchung bei *Oncidium* 'Gower Ramsey' (CHEN UND CHANG, 2002), bei der ebenfalls die Orientierung und Größe von Blattexplantaten untersucht wurde. Die 1 cm langen adaxial aufgelegten Blattspitzen ließen auch in deren Untersuchung die höchste Regenerationsrate und größte Anzahl an PLBs beobachten. Im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit war die Regenerationsrate von *Oncidium* 'Gower Ramsey' mit 75 % mit OD01 vergleichbar, allerdings doppelt so hoch wie ON02. Beim Vergleich der Anzahl PLBs je regenerierendem Explantat befindet sich *Oncidium* 'Gower Ramsey' mit 10,7 im Mittelfeld von ON02 und OD01. Diese Werte zeigen, dass die Regenerationsraten von PLBs wahrscheinlich abhängig vom Genotypen sehr unterschiedlich sein können.

Da bei der Untersuchung von *Oncidium* 'Gower Ramsey' (CHEN UND CHANG, 2002) zwischen den Positionen des Blattes - Blattspitze bis Blattbasis - unterschieden wurde, können die Regenerationsraten der 5 mm breiten Blattstreifen nur bedingt mit den Ergebnissen der

vorliegenden Arbeit verglichen werden. Beim Vergleich der Regenerationsraten der verschiedenen Blattexplantaten fällt allerdings auf, dass nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch bei CHEN UND CHANG (2002) bei den 5 mm breiten Blattstreifen eine deutlich geringere Regenerationsrate erzielt werden konnte als bei den 1 cm langen Blattspitzen. CHEN ET AL. (1999) verwendeten als Ausgangsmaterial auch 5 mm breite Blattstreifen, aus deren Schnittflächen sich so genannte "nodular masses" (durchscheinende, kugelige Strukturen) bildeten, die sich später zu PLBs weiterentwickelten. Die Weiterentwicklung dieser "nodular masses" zu PLBs konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Bei *Epidendrum radicans* konnte die Regeneration dieser "nodular masses" an Internodienabschnitten ebenfalls nachgewiesen werden. Die Weiterentwicklung derselben zu PLBs konnte allerdings meistens gar nicht außer bei dem Medium mit 0,45  $\mu$ M TDZ zu einem sehr geringen Teil beobachtet werden (CHEN ET AL. 2002). PARK ET AL. (2002b) verglichen bei *Doritaenopsis* die Regeneration von 1 und 5 mm breiten Blattstreifen und erzielten, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, bei den 1 mm breiten Blattstreifen deutlich höhere Regenerationsraten als bei den 5 mm breiten Blattstreifen. Dies kann durch den Unterschied in der Gattung bedingt sein.

In der Arbeit von KUO ET AL. (2005) bildeten sich PLBs vor allem an den Schnittflächen der Blattexplantate, während in dieser Arbeit die Regeneration vor allem auf der adaxialen Blattseite der Blattspitzen erfolgte (Abb. 3.9). Dieser bevorzugte Regenerationsort konnte auch bei CHEN UND CHANG (2002) aufgezeigt werden.

#### 4.2.3 Medienzusammensetzungen für die Regeneration und Vermehrung

Die Medienzusammensetzung kann entscheidend die Regenerationsraten von *Oncidium* und *Odontoglossum* beeinflussen. Bei einer Wahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  gab es signifikante Unterschiede bei den Verfestigungsmitteln Gelrite und Agar im Medium. Sowohl die Regenerationsrate als auch die mittlere Anzahl Embryonen pro Explantat waren beim mit Gelrite verfestigten Medium deutlich höher (Abb. 3.8). Dieses Ergebnis ist vermutlich auf die bessere Verfügbarkeit der Medienbestandteile in mit Gelrite verfestigten Nährböden zurückzuführen (HUANG ET AL., 1995). Eine weitere Hypothese für diese höheren Regenerationsraten von Explantaten auf mit Gelrite verfestigtem Medium wäre ein hemmender Effekt des Agars (KOHLENBACH UND WERNICKE, 1978) oder das Vorhandensein

von unerwünschten Bestandteilen im Agar aufgrund der Variabilität der Zusammensetzung (GEORGE, 1993) und der geographischen Herkunft (MCHUGH, 1991).

Als weiterer Optimierungsschritt wurde die Hormonzugabe im Medium untersucht. Dazu wurden verschiedene Cytokinine alleine und in Kombination mit einem Auxin verwendet. Ohne Hormonzugabe erfolgte keine Regeneration von PLBs. Keine Kombination an Phytohormonen im Medium erzielte bei allen Genotypen die beste Regeneration von PLBs, und es zeigten sich auch Unterschiede innerhalb der beiden Gattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* (Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Da auf dem Medium mit 4,5  $\mu\text{M}$  TDZ bei den meisten Genotypen sowohl die höchsten Regenerationsraten als auch die höchste Anzahl PLBs je Explantat erzielt werden konnte, wurde dieses für die Transformationsversuche herangezogen. Bei CHEN UND CHANG (2001, 2003) und SU ET AL. (2006) wurde bei *Oncidium* sogar eine Regeneration von bis zu 40 % bei Blattspitzen auf einem Medium ohne jegliche Hormonzugabe nachgewiesen. Bei den Arbeiten an *Phalaenopsis* (PARK ET AL., 2002a, KUO ET AL., 2005) konnte allerdings auch keine Regeneration auf hormonfreiem Medium beobachtet werden. Eine optimale Regenerationsrate bei Blattstücken von *Phalaenopsis* erfolgte bei einer Hormonzugabe von 88,8  $\mu\text{M}$  BAP, was eine enorm hohe Konzentration an Cytokinin darstellt, und 5,4  $\mu\text{M}$  NAA. Bei geringen Konzentrationen von 13,3  $\mu\text{M}$  BAP und 2,7  $\mu\text{M}$  NAA konnte keine Regeneration beobachtet werden (PARK ET AL., 2002a). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass in der vorliegenden Arbeit mit 4,4  $\mu\text{M}$  BAP die zu geringe Konzentration zu mangelnder Regeneration geführt haben kann, während das viel stärker wirkende TDZ in derselben Konzentration (4,5  $\mu\text{M}$ ) zu guten Ergebnissen führte. Diese These stützen auch Arbeiten an *Phalaenopsis* (KUO ET AL., 2005) und *Doritaenopsis* (PARK ET AL., 2002b), bei denen die Zugabe von 4,4  $\mu\text{M}$  BAP nicht annähernd gleich hohe Regenerationsraten aufzeigen konnte wie 4,5  $\mu\text{M}$  TDZ.

Meist werden zur Induktion der somatischen Embryogenese Auxine verwendet. So berichteten RAEMAKERS ET AL. (1995), dass 45 % der Arten in deren evaluierten Veröffentlichungen auf Auxinzugabe im Medium reagierten. GAJ (2004) gab an, dass die somatische Embryogenese bei über 80 % der veröffentlichten Protokolle über die Zugabe von Auxin alleine oder in Kombination mit Cytokinin erfolgte. Die meist verwendeten Auxine waren dabei 2,4-D und NAA (RAEMAKERS ET AL., 1995). Das in dieser Arbeit verwendete TDZ gehört dazu im Vergleich zur Gruppe der Phenylurea, seine Wirkung ähnelt aber der eines Cytokinins. TDZ wurde bisher sehr erfolgreich bei der Regeneration somatischer

Embryonen eingesetzt (GAIRI UND RASHID, 2004A, 2004B, PANINA ET AL., 2004, ZHANG ET AL., 2005).

Die Bildung von PLBs wird unter Zugabe von Auxinen bei Orchideen im Allgemeinen gehemmt (CHEN UND CHANG, 2001, 2006), während Cytokinine diese fördern. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch nach CHEN UND CHANG (2001) konnte das Hormon TDZ in einer Konzentration von 4,5  $\mu\text{M}$  als optimal für *Oncidium* nachgewiesen werden. Auch bei *Phalaenopsis* führte TDZ in den Konzentrationen 0,5 bis 13,5  $\mu\text{M}$  zu einer sehr guten Regenerationsrate, während die Zugabe der Auxine NAA oder 2,4-D im Medium zu einer starken Abnahme der Bildung von PLBs führte (KUO ET AL., 2005, CHEN UND CHANG, 2006).

Die Beobachtung der Regeneration von PLBs bei *Oncidium* nach bereits 20 bis 40 Tagen (CHEN UND CHANG, 2001, 2002, 2003, 2006, SU ET AL., 2006) steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der die Bildung von somatischen Embryonen frühestens nach 60 Tagen beobachtet werden konnte. Einige Genotypen brauchten mit bis zu 120 Tagen deutlich länger. Dieser Unterschied könnte allerdings auf die verschiedenen verwendeten Genotypen zurückzuführen sein, denn SU ET AL. (2006) beschrieben eine verzögerte Regeneration somatischer Embryonen um 10 bis 20 Tage beim Genotypen *Oncidium* 'Sweet Sugar', der auch hier Anwendung fand.

Für alle in dieser Arbeit untersuchten Genotypen von *Oncidium* und *Odontoglossum* wurde ein Protokoll zur Regeneration von PLBs über somatische Embryogenese etabliert. Bei den Genotypen ON02 und OD01 war das verwendete Protokoll besonders effizient und reproduzierbar.

Die regenerierten PLBs aus Blattspitzen wurden in Flüssigmedium kultiviert. Dabei wurde das zur Regeneration verwendete Medium mit 4,5  $\mu\text{M}$  TDZ und zum Vergleich ein Medium mit niedrigerer Konzentration von 1,4  $\mu\text{M}$  TDZ eingesetzt. Mit diesen Medien wurde nach vier Wochen bei der Frischmasse eine Vermehrungsrate von 2,5 bei OD01 bis zu 6,0 bei ON02 beobachtet (Abb. 3.13). Der prozentuale Anteil an Trockenmasse verhielt sich bei beiden Genotypen während der Wachstumskurve ähnlich, bei OD01 wurde der Höhepunkt nur etwas später erreicht (Tab. 3.2). Dieser deutlich höhere Zuwachs an Trockenmasse im Vergleich zur Frischmasse bei OD01 zeigt eine geringe Einlagerung von Wasser und flüssigem Medium der Zellen.

Die Zunahmen an Frischmasse unterschieden sich beim Vergleich der beiden Konzentrationen an TDZ im Medium nicht wesentlich (Abb. 3.13), weshalb das Medium mit 1,4  $\mu\text{M}$  TDZ aufgrund des mutagenen Potenzials von dauerhaften hohen Konzentrationen von TDZ bevorzugt wurde. Bei *Vanda* (MALABADI ET AL., 2004) wurde nachgewiesen, dass der längere Einfluss von TDZ sich negativ auf das Erscheinungsbild und die Entwicklung von PLBs und Sprossen auswirkte. Die PLBs entwickelten sich zu verbänderten und verformten Sprossen. Eine ähnliche Entwicklung konnte auch bei Bambus (SINGH ET AL., 2001) beobachtet werden.

Die Untersuchung der besten Konzentration an TDZ für die Subkultur und Vermehrung der PLBs von *Oncidium* 'Gower Ramsey', allerdings auf festem Medium, ließ die höchste Frischgewichtszunahme bei 1,4  $\mu\text{M}$  TDZ im Medium erkennen (CHEN ET AL., 1999). Bei *Phalaenopsis* wurden die Vermehrungsraten von PLBs auf festem Medium und in Flüssigkultur verglichen (PARK ET AL., 2002). Die Kultur auf festem Medium konnte mit einer durchschnittlichen Vermehrungsrate von 17,0 nach vier Wochen ein deutlich besseres Ergebnis als in Flüssigkultur (Vermehrungsrate von 5,8) verzeichnen. CHEN UND CHANG (2006) hingegen erzielten bei *Phalaenopsis* auf TDZ-haltigem festem Medium bei der Konzentration von 4,5  $\mu\text{M}$  eine Vermehrungsrate bezogen auf die Frischmasse von 3,1 im Vergleich zu 2,2 bei 0,4  $\mu\text{M}$  TDZ nach 45 Tagen Kulturdauer. Die Vermehrungsraten zerkleinerter PLBs von *Epidendrum* (CHEN ET AL., 2002) lagen nach neun Wochen bezogen auf die Frischmasse bei 9,6 auf festem Medium mit 1,4  $\mu\text{M}$  TDZ.

