

**Gametische und somatische Hybridisierung  
zwischen  
*Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*  
und  
innerhalb von *Streptocarpus*-Arten**

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

Doktor der Gartenbauwissenschaften  
- Dr. rer. hort. -

**genehmigte  
Dissertation**

von  
Dipl.-Ing. agr. Rahim Afkhami Sarvestani  
geboren am 21.04.1958 in Schiraz / Iran

2010

**Für meine Eltern  
Farangis Faridi und  
Cheraghali Afkhami-Sarvestani**

Referent: Prof. Dr. Margrethe Serek  
Korreferent: Prof. Dr. Traud Winkelmann

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Hans-Michael Poeling

Prüfungskollegium: Prof. Dr. Hans-Michael Poeling  
Prof. Dr. Thomas Debener  
Prof. Dr. Margrethe Serek  
Prof. Dr. Traud Winkelmann

Tag der Promotion: 15. 12. 2010

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe.

Hannover, 7. Februar 2011

# Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Margrethe Serek vom Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften, Abteilung Zierpflanzenbau der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und die Möglichkeit, in ihrem Labor arbeiten zu können.

Ich danke Frau Prof. Dr. Traud Winkelmann vom Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften, Abteilung Baumschule der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, für die Übernahme des Korreferates und ihre Betreuung und Korrektur der Arbeit.

Ich danke Frau Dr. agr. Aloma Ewald vom Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau aus Großbeeren / Erfurt sowie Frau Dr. Karin Sonntag von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Groß Lüsewitz dafür, dass sie einige Experimente für diese Arbeit in ihren Laboren ermöglichten.

Ebenso bedanke ich mich bei der Firma Klemm + Sohn GmbH für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, besonders bei Herrn Dr. Ulrich Sander für seine Beratung und Frau Dr. Andrea Dohm.

Ich danke Herrn Prof. Thomas Debener, Herrn Dr. Heiko Mibus-Schoppe und Frau Dr. Annegret Schum für die konstruktive Betreuung.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern im Labor des Institutes für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften, Abteilung Zierpflanzenbau, Frau Gisela Bölsing und Frau Wiltrud von Oertzen sowie Herrn Herbert Geyer und seinem Team im Gewächshaus.

## Kurzfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die gametische und somatische Hybridisierung in der Familie der *Gesneriaceae*, zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten sowie innerhalb von *Streptocarpus*-Arten der Untergattung *Streptocarpella*.

Dabei wurden Untersuchungen zur Pollenvitalität, Pollenkeimung in vitro und in vivo sowie Kreuzungen durchgeführt. Die Pollenkeimung in vitro lag je nach Genotyp zwischen 3 % und 56 %. Hierbei wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,99 zwischen der Pollenvitalität durch MTT-Färbung und der In-vitro-Pollenkeimung bestimmt.

Aus Artkreuzungen innerhalb von 13 *Streptocarpus*-Arten wurden bei elf Kreuzungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella* Hybriden hergestellt, bei denen durch morphologische Untersuchungen und teilweise durch RAPD (random amplified polymorphic DNA) -Marker bei fünf Kreuzungen der Hybridcharakter bestätigt wurde.

Um die ermittelten prä- und postzygotischen Barrieren bei Kreuzungen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus* und auch bei weiteren Artkreuzungen innerhalb von *Streptocarpus* zu überwinden, wurden In-vitro-Bestäubung und die „Embryo Rescue“-Technik eingesetzt. Bei den beiden Methoden wurde trotz anfänglicher Vergrößerung der Samenanlagen, die meistens als Zeichen einer Befruchtung interpretiert wird, keine Keimung von Embryonen beobachtet.