Die Entwicklung von PLBs zu Sprossen konnte bei *Oncidium* (CHEN ET AL., 1999, CHEN UND CHANG, 2000a, 2000b) auf hormonfreiem Medium nach drei bis vier Wochen und bei *Phalaenopsis* nach sechs bis acht Wochen (KUO ET AL., 2005, CHEN UND CHANG, 2006) beobachtet werden. Die Eignung des hormonfreien Mediums bezüglich der Sprossentwicklung wurde auch in der Diplomarbeit von KLEIN (2007) bestätigt und daher wurde es in dieser Arbeit verwendet.

Die Vermehrung von Sprossen erfolgte auf festem Medium unter Zugabe von 0,9 bis 8,8  $\mu\text{M}$  BAP und 1,1  $\mu\text{M}$  IAA oder 5,4  $\mu\text{M}$  NAA. Keines der verwendeten Medien konnte bei allen in dieser Arbeit untersuchten Genotypen von *Oncidium* und *Odontoglossum* die höchsten Vermehrungsraten erzielen. Tendenziell vermehrte sich allerdings *Oncidium* besser auf dem Medium mit 0,9  $\mu\text{M}$  BAP und 1,1  $\mu\text{M}$  IAA (1/2BI) und *Odontoglossum* auf 8,8  $\mu\text{M}$  BAP und

5,4  $\mu\text{M}$  mit MS-Salzen in halber und voller Konzentration (1/2BN, bzw. 1BN, Tab. 2.6, Abb. 3.7 und Abb. 3.6). Die *Odontoglossum*-Hybriden konnten außerdem etwas höhere Vermehrungsraten aufweisen als *Oncidium*.

Die Vermehrung von In-vitro-Sprossen wurde in den bisher genannten wissenschaftlichen Arbeiten nicht vorrangig untersucht, da als beste Vermehrungsmethode die Vermehrung von embryogenem Kallus in Betracht gezogen wurde. Einzig RAHMAN ET AL. (2005) untersuchten verschiedene Auxin- und Cytokininkonzentrationen zur Vermehrung von In-vitro-Sprossen von *Oncidium taka*. Dabei erzielte diese Arbeitsgruppe eine Vermehrungsrate von 9,4 auf einem MS-Medium unter Zugabe von 8,8  $\mu\text{M}$  BAP und 5,4  $\mu\text{M}$  NAA, das dem Medium 1BN der vorliegenden Arbeit entspricht. Allerdings waren die hier erzielten Vermehrungsraten von bis zu 3,3 in derselben Kulturzeit nicht annähernd so hoch wie bei RAHMAN ET AL. (2005). Die unterschiedlichen Vermehrungsraten können auf die Gattung *Oncidium taka* zurückzuführen sein. Die Unterschiede in den Vermehrungsraten unterschiedlicher Gattungen und Gattungshybriden konnten nämlich auch in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden.

#### 4.2.4 Bewurzelung von Sprosskulturen

Die Bewurzelung der In-vitro-Sprosse erfolgte in dieser Arbeit auf hormonfreiem Medium und es konnte eine Bewurzelungsrate von 100 % bei den verwendeten zwei *Oncidium*- und den sieben *Odontoglossum*-Genotypen (Kap. 2.1.1, Kap. 3.2.3) erzielt werden. Auch CHEN UND CHANG (2000b) konnten eine Wurzelbildung von Sprossen von *Oncidium* 'Gower Ramsey' auf hormonfreiem Medium nach zwei bis drei Wochen verzeichnen. Ebenfalls konnte auch auf Medium unter Zugabe von 2,7  $\mu\text{M}$  NAA nach zwei bis drei Wochen Wurzelinduktion bei *Oncidium* 'Gower Ramsey' und 'Sweet Sugar' beobachtet werden (CHEN ET AL., 1999, CHEN UND CHANG, 2000a). Bei *Oncidium taka* wurde die höchste Wurzelanzahl pro Spross auf einem Medium unter Zugabe von 8,1  $\mu\text{M}$  NAA erreicht (RAHMAN ET AL., 2005).

Es wurde in dieser Arbeit erfolgreich ein In-vitro-Protokoll zur Etablierung, Regeneration, Vermehrung und Bewurzelung von den hier untersuchten zwei *Oncidium*- und sieben *Odontoglossum*-Hybriden etabliert. Bei den Genotypen ON02 und OD01 war das verwendete Protokoll besonders effizient und reproduzierbar. Bei den restlichen Genotypen können einzelne Schritte noch optimiert werden.

### 4.3 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Gentransfer

Bei *Oncidium* wurde der indirekte Gentransfer mittels *Agrobacterium tumefaciens* bereits erfolgreich angewandt (LIAU ET AL., 2003A, 2003B, YOU ET AL., 2003). Neben dem *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer wurde auch der direkte Gentransfer über die Genkanone bei *Oncidium* 'Sharry Baby' angewendet (YOU ET AL., 2003, LI ET AL., 2005). Bei der Orchideengattung *Odontoglossum* wurden bislang keine wissenschaftlichen Arbeiten über eine genetische Transformation veröffentlicht.

Die heute bevorzugte Methode ist der Gentransfer mit Hilfe von *A. tumefaciens* wegen seiner hohen Effizienz und der gewünschten stabilen und *low copy* Integration des neuen Gens im Genom (ROY ET AL., 2000, SHOU ET AL., 2004, TRAVELLA ET AL., 2005, BHALLA ET AL., 2006). Aus diesen Gründen wurde auch in der vorliegenden Arbeit der indirekte Gentransfer mittels *A. tumefaciens* angewendet.

Aufgrund der Aufgabenstellung, der Verlängerung der Haltbarkeit der Blüten von *Oncidium* und *Odontoglossum*, wurde der mutierte Ethylenrezeptor *etr1-1* aus *Arabidopsis thaliana* (WILKINSON ET AL. 1997, HALL ET AL. 1999) unter Kontrolle des blütenspezifischen Promotors *fbp1* aus *Petunia hybrida* übertragen. Der Ansatz der genetischen Transformation mit dem mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* wurde bereits erfolgreich bei *Petunia* (WILKINSON ET AL., 1997, CLARK ET AL., 1999, GUBRIUM ET AL., 2000, CELVINGER ET AL., 2004), Nelken (BOVY ET AL., 1999), *Campanula* (SRISKANDARAJAH ET AL., 2004) und *Kalanchoe* (SANIKHANI ET AL., 2008) umgesetzt und führte bei den Pflanzen zu einer geringeren Ethylensensitivität.

#### 4.3.1 Transformationsmethode

Die Regeneration von PLBs aus Blattspitzen von *Oncidium* und *Odontoglossum* war sehr effizient und reproduzierbar (Kap. 3.2.4), weshalb die Transformation dieser Blattspitzen als erstes Verfahren des *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfers untersucht wurde.

Im GUS-Test (Abb. 3.17) zeigte sich die Lokalisierung der GUS-positiven Zellen genau an den Blattspitzen von ON02 und OD01, wo auch vorwiegend die Regeneration von PLBs stattfand (Abb. 3.9). Die Regeneration von PLBs aus den transformierten Blattspitzen erfolgte allerdings erst nach einem halben Jahr und war damit sehr langwierig. Die Entwicklung von potenziell transgenen Sprossen erfolgte bei keiner der Blattspitzen auf Selektionsmedium, da

die regenerierten PLBs nach Abschneiden der Blattspitze und Auflegen der PLBs direkt auf das Selektionsmedium abstarben. Die aus den Blattspitzen regenerierten PLBs wurden nicht mit Hilfe von PCR-Technik auf Insertion des gewünschten Gens ins pflanzliche Genom überprüft, da sie vorher abstarben.

Bisher wurde bei keiner wissenschaftlichen Arbeit die Transformation von Blattspitzen bei *Oncidium* untersucht, sondern immer PLBs als Ausgangsmaterial für den *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer herangezogen (LI ET AL., 2005, LIAU ET AL., 2003A, 2003B, YOU ET AL., 2003). Aufgrund des Vorwissens dieser Untersuchungen aus der Literatur und der Ergebnisse dieser Arbeit wurde die Transformation von Blattspitzen nicht weiter optimiert, sondern nach Alternativen (Kap. 3.3.5) gesucht.

Eine Alternative zur Transformation von Blattspitzen stellte die Transformation von PLBs dar. Dabei wurde der *A. tumefaciens*-vermittelte Gentransfer für PLBs in Flüssigkultur als auch auf Festmedium untersucht. Die Transformationsmethode der PLBs auf Festmedium (Tf, Tab. 2.8) orientierte sich an den Arbeiten von LIAU ET AL. (2003a, 2003b). Die Transformation von zerkleinerten PLBs in Flüssigkultur war aus der Sicht des Anwenders eine sehr einfache und schnelle Methode. Aus diesem Grund befassten sich die Versuche Tfv/fl (fest versus flüssig, Tab. 2.8) mit dem Vergleich der Transformation von PLBs in Flüssigkultur und auf Festmedium. Dabei wurden in den Versuchen bei den verschiedenen Behandlungen der Transformation auf die Medienvarianten fest versus flüssig bei der Vorkultur, Kokultur und Selektion (Tab. 2.9) und auf die Agrobakterienstämme EHA105 und LBA4404 (EHA/gus, EHA/etr, LBA/gus und LBA/etr, Tab. 2.11) geachtet. In den weiteren Versuchen wurden zusätzlich die Dichte ( $OD_{600}$ ) der Bakteriensuspension während der Inkubation und die Dauer der Kokultur von zwei bis drei Tagen untersucht (Tab. 2.10).

In den bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten zur Transformation von *Oncidium* wurden zerkleinerte PLBs als Ausgangsmaterial verwendet, transformiert wurden diese aber nicht in Flüssigkultur, sondern auf Festmedium (LIAU ET AL., 2003A, 2003B, YOU ET AL., 2003, LI ET AL., 2005). Aus diesem Grund können die Ergebnisse dieser Untersuchungen nicht mit dieser Arbeit verglichen werden.

Bei anderen Pflanzengattungen wurden embryogene Flüssigkulturen zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation herangezogen. Eine erfolgreiche Transformation von Suspensionskulturen wurde bei *Ipomoea* (Yu et al., 2007), *Bromus* (NAKAMURA UND

ISHIKAWA, 2006), *Lycopersicon* (VELCHEVA ET AL., 2005) oder *Triticum aestivum* (WEIR ET AL., 2001) durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass eine Transformation in Flüssigkultur möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mittels Ultraschallbehandlung und Vakuuminfiltration versucht, die Transformation von zerkleinerten PLBs in Flüssigkultur zu optimieren (Kap. 3.3.5).

Die Verwendung von PLBs als Ausgangsmaterial für die Transformation mittels *A. tumefaciens* wurde in der vorliegenden Arbeit als effizienteste Variante aufgezeigt (Tab. 3.6, Tab. 3.9, Tab. 3.11). Die erfolgreiche Transformation von PLBs wurde bereits bei *Oncidium*, *Cymbidium* und *Phalaenopsis* (BELARMINO UND MII, 2000, LIAU ET AL., 2003A, 2003B, YOU ET AL., 2003, CHIN ET AL., 2007) beschrieben. Damit erwiesen sich PLBs nicht nur bei *Oncidium*, sondern auch bei anderen Orchideengattungen als ein vielversprechendes Ausgangsmaterial für den *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer.

#### **4.3.2 Die Vorkultur**

Die Dauer der Vorkultur von PLBs auf Festmedium orientierte sich an LIAU ET AL. (2003A, 2003B), während diese bei den PLBs in Flüssigkultur entsprechend der zuvor untersuchten Regenerationskurve (Kap. 3.2.4) von einem bis sieben Tagen variiert wurde. Die Vorkultur von Explantaten vor der Inokulation mit *A. tumefaciens* führte bei vielen Pflanzengattungen zu einer deutlich höheren Transformationseffizienz (JACQ ET AL., 1993, ROBICHON ET AL., 1995). Dies beruht wahrscheinlich auf die bessere Übertragung der T-DNA, wenn die Zellen sich in einem aktiven Zellteilungsprozess befinden (VILLEMONT ET AL., 1997), der während der Vorkultur beginnt. Der Vergleich der Transformation mit und ohne Vorkultur zeigte bei vorkultivierten *Phalaenopsis*-Protokormen sehr deutlich eine Verbesserung in der Transformationseffizienz (MISHIBA ET AL., 2005).

#### **4.3.3 Die Inokulation und Kokultur**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Suspension während der Inokulation mit *A. tumefaciens* Acetosyringon zugegeben. Die Zugabe von Acetosyringon während der Inokulation aktiviert bekanntermaßen die *vir*-Gene von *A. tumefaciens* und leitet die Übertragung der T-DNA in die Pflanzenzelle ein (STACHEL ET AL., 1985). Orchideen haben die Fähigkeit, eigenständig

phenolische Verbindungen zu produzieren, wie beispielsweise bei *Dendrobium* nachgewiesen wurde (YU ET AL., 2001). Der fördernde Effekt von Acetosyringon während der Inokulation wurde bei der Transformation verschiedener Orchideengattungen wie *Oncidium*, *Cymbidium*, *Dendrobium* oder *Phalaenopsis* beschrieben (BELARMINO UND MII, 2000, MISHIBA ET AL., 2005, LIAU ET AL., 2003A, 2003B, MEN ET AL., 2003, YOU ET AL., 2003, CHIN ET AL., 2007). Aus den Beobachtungen der vorangegangenen Arbeiten kann darauf geschlossen werden, dass die von Orchideen produzierten phenolischen Substanzen nicht für die Aktivierung der *vir*-Gene ausreichen oder nach einer mehrtägigen Vorkultur nicht mehr produziert werden.

Während in bisherigen Arbeiten an *Oncidium* (LIAU ET AL., 2003A, 2003B, YOU ET AL., 2003) und *Dendrobium* (YU ET AL., 2001, MEN ET AL., 2003) wie auch in der vorliegenden Arbeit die PLBs auf Festmedium mit der *A. tumefaciens*-Suspension 30 Minuten inokuliert wurden, dauerte die Inkubation bei anderen Orchideengattungen weitaus länger. Bei *Cymbidium* erfolgte eine Inokulation mit *A. tumefaciens* für 7 Stunden (CHIN ET AL., 2007), bei *Phalaenopsis* dauerte diese Phase sogar bis zu zehn Stunden (BELAMINO UND MII, 2000, MISHIBA ET AL., 2005). Diese Arbeiten zeigen die unterschiedlichen Ansprüche der verschiedenen Orchideengattungen bei der Transformation mit *A. tumefaciens*. Die Dauer der Kokultur bei der Transformation von PLBs auf Festmedium wurde von den Arbeiten von LIAU ET AL. (2003a, 2003b) und YOU ET AL. (2003) übernommen, die bei der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von *Oncidium* eine Kokultur von drei Tagen als förderlich befanden. Derselbe Kokulturzeitraum von drei Tagen wurde auch bei *Cymbidium* (CHIN ET AL., 2007), *Dendrobium* (YU ET AL., 2001) und *Phalaenopsis* (MISHIBA ET AL., 2005, SJAHRIL UND MII, 2006) erfolgreich verwendet.

Die zerkleinerten PLBs in Flüssigkultur wurden nach der Vorkultur für zwei bis drei Tage mit der *A. tumefaciens*-Suspension kokultiviert (Tab. 2.9, Tab. 2.10). Die Auswertung des histochemischen GUS-Tests ergab bei allen durchgeführten Versuchen Tfvslf signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (Tab. 3.8, Tab. 3.10). Alle Behandlungen, bei denen die PLBs in Flüssigmedium vor- und kokultiviert wurde, und die Kokultur zwischen zwei bis drei Tagen variierte, zeigten eine deutlich geringere GUS-Expression auf als bei den auf Festmedium kokultivierten PLBs. Bei *Phalaenopsis* wurde eine embryogene Suspensionskultur zur Transformation mittels *A. tumefaciens* herangezogen (MISHIBA ET AL., 2005; SJAHRIL UND MII, 2006). Die Inkubation in Flüssigkultur dauerte bei der Arbeit von und SJAHRIL UND MII (2006) bis zu zehn Stunden, wobei sich eine zweistündige Inokulation als optimal herausstellte. Anschließend wurden die Zellen auf Festmedium plattiert und drei Tage

kokultiviert. Diese Untersuchung von SJAHRI UND MII (2006) zeigte sehr schön, dass eine zu lange Inokulation in Flüssigkultur sich negativ auf die Regeneration und Transformationseffizienz auswirkte. MISHIBA ET AL. (2005) hingegen inokulierten die *Phalaenopsis*-Protokorme in Flüssigkultur für sieben Stunden. Anschließend wurden die Protokome auch für drei Tage auf Festmedium kokultiviert. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit wurden die *Phalaenopsis*-Suspensionen bereits nach der Inokulation auf Festmedium plattiert. Die Transformationseffizienz mit dem Agrobakterienstamm EHA101 lag mit bis zu 1,9 % (MISHIBA ET AL., 2005) annähernd beim hier erzielten Ergebnis der Transformation auf Festmedium. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass in der vorliegenden Arbeit die zu lange Kokultur in Flüssigmedium bei den Varianten Tfvsl-A bis Tfvsl-C und Tfvsl-E bis Tfvsl-H (Tab. 3.8, Tab. 3.10) sich möglicherweise negativ auf die Transformationseffizienz ausgewirkt haben könnte.

#### 4.3.4 Der Agrobakteriumstamm

Die Auswertung des histochemischen GUS-Tests der Transformation von PLBs auf Festmedium ergab bei ON02 und OD01 einen deutlich höheren Anteil an GUS-positiv getesteten PLBs beim Bakterienstamm LBA4404, der sich damit für die Transformation von PLBs auf Festmedium als geeignet erwies (Tab. 3.4). OD04 zeigte beim Agrobakteriumstamm LBA4404 nach sechs Monaten im Vergleich zu ON02 und OD01 den geringsten prozentualen Anteil an GUS-positiven PLBs, bei ON01 konnte zu diesem Zeitpunkt keine GUS-Expression nachgewiesen werden (Tab. 3.5). Dieses Ergebnis verdeutlichte die genotypischen Unterschiede bei der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation. Auch bei *Cymbidium* wurden genotypische Unterschiede bei der Transformationseffizienz mit einem *gus*-Gen bei einem Gentransfer mittels *A. tumefaciens* beobachtet (CHIN ET AL., 2007). Es ist daher notwendig, für jeden Genotypen das Transformationsprotokoll zu optimieren.

Im Gegensatz zum histochemischen GUS-Test erwies sich bei der PCR-Analyse der Bakterienstamm EHA105 zum größten Teil als effizienter für die Integration ins pflanzliche Genom im Vergleich zu LBA4404 (Tab. 3.6). Dies deckt sich mit dem Ergebnis von LIAU ET AL. (2003 a), die beim Vergleich dieser beiden Agrobakterienstämme auch bei EHA105 mit 4,4 % eine deutlich höhere Transformationseffizienz nachwies als bei LBA4404 mit 1,2 %. Der Agrobakterienstamm EHA105 ist wegen seiner Supervirulenz als sehr effizient bekannt

(HOOD ET AL., 1993). Weitere Untersuchungen zur Transformation von *Oncidium* 'Sherry Baby cultivar OM8' zeigten eine Transformationsrate von 3,4 %, bzw. 2,4 % mit EHA105 (LIAU ET AL., 2003B, YOU ET AL., 2003) und waren damit mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Auch bei *Phalaenopsis* wurde ein Unterschied in der Transformationseffizienz bei Verwendung verschiedener Bakterienstämme beobachtet (BELARMINO UND MII, 2000). Dabei wies LBA4404 eine deutlich höhere Transformationseffizienz als EHA101 auf.

Bei der Transformation mit dem Plasmid pBEO210 wurden bei jedem Versuch niedrigere Transformationsraten erzielt als mit pBI121. Dies lässt sich möglicherweise mit der kürzeren zu übertragenden Genlänge des *gus*-Gens aus pBI121 im Vergleich zu *etr1-1* aus pBEO210 begründen. Die Länge des Gens *etr1-1* beträgt 4.481 bp im Vergleich zu den 1.812 bp des *gus*-Gens. Die Effizienz von Vektoren kann aufgrund ihres unterschiedlichen Aufbaus mit Markergenen, Zielgenen, Promotoren, Terminatoren und der *vir*-Region oder den Replikationsursprung auf dem „backbone“ variieren (KEMPEN UND KEMPEN, 2004).

Mit der Kombination des Plasmides pBEO210 und dem Agrobakterienstamm AGL0 regenerierten in der vorliegenden Arbeit keine transgenen Sprosse. Bei *Dianthus* hingegen wurde mit dem Vektor pBEO210 in AGL0 eine Transformationseffizienz von 5,8 % erzielt (BOVY ET AL., 1999). Auch bei *Campanula* war es möglich mit Hilfe dieser Vektor-Agrobakteriumstamm-Kombination transgene Pflanzen zu erzielen (SRISKANADARAJAH ET AL., 2007). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Agrobakterienstamm AGL0 oder der Vektor pBEO210 bei den hier transformierten Orchideengattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* nicht effizient arbeitete oder das Transformationsprotokoll entsprechend optimiert werden muss.

#### 4.3.5 Selektion

Die Integration von Fremd-DNA ins Pflanzengenom erfolgt nur in wenigen Zellen, weshalb die Identifizierung transgener Zellen von großer Bedeutung ist. Transgene Zellen werden durch den Transfer von Markergenen, meistens Antibiotika- oder Herbizidresistenzgenen, identifiziert. Die Unterscheidung transgener von nicht transformierten Zellen sollte einerseits zuverlässig und zum anderem zu einem möglichst frühen Zeitpunkt stattfinden, damit der Arbeitsumfang der nach der Transformation folgenden Gewebekultur nicht zu groß wird.

Außerdem sollte die Entwicklung von Chimären, bei denen ein Teil der Zellen nicht transgen ist, vermieden werden (NEUMANN, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Selektion das Markergen *nptII*, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin bewirkt (FRALEY ET AL., 1983), verwendet. Um eine effektive Selektion transgener Zellen bei gleichzeitiger Eliminierung nicht-transgener Zellen zu gewährleisten, wurden die geeigneten Konzentrationen des selektiven Agens Kanamycin ermittelt. Da verschiedene Transformationsprotokolle verwendet wurden, war es nötig, die geeignete Konzentration für Blattspitzenexplantate, PLBs auf festem Medium und PLBs in Flüssigmedium zu ermitteln. Die Konzentration von 300 mg/l Kanamycin im Medium wies sowohl bei den Blattspitzen (Abb. 3.14) als auch bei den PLBs in Flüssigkultur (Abb. 3.15) das gewünschte Ergebnis auf: die Regeneration war signifikant eingeschränkt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde angenommen, dass dies auch eine geeignete Konzentration für die PLBs auf Festmedium darstellte. Es konnte visuell beobachtet werden, dass sich die eingesetzte Dosis an Kanamycin nicht negativ auf die Entwicklung und den Wachstum transgener Pflanzen auswirkte.

Die in dieser Arbeit ermittelte letale Dosis an Kanamycin konnte mit keiner anderen wissenschaftlichen Arbeit der Gattung *Oncidium* verglichen werden, da in den Publikationen über die Transformation von *Oncidium* zur Selektion das Antibiotikum Hygromycin eingesetzt wurde (LIAU ET AL., 2003A, 2003B, YOU ET AL., 2003, LI ET AL., 2005). Zur Gattung *Odontoglossum* gab es bisher keinerlei wissenschaftlichen Arbeiten.

Der Vergleich mit anderen Orchideengattungen zeigte, dass die in dieser Arbeit ermittelte geeignete Selektionskonzentration von 300 mg/l Kanamycin höher war als beispielsweise bei *Dendrobium* mit 200 mg/l (YU ET AL., 2001) oder *Cymbidium* mit 100 mg/l (YANG ET AL., 1999). Die hier ermittelte geeignete Konzentration an Kanamycin war auch im Vergleich zu anderen Zierpflanzen weitaus höher. Bei *Petunia* wurde zur Selektion transgener Sprosse eine Konzentration von 20 mg/l (HUANG ET AL., 2007), bei *Pelargonium* von 50 mg/l (BOASE ET AL., 1998), bei *Dianthus* von 150 mg/l (ESTOPA ET AL., 2001) und bei *Campanula* von 100 mg/l Kanamycin (SRISKANADARAJAH ET AL., 2007) eingesetzt.

Kanamycin konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich als Selektionsagens eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse von Transformationsversuchen bei *Cymbidium* und *Dendrobium* Kanamycin als nicht geeignet für die Selektion potentiell transgener Pflanzen (CHIN ET AL., 2007, CHIA ET AL., 1994).