Als Vorbereitung für die Protoplastenfusion wurden nach Etablierung von Protoplastenisolation und -regeneration von vier *Saintpaulia ionantha*-Sorten nach WINKELMANN (1994) Versuche zur Isolierung und Regeneration von Protoplasten aus fünf *Streptocarpus*-Arten durchgeführt. Bei zwei Arten wurden von Stängeln aus In-vitro Sprosskulturen zwischen  $2$  und  $3,5 \times 10^5$  Protoplasten / g Frischmasse mit einer Vitalität von 68-72 % gewonnen. Bei drei weiteren *Streptocarpus*-Arten ließen sich aus Blättern von in Dunkelheit in flüssigem Medium kultivierten In-vitro-Sprosskulturen zwischen  $2$  und  $3,6 \times 10^5$  Protoplasten / g Frischmasse mit hoher Vitalität von 68-96 % isolieren. 14 Tage nach der Isolierung wurden bei vier Arten Zellteilungsfrequenzen zwischen 2,1 und 5,5 % beobachtet, und bei zwei Arten bildeten sich Kallusse. An den Kallussen bildeten sich Wurzeln, aber trotz verschiedener Maßnahmen wie Zugabe von verschiedenen Wachstumsregulatoren (BAP, 2,4-D, Kinetin, 2ip, TDZ, Zeatin, Metatopolin, NAA, IAA), Adeninsulfat oder Silbernitrat in die Medien sowie Variation der Lichtintensität oder unterschiedliche Medienzusammensetzungen (MS, B5) wurde keine Sprossregeneration beobachtet.

Für die Protoplastenfusion kamen chemische und elektrische Methoden zum Einsatz. Chemische Protoplastenfusionen wurden mit Polyethylenglykol durchgeführt, und ein geeignetes Protokoll für die Protoplastenfusion zwischen *Streptocarpus* und *Saintpaulia* und innerhalb von *Streptocarpus*-Arten wurde entwickelt. Die Fusionsrate, mittels Zellkernfärbung durch Ethidiumbromid ermittelt, erreichte bis zu 35 % zweikernige Protoplasten. In fünf von zehn Fusionsexperimenten zwischen fünf *Streptocarpus*-Arten und zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten wurden Zellteilungen und bei zweien Kallusbildung beobachtet. Hingegen ließen sich in fünf von neun Fusionsansätzen mit fünf *Streptocarpus*-Arten Kallusse gewinnen. Dabei wurden auf einem Kallus aus der Fusion zwischen *S. saxorum* x *S. stomandrus* und *S. glandulosissimus* Sprosse regeneriert, die im Gewächshaus akklimatisiert worden waren.

Zur Identifizierung von möglichen Hybriden wurden zuerst zufällig ausgewählte Kallusse durchflusscytometrisch selektiert und mittels RAPD-Markern untersucht. Obwohl bei den meisten Kallussen die Banden von einem Fusionspartner deutlicher ausgeprägt waren, zeigten einige Kallusse Markerbanden von beiden Eltern sowie neue Banden. Dies zeigt, dass Fusionen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten sowie innerhalb der *Streptocarpus*-Arten wahrscheinlich möglich sind.

**Schlagwörter** gametische Hybridisierung, somatische Hybridisierung, *Saintpaulia ionantha*, *Streptocarpus*

## Abstract

In order to produce new ornamental plants from combinations of *Saintpaulia* and *Streptocarpus*, two closely related genera of *Gesneriaceae* and also within the species of *Streptocarpus*, gametic and somatic hybridization were investigated.

The germination of pollen in vitro was determined, according to genotypes, at approximately 3-56 %. There was a correlation coefficient of 0.99 between the assessment of pollen viability by MTT and the germination of pollen in vitro. From crosses within 13 *Streptocarpus* species, subgenus *Streptocarpella*, 11 hybrids were established, of which in five crosses the hybridity was confirmed with morphological and RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis.

To overcome pre- and postzygotic barriers in crosses between *Saintpaulia ionantha* and *Streptocarpus* species and also in crosses within *Streptocarpus*, in vitro pollination and embryo rescue technique were used. With both methods, despite the expansion of the ovules, which is usually considered as an indicator for successful fertilization, no germination of plants from embryos was observed.