Das Antibiotikum Cefotaxim wird eingesetzt, um ein Auswachsen von *A. tumefaciens* während der Kulturphase nach der Transformation zu verhindern. Cefotaxim ist ein sehr weit verbreitetes Antibiotikum zur Unterdrückung von *A. tumefaciens*, da es bei einer Untersuchung von zehn verschiedenen Antibiotika als das effektivste gegen den *A. tumefaciens*-Stamm LBA4404 getestet wurde (SHACKELFORD UND CHLAN, 1996). Cefotaxim ist ein kostspieliges Antibiotikum, das in hohen Konzentrationen eingesetzt wird, weshalb in der vorliegenden Arbeit die Alternative Timentin im Vergleich zu Cefotaxim untersucht wurde. Der Vergleich der beiden Antibiotika zeigte, dass ein Medium mit 250 mg/l Timentin (Kap. 2.4.4) aufgrund der guten Wirkung und geringeren Kosten dem bisherigen Medium mit 500 mg/l Cefotaxim vorgezogen werden könnte. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von CHENG ET AL. (1998) und NAUERBY ET AL. (1997), die Timentin als vergleichbar effektiv in der Unterdrückung des Auswachsens von *A. tumefaciens* zu Cefotaxim nachwiesen. Im Gegensatz zur Untersuchung von CHENG ET AL. (1998), wurde in der vorliegenden Arbeit kein Auswachsen von *A. tumefaciens* nach Überführen der transgenen Sprosse auf Antibiotika-freies Medium beobachtet.

Timentin wurde beispielsweise bereits erfolgreich bei *Pelargonium* (BOASE ET AL., 1998) und *Dianthus* (ESTOPA ET AL., 2001) eingesetzt. Die Bewurzelung der transgenen Sprosse war bei den beiden genannten Untersuchungen auf Medium mit Timentin im Vergleich zu Cefotaxim-haltigen Medium sogar besser.

Kanamycin ist aufgrund seiner Eigenschaft als Antibiotikum als selektives Agens wegen der mangelnden Akzeptanz in der Öffentlichkeit nicht erwünscht. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auch eine Möglichkeit der positiven Selektion, die Selektionswirkung von Mannose, untersucht. Mannose kann von der Pflanze nicht verwertet werden. Wird die Pflanze mit dem Gen für Phosphomannose-Isomerase (*pmi*) transformiert, so kann Mannose in einen für die Pflanze metabolisierbaren Zucker umgewandelt und von dieser verwertet werden. In den hier vorliegenden Versuchen konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass mit zunehmender Konzentration an Mannose (0, 10, 20 und 30 g/l) im Medium T0G (siehe Kap.2.3.5), die Regeneration der zerkleinerten PLBs zu Sprosse eingeschränkt war (Abb. 3.16). Die PLBs verfärbten sich zunehmend braun und starben ab. Daher wurde die Selektionswirkung bei einer Konzentration von 30 g/l Mannose im Medium bestätigt und könnte für weitere Versuche mit einem geeigneten Vektor angewendet werden. Eine Selektion potentiell transgener Sprosse über Mannose wurde erstmals von JOERSBO ET AL.

(1999) und NEGROTTO ET AL. (2000) bei der Zuckerrübe, bzw. bei Mais untersucht und als effizientes positives Selektionssystem nachgewiesen. Die Transformation mit Phosphomannose-Isomerase (*pmi*) als Selektionsgen wurde beispielsweise bei *Torenia* mit einer letalen Konzentration von 20 g/l (LI ET AL., 2007), bei *Dianthus* mit 4 bis 6 g/l (ZHANG ET AL., 2005) oder bei *Malus* mit bis zu 10 g/l (DEGENHARDT ET AL., 2006) erfolgreich durchgeführt. Diese Arbeiten zeigen, dass die geeignete Konzentration an Mannose mit 30 g/l in der vorliegenden Arbeit höher lag. Allerdings kann man an den geeigneten Konzentrationen der verschiedenen Pflanzen sehen, dass die Toleranz gegenüber Mannose sehr unterschiedlich ist.

Das für die Transformation mit dem Gen Phosphomannose-Isomerase (*pmi*) benötigte Plasmid wurde von der Firma Syngenta konstruiert und patentiert. Für die Durchführung von Versuchen mit diesem Plasmid pNOV2819 an öffentlichen Institutionen ist es nötig, eine Nutzungsvereinbarung mit der Firma Syngenta zu treffen.

#### **4.3.6 Transformation mit Hilfe der Ultraschallbehandlung**

Die Dauer der Ultraschallbehandlung wirkte sich signifikant auf das Ergebnis des histochemischen GUS-Tests aus. Mit zunehmender Behandlungsdauer wurden auch mehr blau gefärbte Zellen erfasst (Tab. 3.12). Eine optimale Ultraschallbehandlung von 30 Sekunden ließ gemäß dem histochemischen GUS-Test eine deutlich bessere Transformationsrate erwarten. Der Nachweis auf Insertion der gewünschten Genr *etr1-1* und *gus* ins pflanzliche Genom mittels PCR-Technik ergab allerdings bei der Transformation mit Hilfe der Ultraschallbehandlung keine Integration der T-DNA.

Ein wichtiger Parameter der Ultraschallbehandlung ist die Dauer des Ultraschalls. TRICK UND FINER (1997) testeten die Dauer der Ultraschallbehandlung von 1-100 Sekunden und beobachteten mit steigender Dauer eine proportionale Zunahme an verwundeten Zellen und damit verbunden eine höhere transiente Transformationsrate. Diese Beobachtung wurde wie in der vorliegenden Arbeit auch bei *Phalaenopsis* (CHAN ET AL., 2003), *Dendranthema* (DA SILVA, 2005) und *Eucalyptus* (GONZALEZ ET AL., 2002) gemacht. Allerdings kann eine längere Ultraschallbehandlung die Zellen beträchtlich schädigen und damit die Regenerationsfähigkeit beeinträchtigen (JOERSBO UND BRUNSTEDT, 1992, DA SILVA, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beeinträchtigung der Regenerationsfähigkeit durch eine Ultraschallbehandlung nicht beobachtet werden. Allerdings könnte bei längeren

Behandlungsdauern als 60 Sekunden, wie hier maximal angewandt, eine verminderte Regeneration auftreten (CHAN ET AL., 2003, DA SILVA, 2005).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Ultraschallbehandlung ist die Wahl der Behandlung vor oder während der Inokulation mit *A. tumefaciens*. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde bei TRICK UND FINER (1997, 1998) die Ultraschallbehandlung nach der Zugabe der Bakteriensuspension zum Gewebematerial durchgeführt. Bei *Eucalyptus* (GONZALEZ ET AL., 2002) wurde die Ultraschallbehandlung vor und während der *A. tumefaciens*-Inokulation verglichen. Dabei führte nur die Ultraschallbehandlung vor der Inokulation zu einer signifikanten Verbesserung der Transformationseffizienz. Bei *Phalaenopsis* (CHAN ET AL., 2003) und *Dendranthema* (DA SILVA, 2005) wurde die Ultraschallbehandlung auch vor der Inokulation mit *A. tumefaciens* durchgeführt und es konnte dadurch eine deutlich verbesserte Transformationsrate nachgewiesen werden.

#### 4.3.7 Transformation mit Hilfe der Vakuuminfiltration

Die Auswertung des histochemischen GUS-Tests war bei Transformationsversuchen mit Hilfe einer Vakuuminfiltration von 1, 2 und 4 Minuten vielversprechend (Tab. 3.13) und ließ bessere Transformationsraten als bei der transformierten Kontrolle (0 Minuten) erwarten. Bei der Überprüfung der Sprosse mittels PCR-Technik wurde jedoch keine erfolgreiche Integration der gewünschten Gene *etr1-1* oder *gus* nachgewiesen.

Die Dauer der Vakuuminfiltration ist ein wichtiger Parameter für die Effizienz der Transformation. Bei *Coffea* (CANCHE-MOO ET AL., 2006) und *Musa* (ACERETO-ESCOFFIE ET AL., 2005) erzielte eine vierminütige, bei *Lens* (MAHMOUDIAN ET AL., 2002) eine 20-minütige und bei *Pinus* (CHARITY ET AL., 2002) eine fünfminütige Vakuuminfiltration deutlich bessere Transformationsraten als die Kontrolle. Die Behandlungsdauern der eben genannten wissenschaftlichen Arbeiten waren gleich lang wie die längste Vakuuminfiltration dieser Arbeit (4 Minuten) oder länger. Dies zeigt, dass die Behandlungsdauern dieser Arbeit möglicherweise zu kurz waren und aufgrund dessen keine transgenen Sprosse ermittelt werden konnten.

Die Vakuuminfiltration erfolgte gemäß der vorliegenden Arbeit nach der Inokulation mit *A. tumefaciens*. Die Untersuchungen in der Literatur zur genetischen Transformation mit Vakuuminfiltration hatten keine verminderte Regeneration zur Folge (CHARITY ET AL., 2002, MAHMOUDIAN ET AL., 2002, ACERETO-ESCOFFIE ET AL., 2005, CANCHE-MOO ET AL., 2006).

Auch in den hier durchgeführten Versuchen konnte keine Beeinträchtigung der Entwicklung von vakuuminfiltrierten Explantaten im Vergleich zu den nicht-transformierten Kontrollen beobachtet werden.

Bei *Raphanus* und *Phaseolus* wurde ein *A. tumefaciens*-vermittelter Gentransfer in einer Kombination von Ultraschallbehandlung und Vakuuminfiltration erfolgreich durchgeführt (LIU ET AL., 2005, PARK ET AL., 2005). Dabei wurde nach der Inokulation des Gewebes mit *A. tumefaciens* eine Ultraschallbehandlung von fünf Minuten vollzogen, gefolgt von einer fünfminütigen Vakuum Infiltration. Diese Kombination erzielte sehr gute Transformationsraten und könnte daher auch in weiteren Transformationsversuchen mit Explantaten von *Oncidium* und *Odontoglossum* untersucht werden.

#### 4.3.8 Molekulare Analysen

Bei der Transformation von PLBs auf Festmedium wurde eine Integration des gewünschten Gens ins pflanzliche Genom mittels PCR-Technik nachgewiesen (Tab. 3.6). Das Gen *etr1-1* wurde bei den Versuchen Tf1, Tf2, Tf3 und Tf4 erfolgreich ins Genom von ON02 mit einer Transformationseffizienz zwischen 0,1 % und 1,1 % integriert. Die Insertion des *gus*-Gens erfolgte bei allen drei Genotypen ON02, OD01 und OD04 mit einer Transformationseffizienz von bis zu 2,7 %, 1,3 % und 1,0 % (Tab. 3.6, Tab. 3.7) mit dem Agrobakterienstamm LBA4404. Beim Genotypen ON01 regenerierten keine Sprosse und daher konnte keine PCR-Analyse durchgeführt werden. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Transformationsraten für das *gus*-Gen decken sich sehr gut mit dem Ergebnis von LIAU ET AL. (2003a), die bei *Oncidium* 'Sherry Baby cultivar OM8' eine Transformationsrate von 1,2 % mit dem Agrobakterienstamm LBA4404 erzielten.

Bei beiden Versuchsreihen des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssigkultur und auf Festmedium konnte die Integration des gewünschten Gens *etr1-1* ins pflanzliche Genom mittels PCR-Technik nicht nachgewiesen werden (Tab. 3.9, Tab. 3.11). Die erfolgreiche Integration des *gus*-Gens hingegen wurde wiederholt bei den Behandlungen Tfvsl-D und Tfvsl-I, die sich entsprachen, bestätigt. Dieses Ergebnis zeigte eindeutig, dass die Transformationseffizienz bei der Transformation von PLBs auf Festmedium am höchsten war. Der Erfolg dieser Behandlung wurde sowohl durch den histochemischen GUS-Test als auch mittels PCR-Technik bestätigt.

Die Southern Blot-Analyse diente zum Nachweis der Integration des Transgens ins Pflanzengenom und der Untersuchung der Anzahl integrierter Genkopien im Genom. Die für den Verdau der genomischen DNA verwendeten sechs Basenpaar Restriktionsenzyme *PstI* und *PshAI* wurden danach ausgewählt, dass sie nur eine Erkennungssequenz in der T-DNA besitzen und daher sollte in Höhe der Plasmidgröße ein Hybridisierungssignal zu erkennen sein. Die nächste Schnittstelle des Enzyms liegt außerhalb der Plasmid-DNA zufällig verteilt im Genom von *Oncidium*. Daher liefert die ins Pflanzengenom integrierte T-DNA Banden variabler Größe von Plasmid- und pflanzlicher DNA. Bei vier transgenen Linien (Tab. 3.6) wurde die erfolgreiche Integration des Gens *etr1-1* mit dem blütenspezifischen Promotor *fbp* nachgewiesen (Abb. 3.20). Die großen Fragmente des Southern Blots entstanden aufgrund der großen Entfernung zur nächsten Schnittstelle der beiden Restriktionsenzyme. Der Southern Blot lässt auf eine singuläre Integration des Transgens schließen, auch wenn es bei der Größe des Fragments sehr schwer abschätzen ist. Die leichte Abweichung in der Größe der Banden beim Verdau mit *PshAI* deutete bei den Linien 1b bis 4b aus Abb. 3.20 auf unterschiedliche Integrationsorte der T-DNA hin.

Der Verdau der genomischen DNA mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *PshAI* war aufgrund der Größe der Banden nicht optimal, weshalb eine weitere Southern Blot Analyse mit dem Restriktionsenzym *BamHI* durchgeführt wurde (Abb. 3.21). Das Restriktionenzym *BamHI* besaß eine Schnittstelle inmitten der Sonde, weshalb bei einer singulären Insertion der T-DNA des *etr1-1*-Gens eine Bande bei 4,7 kb und bei > 5,2 kb zu erwarten war. Zwei der drei untersuchten transgenen Linien wiesen eine intakte singuläre Integration des Transgens *etr1-1* auf und bestätigten damit das Ergebnis des ersten Southern Blots. Bei der transgenen Linie 4 hingegen konnte nur eine der beiden notwendigen Banden nachgewiesen werden, was auf eine partielle Integration des Plasmides pBEO210 hindeutete. Die vierte im ersten Southern Blot als transgen bestätigte Linie konnte in der Wiederholung mit *BamHI* nicht getestet werden, da nicht genügend DNA vorhanden war.

LIAU ET AL. (2003A) wiesen in ihrer Arbeit bei der molekularen Untersuchung mittels Southern Blots bei sechs zufällig gewählten Genotypen eine singuläre Insertion des *gus*-Gens nach. Bei einer weiteren Untersuchung zur Transformation von *Oncidium* 'Sherry Baby cultivar OM8' wurde das *pflp*-Gen in einer Kopienzahl von ein bis dreimal im Genom nachgewiesen (LIAU ET AL., 2003B). Die Arbeitsgruppe YOU ET AL. (2003) hingegen zeigte

eine singuläre Integration des *pflp*-Gens bei fünf unabhängigen transgenen Linien von *Oncidium* 'Sherry Baby cultivar OM8' auf.

Eine partielle Integration oder eine Zerstörung von Teilen der T-DNA kann häufig beobachtet werden, da die T-DNA typischerweise entweder in ihrer vollen Länge oder als abgeschnittene Moleküle ins Genom integriert wird (TZFIRA ET AL., 2004). Eine partielle Integration des Plasmides pBEO210 wurde entsprechend der vorliegenden Untersuchung auch bei *Kalanchoe blossfeldiana* nachgewiesen (SANIKHANI ET AL., 2008).

Bei allen Transformationsversuchen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass eine große Anzahl von Pflanzen nur ein Teil der T-DNA, das *nptII* Gen, trug. Während bei älteren Binärvektoren wie dem hier verwendeten Vektor pBEO210 der Selektionsmarker neben der rechten Bordersequenz platziert ist, befindet sich bei neueren Entwicklungen der Marker neben der linken Bordersequenz (www.cambia.org). Da die Übertragung der T-DNA an der rechten Border beginnt (DE BUCK ET AL., 2000), wird dadurch die Regeneration von Pflanzen vermieden, die nur den Selektionsmarker und nicht das jeweilige Gen integriert haben. Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigten sich bereits mit der Theorie, dass auch nur Teile des Vektors ins pflanzliche Genom integriert werden können (VAN DER GRAAFF ET AL., 1996, WENCK ET AL., 1997, DE BUCK ET AL., 2000), da es vorher zu einem Abbruch der Übertragung der T-DNA kommen kann. Ein weiterer Grund für den viel häufigeren Nachweis des *nptII*-Gens im Vergleich zu den Genen *etr1-1* und *gus* kann aufgrund eines falsch positiven Ergebnisses der PCR entstanden sein. Die Verifizierung dieser Annahme ist allerdings aufgrund mangelnder DNA-Ausbeuten nicht möglich.

#### **4.4 Vergleich der DNA- und RNA-Isolierungsverfahren**

DNA wurde in erster Linie isoliert, um die Übertragung der gewünschten Gene ins pflanzliche Genom potenziell transgener Sprosse nachzuweisen. Die Methode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) erzielte im Vergleich mit den beiden anderen Protokolle hohe DNA-Ausbeuten. Aufgrund der einfachen und schnellen Durchführung ist dieses Verfahren empfehlenswert (Tab. 3.14). Ein weiterer Vorteil ist die geringe Einsatzmenge an Gewebematerial zu Beginn der Isolierung, da nicht immer genügend Ausgangsmaterial

vorhanden ist. Diese Methode stellt außerdem eine sehr preisgünstige Variante der DNA-Isolierung dar.

Die Qualität der mit der Methode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) isolierten DNA war sehr gut, diese konnte für den Southern Blot verwendet werden.

Die Isolierung von RNA wurde untersucht, um bei einer Untersuchung der Genexpression der transgenen In-vitro-Kulturen auf ein effizientes und reproduzierbares Verfahren zurückgreifen zu können.

Beim Vergleich der verschiedenen RNA-Isolierungsmethoden wurde das Verfahren nach MÜHLHARDT (2002) als jenes mit den höchsten Ausbeuten beobachtet (Tab. 3.15). Einziger Nachteil des Verfahrens waren die hohen Standardabweichungen beim Vergleich der Ausbeuten aus den einzelnen Isolierungen. Die stabilste Methode war jene nach KRIEG (1996). Vergleicht man allerdings die Einwaage zu Beginn der Isolierung, erkennt man, dass beim Verfahren nach KRIEG (1996) genügend Pflanzenmaterial vorhanden sein muss, um diese Art der Extraktion durchführen zu können. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist auch der Zeitaufwand, der mit drei Tagen Bearbeitungszeit doch als sehr zeitintensiv und langwierig zu beurteilen war.

#### **4.5 Klonierung von pCambiaPeMADS5etr1-1**

Die Klonierung eines neuen Vektors entstand aus der Überlegung, dass der Promotor des bereits vorhandenen Vektors pBEO210 aus der Petunie stammte und aufgrund der weit entfernten Verwandtschaft zu Orchideen die Befürchtung bestand, dass er in Orchideen schlecht oder nicht spezifisch genug exprimiert würde. Ein weiterer Grund war die Verwendung eines Plasmides, bei dem zuerst das jeweilige Gen und dann der Selektionsmarker übertragen wird. Es wird somit das Auftreten von Kanamycin-resistenten Pflanzen vermieden, die aufgrund eines Abbruches bei der von der RB ausgehenden DNA-Übertragung nur den Selektionsmarker enthalten (VAN DER GRAAFF ET AL., 1996, WENCK ET AL., 1997, DE BUCK ET AL., 2000).

Aufgrund der Notwendigkeit eines blütenspezifischen Promotors wurde das MADS-Box-Gen *PeMADS5* und dessen Promotor (Accessionsnummer AY496050) aus TSAI ET AL. (2004) für weitere Untersuchungen herangezogen. Dieses MADS-Box-Gen wird in den Petalen stark und

in den Sepalen, der Lippe und der Säule schwächer exprimiert. Weder im Stängel noch Spross, Blatt oder Wurzel konnte PeMADS5 in Expressionsanalysen nachgewiesen werden (TSAI ET AL., 2004). Der Promotor dieses Gens sollte sich daher sehr gut als blütenspezifischer Promotor eignen.

Für die Konstruktion des neuen Vektors pCambiaPeMADS5etr1-1 wurde zunächst die Promotorregion von PeMADS5 mittels *sticky end*-PCR (ZENG, 1998) amplifiziert und in das restringierte Plasmid pCambia 2300 ligiert (pCambiaPeMADS5). Die *sticky end*-PCR von ZENG (1998) wurde bereits erfolgreich zur Amplifizierung von Genen und Teilen von Genen mit angehängten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in Protein Expressionsvektoren oder Hefevektoren verwendet (VOTH ET AL., 2001, SHIH ET AL., 2002). Dieses Verfahren erlaubte das Anhängen von zwei verschiedenen Restriktionsschnittstellen in einem PCR-Ablauf und war daher sehr einfach und effektiv.

Im nächsten Schritt wurde das *etr1-1*-Gen aus pBEO210 in die "multiple cloning site" von pCambiaPeMADS5 kloniert. Das Ergebnis war der neue Vektor pCambiaPeMADS5etr1-1. Zur Überprüfung des korrekten Einbaus des Promotors und des Gens *etr1-1* wurde der Bereich des Promotors bis *etr1-1* sequenziert. Bis zur Base 1000 ergab die Sequenzierung eine sehr gute Übereinstimmung. Nach dieser Base wurden einige Unterschiede beobachtet (Abb. 3.24), die aufgrund einer mangelnden Sequenziergenauigkeit ab ungefähr 800 bp laut dem Anbieter (MWG Biotech) tolerierbar sind. Mit dem Vergleich der Sequenzen in Abb. 3.24 wurde der Übergang des Einbaus des Promotors aus *PeMADS5* und des *etr1-1*-Gens gezeigt und die erfolgreiche Klonierung bewiesen.

## 4.6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig ein Regenerationssystem und der *A. tumefaciens*-vermittelte Gentransfer für *Odontoglossum* entwickelt und etabliert. Die beiden Orchideengattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* wurden mit dem mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* aus *Arabidopsis* unter Kontrolle des blütenspezifischen Promotors *fbp* aus der Petunie transformiert. Aus den Transformationsversuchen wurden transgene Sprosse regeneriert. Damit wurde die Grundlage geschaffen, die Haltbarkeit der Blüten dieser Orchideengattungen langfristig und dauerhaft zu verlängern.

Das erfolgreiche Transformationsprotokoll stellt die Basis für weitere Optimierungsschritte dar. Anhand des bisherigen Protokolls können außerdem weitere Gene oder Promotoren mittels *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfers ins Pflanzengenom von *Oncidium* und *Odontoglossum* übertragen werden. Zum einen könnte ein blütenspezifischer Promotor aus den jeweiligen Gattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* zur gezielteren Expression von *etr1-1* in den neuen Vektor pCambiaPeMADS5etr1-1 (Kap. 3.5) kloniert werden. Das vorliegende Transformationsprotokoll könnte außerdem beispielsweise zur Transformation von Genen im Zusammenhang mit der Blütenfarbe verwendet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit mit dem mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* erfolgreich transformierten *Oncidium*-Sprosse stellen das Ausgangsmaterial dar, das klonal vermehrt, bewurzelt und ins Gewächshaus überführt werden kann. Nach entsprechender Kulturzeit können die blühenden Pflanzen auf ihre Ethylensensitivität und damit Expression des mutierten Ethylenrezeptors *etr1-1* überprüft werden. Zusätzlich könnten die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen transgenen *Oncidium*-Sprosse für Expressionsstudien der Funktion des Promotors *fbp* aus der Petunie in Orchideen herangezogen werden.

Der neue Transformationsvektor pCambiaPeMADS5etr1-1 kann in weiteren Transformationsversuchen untersucht werden. Zum einen sollte die spezifische Expression von *etr1-1* in den Blütenorganen der Orchideen *Oncidium* und *Odontoglossum* und die Funktion und Expression des Promotors PeMADS5 erforscht werden.

## 5 Zusammenfassung

Die beiden Orchideengattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* haben deutlich geringere Bedeutung als die Gattung *Phalaenopsis*. Ein wesentlicher Grund für diesen Unterschied in den Verkaufszahlen der beiden Gattungen *Oncidium* und *Odontoglossum* im Vergleich zu *Phalaenopsis* ist sicher die deutlich geringere Haltbarkeit der Blüten. Die geringe Haltbarkeit der Blüten ist unter anderem auf das Hormon Ethylen zurückzuführen, das eine wichtige Rolle bei der Seneszenz der Pflanzen spielt. In diesem Zusammenhang stellt auch die Anwesenheit anderer Pflanzen, die Ethylen produzieren, während des Transports und der Lagerung eine mögliche Beeinträchtigung der Qualität der Orchideen dar. Die Sensitivität von *Oncidium* und *Odontoglossum* gegenüber Ethylen wurde untersucht und sowohl die Blütenrispen als auch die Topfpflanzen können als sensitiv eingestuft werden. Die Knospen und Blüten der mit Ethylen behandelten Pflanzen fielen vorzeitig ab, die Blütenstängel und die Blätter vergilbten. Die Begasung mit  $1 \mu\text{L L}^{-1}$  Ethylen führte zur schnellsten Welke, darauf folgten die unbehandelte Kontrolle und die mit 1-MCP vorbehandelten Blütenstiele und Topfpflanzen unter Einfluss von Ethylen. Der Wirkstoff 1-MCP hingegen wirkte hemmend auf die Alterung von Blüten.