To prepare the fusion of protoplasts, the protoplasts of four varieties of *Saintpaulia ionantha* were isolated and regenerated according to WINKELMANN (1994), and several experiments aiming at the isolation and regeneration of protoplasts from *Streptocarpus* species were performed. Sufficient amounts of protoplasts, between 2 and 3.5 x 10<sup>5</sup> / g fresh mass with viabilities of 68-72 %, were derived from stems of two species. From three other species, between 2 and 3.6 x 10<sup>5</sup> protoplasts / g fresh mass with high viabilities of 68-96 % were isolated from leaves of in vitro shoot cultures which were grown in liquid medium in the dark. Cell divisions achieved frequencies between 2.1 and 5.5 %, depending of species after 14 days of culture, and from two species calluses were obtained. In callus cultures roots were formed, but despite addition of various growth regulators (such as BAP, 2,4-D, kinetin, 2iP, TDZ, zeatin, metatopolin, NAA, IAA), adenine sulphate or silver nitrate to the media, different light intensities or different nutrient compositions, shoot regeneration was not observed.

For protoplast fusion, both chemical and electrical methods were applied. Chemical protoplast fusions were carried out by polyethylene glycol, and an appropriate protocol for protoplast fusions between *Streptocarpus* and *Saintpaulia* and within *Streptocarpus* species was developed. The fusion rate determined by cell nucleus staining with ethidium bromide reached up to 35 % binuclear protoplasts. In five of ten fusion experiments between five *Streptocarpus* species and two *Saintpaulia ionantha* varieties cell divisions, and in two experiments callus formation was observed. Moreover, in five from nine fusion experiments with five species of *Streptocarpus* calluses were obtained. Shoot regeneration was observed on a callus from the fusion between *S. saxorum* x *S. stomandrus* and *S. glandulosissimus*, and those shoots were acclimatized in the greenhouse.

To identify possible hybrids, some of the calluses were selected by flow cytometry and analysed with RAPD markers. Although in most RAPD analyses the DNA bands from one of the parents were more evident than from the other one, or only DNA bands from one parent were demonstrated, and although DNA bands appeared which could not be assigned to any of the parents, in some calluses bands of both parents were detected. This can attest that fusions between *Saintpaulia* and *Streptocarpus* or within *Streptocarpus* species are probably possible.

**Key words:** gametic hybridisation, somatic hybridization, *Saintpaulia ionantha*, *Streptocarpus*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>viii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>xii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>xx</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Saintpaulia</i> und <i>Streptocarpus</i> .....	1
1.2 Züchtungsmethoden.....	4
1.3 Besonderheiten der Zierpflanzenzüchtung .....	5
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	5
<b>2 Gametische Hybridisierungen.....</b>	<b>6</b>
2.1 Einleitung.....	6
2.2 Material und Methoden.....	8
2.2.1 Pflanzenmaterial .....	8
2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für die Pollenkeimung in vitro.....	12
2.2.3 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für „embryo rescue“ .....	12
2.2.4 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für die In-vitro- Bestäubungen .....	13
2.2.5 Vorbereitung und Zusammensetzung der Anilinblau-Lösung .....	13
2.2.6 Untersuchungen zur Pollenlagerung .....	13
2.2.7 Untersuchungen zur Bestimmung der Bestäubungsfähigkeit der Pollen ..	13
2.2.8 Bewertung der Pollenvitalität .....	13
2.2.8.1 Bewertung der Pollenvitalität mit Fluoreszeindiacetat (FDA) .....	14
2.2.8.2 Bewertung der Pollenvitalität mit 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT oder Thiazolyl blue) .....	14
2.2.9 Untersuchungen zur Pollenkeimung in vitro .....	14
2.2.10 Kastration und Bestäubungstechnik .....	15
2.2.11 Untersuchung zur Pollenkeimung in vivo .....	15
2.2.12 Untersuchungen zu „embryo rescue“ .....	16

2.2.12.1 Anpassung des Mediums für „embryo rescue“ .....	16
2.2.12.2 Versuch zu „embryo rescue“ .....	17
2.2.13 Kreuzungen .....	17
2.2.14 Versuch zum Bestäuben in vitro .....	18
2.2.15 Identifizierung der Hybriden .....	18
2.2.15.1 RAPD Primer .....	18
2.2.15.2 DNA-Extraktion nach DOROKHIOV UND KLOCKE (1997) .....	19
2.2.15.3 Bestimmung von Menge und Qualität der DNA .....	20
2.2.15.4 PCR-Bedingungen .....	20
2.2.15.5 Anwendung von RAPD-Markern .....	20
2.2.16 Statistische Auswertungen .....	21
2.3 Ergebnisse .....