Eine langfristige Verbesserung der Haltbarkeit von *Oncidium* und *Odontoglossum* könnte durch die genetische Transformation mittels *A. tumefaciens* erzielt werden. Bei dem zu transformierenden Gen handelte es sich um den mutierten Ethylenrezeptor *etr1-1* aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle des blütenspezifischen Promotors *fbp1* aus *Petunia hybrida*. Voraussetzung dafür war zunächst die Etablierung eines effizienten Regenerationssystems. Es konnte in dieser Arbeit für zwei Genotypen von *Oncidium* und sechs Genotypen von *Odontoglossum* die Regeneration von „Protocorm like Bodies“ (PLBs) über somatische Embryogenese gezeigt werden. Die mit adaxialer Seite auf das Medium aufgelegten Blattspitzen regenerierten im Allgemeinen am besten im Dunkeln auf TDZ-haltigem Medium, das durch Gelrite verfestigt wurde. Die Regenerationsraten und mittleren Anzahlen an PLBs waren sehr heterogen. Die höchsten Regenerationsraten erzielten *Oncidium* 'Sweet Sugar' und die *Odontoglossum*-Hybride 'Stirling Tiger' mit 83, bzw. 79%.

Sowohl die Blattspitzen als auch die PLBs wurden als Ausgangsmaterial für die genetische Transformation mittels *A. tumefaciens* herangezogen. Die Blattspitzen erwiesen sich nicht geeignet, da keine transformierten Sprosse regeneriert werden konnten. Der Ansatz der Transformation von PLBs war vielversprechender. In Transformationsversuchen mit PLBs

auf Festmedium wurden Transformationsraten von bis zu 1,1 % mit dem *etr1-1*-Gen (EHA105 mit pBEO210) und bis zu 2,7 % mit dem *gus*-Gen (LBA4404 mit pBI121) erreicht. Beim Vergleich der verwendeten Agrobakterien-Stämme wurden beim GUS-Test mit LBA4404 mehr transgene Sprosse detektiert, bei der PCR-Analyse zeigte EHA105 einen höheren prozentualen Anteil transgener Explantate. Insgesamt wurden aus den zahlreichen Transformationsversuchen 93 GUS-positive transgene Linien und fünf transgene Linien mit erfolgreich integriertem *etr1-1*-Gen mittels PCR-Analyse nachgewiesen. Bei drei der fünf transgenen Linien wurde ein Southern Blot durchgeführt und diese Untersuchung konnte das Ergebnis aus der PCR-Analyse bestätigen.

Der zusätzlich neu konstruierte Vektor pCambiaPeMADS5etr1-1, bei dem der mutierte Ethylenrezeptor *etr1-1* unter die Kontrolle des blütenspezifischen Promotors *PeMADS5* aus *Phalaenopsis equestris* eingebracht wurde, steht für weitere Versuche zur Verfügung.

In dieser Arbeit konnte erfolgreich sowohl ein effizientes und zuverlässiges Regenerationssystem als auch ein Transformationssystem mittels *A. tumefaciens* für *Oncidium* und *Odontoglossum* etabliert werden.

## 6 Literatur

- Abeles, F.B., 1973. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York.
- Acereto-Escoffie, P.O.M., Chi-Manzanero, B.H., Echeverria-Echeverria, S., Grijalva, R., Kay, A.J., Gonzalez-Estrada, T., Castano, E., Rodriguez-Zapata, L.C., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. "Grand Nain" scalps by vacuum infiltration. *Scientia Hort.* 105, 359-371.
- Belarmino, M.M., Mii, M., 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Rep.* 19, 435-442.
- Bhalla, P.L., Ottenhof, H.H., Singh, M.B., 2006. Wheat transformation - an update of recent progress. *Euphytica* 149 (3), 353-366.
- Boase, M.R., Bradley, J.M., Borst, N.K., 1998. An improved method for transformation of regal pelargonium (*Pelargonium Xdomesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 139, 59-69.
- Bovy, A.G., Angenent, G.C., Dons, H.J.M., van Altvorst, A.C., 1999. Heterologous expression of the *Arabidopsis etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. *Mol Breeding* 5, 301-308.
- Brandt, P., 2004. Transgene Pflanzen: Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel Boston Berlin.
- Brandt, P., 2001. Die neue Generation von Marker-Genen zum frühen Erkennen von gentechnisch veränderten Pflanzen. *Bundesgesundheitsblatt* 12, 1188-1193.
- Canche-Moo, R.L.R., Ku-Gonzalez, A., Burgeff, C., Loyola-Vargas, V.M., Rodriguez-Zapata, L.C., Castano, E., 2006. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 84, 373-377.
- Celvenger, D.J., Barret, J.E., Klee, J.H., Clark, D.G., 2004. Factors affecting seed production in transgenic ethylene-insensitive Petunias. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129, 401-406.
- Chan, Y.L., Chen, W.H., Chan, M.T., 2003. *Phalaenopsis* orchid gene transformation (I) - optimization of transient gene expression. *J. Chinese Soc. Hortic. Sci.* 49 (1), 33-44.
- Chang, C.H., Lee, N., Chang, T.H., 2003. Flower and bud wilting of potted *Phalaenopsis* caused by ethylene and darkness. *J. Chinese Soc. Hortic. Sci.* 49, 173-182.
- Charity, J.A., Holland, L., Donaldson, S.S., Grace, L., Walter, C., 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum-infiltration. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 70, 51-60.
- Chen, J.T., Chang, W.C., 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biol. Plantarum* 50 (2), 169-173.

- Chen, J.T., Chang, W.C., 2004. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 79, 315-320.
- Chen, J.T., Chang, W.C., 2003a. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. *Biol. Plant.* 46 (3), 455-458.
- Chen, J.T., Chang, W.C., 2003b. Effects of GA<sub>3</sub>, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium* in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72, 105-108.
- Chen, J.T., Chang, W.C., 2002. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69, 41-44.
- Chen, J.T., Chang, W.C., 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Growth Regul.* 34, 229-232.
- Chen, J.T., Chang, W.C., 2000a. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (*Orchidaceae*). *Plant Sci.* 160 (2160), 87-93
- Chen J.T., Chang, W.C., 2000b. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium* Sweet Sugar. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 62, 95-100.
- Chen, J.T., Chang, C., Chang, W.C., 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 19, 143-149.
- Chen, L.R., Chen, J.T., Chang, W.C., 2002. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38, 441-445.
- Chen, W.H., Chen, T.M., Fu, Y.M., Hsieh, R.M., Chen, W.S., 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 18, 7-13.
- Cheng, Z.M., Schnurr, J.A., Kapaun, J.A., 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Rep.* 17, 646-649.
- Chia, T.F., Chan, Y.S., Chua, N.H., 1994. The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* transformation. *Plant J.* 6, 441-446.
- Chin, P.C., Mishiba, K., Mii, M., 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cymbidium*. *Plant Cell Rep.* 26, 735-743.
- Clark, D.G., Gubrium, E.K., Barret, J.E., Neil, T.A., Klee, J.K., 1999. Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiol.* 121, 53-59.
- Da Silva, J.A.T., 2005. Effective and comprehensive chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflora*) regeneration and transformation protocols. *Biotechnology* 4 (2), 94-107.
- De Buck, S., De Wilde, C., van Montagu, M., Depicker, A., 2000. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 6, 459-468.

- De Kathen, A., Jacobsen, H.J., 1995. Cell competence for *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in *Pisum sativum* L. *Transgenic Research* 4 (3), 184-191.
- Degenhardt, J., Poppe, A., Montag, J., Szankowski, I., 2006. The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Rep.* 25, 1149-1156.
- Dorokhov, D.B., Klocke, E., 1997. A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Genetika Moskva* 33(4), 443-450.
- Estopa, M., Marfa, V., Mele, E., Messeguer, J., 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65, 211-220.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C., 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 (15), 4803-4807.
- Gairi, A., Rashid, A., 2004a. Direct differentiation of somatic embryos on different regions of intact seedlings of *Azadirachta* in response to thidiazuron. *J. Plant Physiol.* 161, 1073-1077.
- Gairi, A., Rashid, A., 2004b. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 76, 29-33.
- Gaj, M.D., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Reg.* 43, 27-47.
- George, E.F., 1993. *Plant propagation by tissue culture. Exegetics*, Basingstoke.
- Gubrium, E.K., Celvenger, D.J., Clark, D.G., Barret, J.E., Neil, T.A., 2000. Reproduction and horticultural performance of transgenic ethylene-insensitive *Petunias*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 125, 277-281.
- Gonzalez, E.R., de Andrade, A., Bertolo, A.L., Lacerda, G.C., Carneiro, R.T., Defavari, V.A.P., Labate, M.T.V., Labate, C.A., 2002. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. *Funct. Plant Biol.* 29, 97-102.
- Hall, B.P., Shakeel, S.N., Schaller, G.E., 2007. Ethylene receptors: ethylene perception and signal transduction. *J. Plant Growth Regul.* 26, 118-130.
- Heyes, J.A., Johnston, J.W., 1998. 1-Methylcyclopropene extends *Cymbidium* orchid vase life and prevents damaged pollinia from accelerating senescence. *New Zeal. J. Crop and Hortic. Sci.* 26(4), 319-324.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, 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 (5913), 179-180.

- 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. *J. Bacteriol.* 168 (3), 1291-1301.
- Hsu, H.F., Huang, C.H., Chou, L.T., Yang, C.H., 2003. Ectopic expression of an orchid (*Oncidium* 'Gower Ramsey') *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44, 783-794.
- Huang, C.C., 1998. Ethylene production of *Oncidium* flower and the change of flower quality affected by ethylene treatment and pollinia cap removal. *J. Agric. Res. of China* 47(2), 125-134.
- Huang, C.C., Tu, W.C., Chen, H.Y., Tsai, C.Y., Lai, S.F., Huang, H.S., 2003. Effect of 'TARI's oncl' and 1-MCP on the quality of *Oncidium* cut flowers after simulated transportation and quarantine fumigation. *J. Chinese Soc. of Hortic. Sci.* 49(1), 55-62.
- Huang, C.C., Wang, T.T., Huang, H.S., 1999. Role of ethylene in the early senescence of chilling injured *Phalaenopsis* floret. *J. Agric. Res. of China* 48(3), 84-100.
- Huang, L.C., Kohashi, C., Vangundy, R., Murashige, T., 1995. Effects of common components on hardness of culture media prepared with gelrite. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31, 84-89.
- Huang, L.C., Lai, U.L., Yang, S.F., Chu, M.J., Kuo, C.I., Tsai, M.F., Sun, C.W., 2007. Delayed flower senescence of *Petunia hybrida* plants transformed with antisense broccoli ACC synthase and ACC oxidase genes. *Postharvest Biol. Technol.* 46, 47-53.
- Jacq, B., Lesobre, O., Sangwan, R.S., Sangwan-Norreel, B.S., 1993. Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarbeet. *Plant Cell Rep.* 12, 621-624.
- Jefferson, R.A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405.
- Joersbo, M., Brunstedt, J., 1992. Sonication: A new method for gene transfer to plants. *Physiol. Plant.* 85, 230-234.
- Joersbo, M., Petersen, S.G., Okkels, F.T., 1999. Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiol. Plantarum* 105, 109-115.
- Kanika, Vij S.P., 2003. Regeneration competence of *Oncidium* Gower Ramsey pseudobulb segments. *Crop Res.* 25 (3), 495-497.
- Kempken, F., Kempken, R., 2004. *Gentechnik bei Pflanzen*. 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg.
- Ketsa, S., Luangsuwalai, K., 1996. The relationship between 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in pollinia, ethylene production and senescence of pollinated *Dendrobium* orchid flowers. *Postharvest Biol. Technol.* 8(1), 57-64.

- Ketsa, S., Rugkong, A., 1999. Senescence of *Dendrobium* 'Pompadour' flowers following pollination. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 74(5), 608-613.
- Ketsa, S., Rugkong, A., 2000. Ethylene production, senescence and ethylene sensitivity of *Dendrobium* 'Pompadour' flowers following pollination. J. Hortic. Sci. Biotechnol 75(2), 149-153.
- Klein, A., 2007. Untersuchungen zur Sprossinduktion in vitro und zur Akklimatisierung von *Oncidium* und *Odontoglossum*. Diplomarbeit
- Kohlenbach, H., Wernicke, W., 1978. Investigations on the inhibitory effect of agar and function of active carbon in anther culture. Z. Pflanzenphysiol. 86, 463-472.
- Krieg, P.A., 1996. A laboratory guide to RNA. Isolation, analysis and synthesis. Wiley, Lissabon.
- Kuo, H.L., Chen J.T., Chang, W.C., 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 41, 453-456.
- Lazo, G.R., Stein, P.A., Ludwig, R.A., 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. BioTechnology 9, 963-967.
- Li, H.Q., Kang, P.J., Li, M.L., Li, M.R., 2007. Genetic transformation of *Torenia fournieri* using the PMI/mannose selection system. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 90, 103-109.
- Li, S.H., Kuoh, C.S., Chen, Y.H., Chen, H.H., Chen, W.H., 2005. Osmotic sucrose enhancement of single-cell embryogenesis and transformation efficiency in *Oncidium*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81, 183-192.
- Liau, C.H., You, S.J., Prasad, V., Hsiao, H.H., Lu, J.C., Yang, N.S., Chan, M.T., 2003a. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. Plant Cell Rep. 21, 993-998.
- Liau, C.H., Lu, J.C., Prasad, V., Hsiao, H.H., You, S.J., Lee, J.T., Yang, N.S., Huang, H.E., Feng, T.Y., Chen, W.H., Chan, M.T., 2003b. The sweet pepper ferredoxin-like protein (*pflp*) conferred resistance against soft rot disease in *Oncidium* orchid. Transgenic Res. 12, 329-336.
- Lin, H.H., Lee, N., Chang, T.H., 2003. Effects of ethylene and 1-MCP pretreatment on flower wilting of potted *Phalaenopsis amabilis* var. Formosa Shimadzu. J. Chinese Soc. Hortic. Sci. 49(2), 199-210.
- Liu, Z., Park, B.J., Kanno, A., Kameya, T., 2005. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *lea* gene. Mol. Breeding 16, 189-197.
- Lu, Z.X., Wu, M., Loh, C.S., Yeong, C.Y., Goh, C.J., 1993. Nucleotide sequence of flower-specific MADS box cDNA clone from orchid. Plant Mol. Biol. 23, 901-904.

- Macnish, A.J., Simons, D.H., Joyce, D.C., Faragher, J.D., Hofman, P.J., 2000. Response of native Australian cut flowers to treatment with 1-Methylcyclopropene and ethylene. *HortScience* 35(2), 254-255.
- Mahmoudian, M., Yücel, M., Öktem, H.A., 2002. Transformation of lentil (*Lens culinaris* M.) cotyledonary nodes by vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20, 251-257.
- Malabadi, R.B., Mulgrund, G.S., Nataraja, K., 2004. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76, 289-293.
- McHugh, D.G., 1991. Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. *Hydrobiologia* 221, 19-29.
- Men, S., Ming, X., Liu, R., Wei, C., Li, Y., 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 75, 63-71.
- Mishiba, K., Chin, D.P., Mii, M., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. *Plant Cell Rep.* 24, 297-303.
- Mor, Y., Reid, M.S., Kofranek, A.M., 1984. Pulse treatments with silver thiosulfate and sucrose improve the vase life of sweet peas. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 109(6), 866-868.
- Mühlhardt, C., 2002. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 3. Aufl. Spektrum Heidelberg Berlin.
- Müller, R., Sisler, E.C., Serek, M., 2000. Stress induced ethylene production, ethylene binding, and the response to the ethylene action inhibitor 1-MCP in miniature roses. *Scientia Hort.* 83, 51-59.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- Mußmann, V., Serek, M., Winkelmann, T., 2006. Interaktion von *Agrobacterium tumefaciens* mit der Selektionswirkung von Phosphinothricin. *J. Verbr. Lebensm.* 1, 134-139.
- Nakamura, T., Ishikawa, M., 2006. Transformation of suspension cultures of bromegrass (*Bromus inermis*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 84, 293-299.
- Nauerby, B., Billing, K., Wyndaele, R., 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxim in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 123, 169-177.
- Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R., Hansen, G., 2000. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19, 798-803.
- Neumann, K.H., 1995. *Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen*. Ulmer, Stuttgart.

- Panina, M., Senaratna, T., Dixon, K.W., Sivasithamparam, K., 2004. The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the Restionaceae. *Aust. J. Bot.* 52, 257-267.
- Park, B.J., Liu, Z., Kanno, A., Kameya, T., 2005. Transformation of radish (*Raphanus sativus* L.) via sonication and vacuum infiltration of germinated seeds with *Agrobacterium* harboring a group 3 LEA gene from *B. napus*. *Plant Cell Rep.* 24, 494-500.
- Park, S.Y., Murthy, H.N., Paek, K.Y., 2002a. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38, 168-172.
- Park, S.Y., Yeung, E.C., Chakrabarty, D., Paek, K.Y., 2002b. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Rep.* 21, 46-51.
- Philosoph-Hadas, S., Golan, O., Rosenberger, I., Salim, S., Kochanek, B., Meir, S., 2005. Efficiency of 1-MCP in neutralizing ethylene effects in cut flowers and potted plants following simultaneous or sequential application. *Acta Hort.* 669, 321-328.
- Porat, R., Borochoy, A., Halevy, A.H., O' Neill, S.D., 1994. Pollination-induced senescence of *Phalaenopsis* petals. The wilting process, ethylene production and sensitivity to ethylene. *Plant Growth Regul.* 15(2), 129-136.
- Porat, R., Shlomo, E., Serek, M., Sisler, E.C., Borochoy, A., 1995. 1-Methylcyclopropene inhibits ethylene action in cut phlox flowers. *Postharvest Biol. Technol.* 6, 313-319.
- Raemakers, C.J.J.M., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81, 93-107.
- Rahman, S.M.M., Islam, M.S., Sen, P.K., Begum, F., 2005. *In vitro* propagation of *Oncidium taka*. *Biotechnology* 4 (3), 225-229.
- Robichon, M.P., Renou, J.P., Jalouzot, R., 1995. Genetic transformation of *Pelargonium x hortorum*. *Plant Cell Rep.* 15, 63-67.
- Roy, M., Jain, R.K., Rohila, J.S., Wu, R., 2000. Production of agronomically superior transgenic rice plants using *Agrobacterium* transformation methods: present status and future perspectives. *Current Science* 79 (7), 954-960.
- Saltveit, M.E.Jr., 1978. Simple apparatus for diluting and dispensing trace concentrations of ethylene in air. *HortScience* 13, 249-251.
- Sanikhani, M., Mibus, H., Stummann, B.M., Serek, M., 2008. *Kalanchoe blossfeldiana* plants expressing the *Arabidopsis etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep.* 27, 729-737.
- Serek, M., Sisler, E.C., Reid, M.S., 1994. Novel gaseous ethylene binding inhibitor prevents ethylene effects in potted flowering plants. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 199, 1230-1233.
- Serek, M., Sisler, E.C., Reid, M.S., 1995a. Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flowers. *Plant Growth Regul.* 16, 93-97.

- Serek, M., Sisler, E.C., Tirosh, T., Mayak, S., 1995b. 1-Methylcyclopropene prevents bud, flower, and leaf abscission of Geraldton waxflower. *HortScience* 30(6), 1310.
- Serek, M., Sisler, E.C., 2001. Efficacy of ethylene binding in improvement of the postharvest characteristics of potted flowering plants. *Postharvest Biol. Technol.* 23, 161-166.
- Serek, M., Woltering, E.J., Sisler, E.C., Frello, S., Sriskandarajah, S., 2006. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnol. Advances* 24(4), 368-381.
- Sexton, R., Porter, A.E., Littlejohns, S., Thain, S.C., 1995. Effects of diazocyclopentadiene (DACP) and silver thiosulfate (STS) on ethylene regulated abscission of sweet pea flowers (*Lathyrus odoratus L.*). *Annals of Botany* 75, 337-342.
- Shackelford, N.J., Chlan, C.A., 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14, 50-57.
- Shih, Y.P., Kung, W.M., Chen, J.C., Yeh, C.H., Wang, A.H.J., Wang, T.F., 2002. High-throughput screening of soluble recombinant proteins. *Protein Science* 11, 1714-1719.
- Shou, H.X., Frame, B.R., Whitham, S.A., Wang, K., 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 13 (2), 201-208.
- Singh, M., Jaiswal, U, Jaiswal, V.S., 2001. Thidiazuron - induced shoot multiplication and plant regeneration in bamboo (*Dendrocalamus strictus Nees*). *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 10, 133-137.
- Sisler, E.C. and Serek, M., 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant.* 100, 577-582.
- Sjahril, R., Mii, M., 2006. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* using meropenem, a novel antibiotic to eliminate *Agrobacterium*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 81 (3), 458-464.
- 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.
- Sriskandarajah, S., Mibus, H., Serek., M., 2007. Transgenic *Campanula carpatica* plants with reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep.* 26, 805-813.
- Su, Y.J., Chen, J.T., Chang, W.C., 2006. Efficient and repetitive production of leaf-derived somatic embryos of *Oncidium*. *Biol. Plant.* 50 (1), 107-110.
- Tanaka, M., Sakanishi, Y., 1980. Clonal propagation of *Phalaenopsis* through tissue culture. In: Kashemsanta, M.R.S., ed. *Proc. 9th World Orchid Conference*, Bangkok, 215-221.
- Travella, S., Ross, S.M., Harden, J., Everett, C., Snape, J.W., Harwood, W.A., 2005. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep.* 23 (12), 780-789.

- Trick, H.N., Finer, J.J., 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep.* 17, 482-488.
- Trick, H.N., Finer, J.J., 1997. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Res.* 6, 329-336.
- Tsai, W.C., Kouh, C.S., Chuang, M.H., Chen, W.H., Chen, H.H., 2004. Four *DEF*-like MADS Box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Physiol.* 45, 831-844.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B., Citovsky, V., 2004. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet.* 20, 375-383.
- Van der Graaff, E., den Dulk-Ras, A., Hooykaas, P.J.J., 1996. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol. Biol.* 31, 677-681.
- Velcheva, M., Faltin, Z., Flaishman, M., Eshdat, Y., Perl, A., 2005. A liquid culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.). *Plant Science* 168, 121-130.
- Villemont, E., Dubois, F., Sangwan, R.S., Vasseur, G., Bourgeois, Y., Sangwan-Norrel, B.S., 1997. Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* 201, 160-172.
- Voth, W.P., Richards, J.D., Shaw, J.M., Stillman, D.J., 2001. Yeast vectors for integration at the *HO* locus. *Nucleic Acids Res.* 29 (12), e59.
- Weber, S., Friedt, W., Landes, N., Molinier, J., Himber, C., Rousselin, P., Hahne, G., Horn, R., Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. *Plant Cell Rep.* 21, 475-482.
- Weir, B., Gu, X., Wang, M., Upadhyaya, N., Elliott, A.R., Brettell, R.I.S., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using cell suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visual marker. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 807-818.
- Wenck, A., Czakó, M., Kanevski, I., Márton, L., 1997. Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 34, 913-922.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Clark, D.G., Bleecker, A.B., Chang, C., Meyerowitz, E.M., 1997. A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nat. Biotechnol.* 15, 444-447.
- Winkelmann, T., Geier, T., Preil, W., 2006. Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tissue Organ* 86, 319-327.
- Woltering, E.J., van Doorn, W.G., 1988. Role of ethylene in senescence of petals; morphological and taxonomical relationship. *J. Exp. Bot.* 39, 1605-1615.

- Wu, I.F., Chen, J.T., Chang, W.C., 2004. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77, 107-109.
- Yang, J., Lee, H.J., Shin, D.H., Oh, S.K., Seon, J.H., Paek, K.Y., Han, K.H., 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 18, 978-984.
- You, S.J., Liao, C.H., Huang, H.E., Feng, T.Y., Prasad, V., Hsiao, H.H., Lu, J.C., Chan, M.T., 2003. Sweet pepper ferredoxin-like protein (*pf1p*) gene as novel selection marker for orchid transformation. *Planta* 217, 60-65.
- Yu, B., Zhai, H., Wang, Y., Zang, N., He, S., Liu, Q., 2007. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 90, 265-273.
- Yu, H., Goh, C.J., 2000. Identification and Characterization of three orchid MADS-Box genes of the *API/AGL9* subfamily during floral transition. *Plant Physiol.* 123, 1325-1336.
- Yu, H., Yang, S.H., Goh, C.J., 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 *knox* gene *DOH1*. *Plant Cell Rep.* 20, 301-305.
- Zambryski, P., 1992. Chronicles from the *Agrobacterium*-Plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 465-490.
- 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 carophyllus* L. and *D. chinensis*). *Plant Science* 168, 137-144.
- Zhang, X.S., Zhong, H.W., Lu, C., Huang, X., Cao, Z.X., 1996. Pollination-induced ethylene synthesis and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene expression in the gynoeceium of *Phalaenopsis* orchid flower. *Acta Botanica Sinica* 38(5), 375-378.
- Zeng, G., 1998. Sticky-End PCR: New Method for Subcloning. *BioTechniques* 25, 206-208.

### Weitere Quellenangaben:

Vakblad voor de Bloemisterij, 21, 2007.

## 7 Anhang



Abb. 7.1: Auszeichnung von ISHS, VI International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 24.-28.08.2008, Brisbane, Australien.

## Materialien

**Tab. 7.1: Geräteliste**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller, Model</b>
Autoklav	Fedegari
Bio-Imaging-Analyzer	Fuji Photo, BAS 1000
Brutschrank	Memmert, Be500; GFL mbH, 3033; MMM Medcenter GmbH, Incushake INCUCCELL 111
Digitalkamera	Kanon
Elektrophorese-Spannung	Pharmacia Biotech, EPS 3500
Elektrophorese-System	Biorad, Mini-Sub <sup>®</sup> Cell GT
Mikroskop	Zeiss
Reinstwassersystem	TKA-GmbH, TKA-Lab HP 6UV/UF
Thermocycler	Hybaid
Waage	Sartorius
Werkbank	Kendro Laboratory Products, Laminair <sup>®</sup> Typ LB48C
Zentrifuge	Eppendorf, 5415C; Kendro Laboratory Products, Biofuge fresco, Megafuge 1.0 R

**Tab. 7.2: Materialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Plastikverbrauchsmaterial	Sarstedt
Spritzen	Braun

Tab. 7.3: Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Acetosyringon	Sigma
Agar	Duchefa
Agarose	Seakem
BAP	Duchefa
Beefextrakt	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Cefotaxim	Duchefa
Chloroform	Fluka
DNA-Längenstandard	MBI Fermentas
dNTP's	MBI Fermentas
EDTA	Sigma
Eisessig	Merck
Enzyme	MBI Fermentas
Ethidiumbromid	Merck
Ethylen	Linde
GA <sub>3</sub>	Duchefa
Gelrite	Duchefa
Glukose	Duchefa
Glycerin	AppliChem
Glycin	Duchefa
HCl	Merck
Hefeextrakt	Fluka
Hepes	Fluka
IAA	Duchefa
IPTG	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kanamycinsulfat	Duchefa
1-MCP	Agro Fresh Inc.
MgSO <sub>4</sub>	Merck
β-Mercaptoethanol	Merck
MS Makro- und Mikrosalze	Duchefa
Myo-Inositol	Duchefa
NAA	Duchefa
NaOCl <sub>2</sub>	Nierle
NaOH	Merck
NaCl	Duchefa
Nicotinsäure	Duchefa
Pepton	Duchefa
Phenol	Sigma
PVP	Duchefa
Pyridoxin-HCl	Duchefa
Saccharose	Merck
SDS	Merck
TDZ	Duchefa
Thiamin-HCl	Fluka
Triton X-100	Pharmacia Biotech
Tris	Merck
Tween 20	Sigma
X-Gal	Duchefa

## Transformationsversuche

### Transformation mit Hilfe der Ultraschallbehandlung

**Tab. 7.4:** Auswertung des histochemischen GUS-Tests des Versuches TffU1 mit Hilfe der Ultraschallbehandlung (Tab. 2.8) von ON02 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet

Behandlungsdauer [s]	2 Monate		4 Monate		6 Monate	
	[%]	Anzahl „spot“ je Expl.	[%]	Anzahl „spot“ je Expl..	[%]	Anzahl „spot“ je Expl.
0	25	3,4	13	3,8	0	0,0
5	45	4,6	20	3,9	0	0,0
10	35	5,4	19	2,7	0	0,0
30	40	6,6	13	3,6	0	0,0
60	50	5,5	5	1,0	4	4,5

**Tab. 7.5:** Auswertung des histochemischen GUS-Tests des Versuches TffU2 mit Hilfe der Ultraschallbehandlung (Tab. 2.8) von ON02 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet

Behandlungsdauer [s]	2 Monate		4 Monate		6 Monate	
	[%]	Anzahl „spot“ je Expl	[%]	Anzahl „spot“ je Expl	[%]	Anzahl „spot“ je Expl
0	10	3,5	0	0,0	7	3,5
5	35	2,4	0	0,0	0	0,0
10	40	1,8	8	4,3	10	5,0
30	65	5,2	13	3,8	15	4,4
60	60	4,8	0	0,0	11	3,8

### Transformation mit Hilfe der Vakuum Infiltration

**Tab. 7.6:** Auswertung des histochemischen GUS-Tests des Versuches TffV2 mit Hilfe der Vakuum Infiltration (Tab. 2.8) von ON02 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet

Behandlungsdauer [min]	2 Monate		4 Monate		6 Monate	
	[%]	Anzahl „spot“ je Expl	[%]	Anzahl „spot“ je Expl	[%]	Anzahl „spot“ je Expl
0	25	8,4	3	1,0	0	0,0
1	20	5,8	0	0,0	0	0,0
2	45	7,1	8	3,3	10	4,2
4	25	7,0	15	3,3	9	6,5

**Tab. 7.7: Auswertung des histochemischen GUS-Tests des Versuches TfIV3 mit Hilfe der Vakuum Infiltration (Tab. 2.8) von ON02 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet

Behandlungsdauer [min]	2 Monate		4 Monate		6 Monate	
	[%]	Anzahl „spot“ je Expl	[%]	Anzahl „spot“ je Expl	[%]	Anzahl „spot“ je Expl
0	5	7,0	3	1,0	0	0,0
1	10	7,5	0	0,0	22	4,8
2	20	3,5	0	0,0	25	5,9
4	10	4,5	3	3,5	-	-

### Transformation auf Festmedium

**Tab. 7.8: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tf2 von PLBs auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON02 und OD01 mit EHA105 und LBA4404 mit pBI121 (EHA/gus und LBA/gus, Tab. 2.11), bzw. EHA105 mit pIBGUS (EHA/gus2, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet.

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>OD01</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	EHA/gus	40	4,0	20	1,5	0	0,0
	LBA/gus	90	6,0	40	4,0	22	2,8
	EHA/gus2	40	3,3	10	1,0	17	5,3
<b>ON02</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	EHA/gus	40	9,3	40	7,3	13	3,3
	LBA/gus	60	6,5	40	4,0	17	1,8
	EHA/gus2	50	11,0	30	6,3	0	0,0

**Tab. 7.9: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tf6 von PLBs auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON01, ON02, OD01 und OD04 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet.

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		Anzahl „spot“ je Expl.		Anzahl „spot“ je Expl.		Anzahl „spot“ je Expl.	
		%		%		%	
<b>ON01</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>ON02</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>OD01</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>OD04</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>ON01</b>	LBA/gus	10	1,5	13	4,8	0	0,0
<b>ON02</b>	LBA/gus	65	7,5	25	3,3	23	2,0
<b>OD01</b>	LBA/gus	55	4,1	25	3,1	22	1,5
<b>OD04</b>	LBA/gus	65	4,8	23	2,3	4	1,5

**Tab. 7.10: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tf7 von PLBs auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON01, ON02, OD01 und OD04 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet.

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		Anzahl „spot“ je Expl.		Anzahl „spot“ je Expl.		Anzahl „spot“ je Expl.	
		%		%		%	
<b>ON01</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>ON02</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>OD04</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>ON01</b>	LBA/gus	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>ON02</b>	LBA/gus	96	4,6	35	1,0	12	3,0
<b>OD04</b>	LBA/gus	85	5,3	0	0,0	5	1,0

**Tab. 7.11: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tf8 von PLBs auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON01, ON02, OD01 und OD04 mit LBA4404 und pBI121 (LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet.

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		Anzahl „spot“ je Expl.		Anzahl „spot“ je Expl.		Anzahl „spot“ je Expl.	
		%		%		%	
<b>ON01</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>ON02</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>OD04</b>	Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>ON01</b>	LBA/gus	10	5,0	40	1,0	6	1,0
<b>ON02</b>	LBA/gus	50	6,0	18	1,6	7	1,0
<b>OD04</b>	LBA/gus	45	4,4	25	2,4	8	1,2

### Vergleich der Transformation auf Fest- und in Flüssigmedium

**Tab. 7.12: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tfvsl2 des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssig- und auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON02 mit EHA105, bzw. LBA4404 und pBI121 (EHA/gus und LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** A bis D: verschiedene Transformationsvarianten von Tfvsl, Tab. 2.9. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet.

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>ON02</b>	A / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	B / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	C / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	D / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	A / EHA/gus	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	B / EHA/gus	10	4,5	18	7,7	7	6,3
	C / EHA/gus	5	1,0	18	6,3	8	5,2
	D / EHA/gus	55	2,6	28	4,1	27	1,0
	A / LBA/gus	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	B / LBA/gus	0	0,0	8	7,0	13	4,5
	C / LBA/gus	10	1,0	18	5,1	8	3,4
	D / LBA/gus	80	5,4	45	5,4	20	1,3

**Tab. 7.13: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tfvsl3 des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssig- und auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON02 mit EHA105, bzw. LBA4404 und pBI121 (EHA/gus und LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation.** A bis D: verschiedene Transformationsvarianten von Tfvsl, Tab. 2.9. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n = 20 der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet.

		2 Monate		4 Monate		6 Monate	
		%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>ON02</b>	A / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	B / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	C / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	D / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	A / EHA/gus	10	1,5	0	0,0	3	5,5
	B / EHA/gus	20	2,5	10	3,5	3	3,5
	C / EHA/gus	15	1,3	8	3,3	3	1,0
	D / EHA/gus	35	2,7	20	1,8	22	1,8
	A / LBA/gus	20	2,5	5	6,0	2	3,0
	B / LBA/gus	15	2,7	13	3,7	5	4,0
	C / LBA/gus	25	2,4	13	3,6	5	2,3
	D / LBA/gus	65	3,7	50	1,0	17	1,0

**Tab. 7.14: Auswertung des histochemischen GUS-Tests aus Versuch Tfvsfl5 des Vergleiches der Transformation von PLBs in Flüssig- und auf Festmedium (Tab. 2.8) von ON02 mit EHA105, bzw. LBA4404 und pBI121 (EHA/gus und LBA/gus, Tab. 2.11) zwei, vier und sechs Monate nach der Transformation. F bis I: verschiedene Transformationsvarianten von Tfvsfl, Tab. 2.10. Dargestellt sind die Mittelwerte mit  $n = 20$  und die Standardabweichungen der Anzahl „spots“ je Explantat (gemittelt über die Explantate mit „spots“). Als „spots“ werden die blau gefärbten Zellen bezeichnet.**

	<b>2 Monate</b>		<b>4 Monate</b>		<b>6 Monate</b>	
	%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.	%	Anzahl „spot“ je Expl.
<b>ON02</b>						
E / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
F / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
G / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
H / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
I / Kontrolle	0	0,0	0	0,0	0	0,0
E / LBA/gus	20	4,3	5	2,5	7	6,0
F / LBA/gus	40	2,8	8	3,3	2	6,0
G / LBA/gus	35	4,4	10	2,8	0	0,0
H / LBA/gus	40	5,1	15	4,0	11	4,4
I / LBA/gus	65	2,8	20	1,3	10	1,5

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zu der Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, besonders bei

Prof. Dr. Margrethe Serek für die Überlassung des Themas

Prof. Dr. Winkelmann für die Begleitung der Arbeit, ihre große Unterstützung und Hilfsbereitschaft

Dr. Heiko Mibus-Schoppe für seine Einführung in die Molekulargenetik und seine Unterstützung während der Arbeit und seinen Bachelors für die Hilfe beim Southern Blot

Prof. Dr. Thomas Debener sowie Prof. Dr. Bernhard Beßler für die Mitwirkung in der Prüfungskommission

Dr. Bernhard Hauser und Dr. Thilo Fischer für die Nutzung der Labor- und Kulturräume der Technischen Universität München und des Versuchszentrums Dürnast

Prof. Dr. Georg Ohmayer und Prof. Dr. Sebastian Peisl für die Nutzung des Büroraumes

Dr. Viola Mußmann, Dr. Lara Meyer, Julia Meiners und Wiebke Ratje für wertvolle Anregungen und Diskussionen

den Mitarbeitern der Institute Zierpflanzenbau in Hannover und Weihenstephan: Herbert Geyer, Annette Steding, Gisela Bölsing, Wiltrud von Oertzen, Franziska Kohlrausch, Katharina Brandmaier und Irene

Benjamin Hartwig, Jana Albrecht und Alexander Klein für die produktive und bereichernde Zusammenarbeit

meinen Eltern und meinem Mann für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich.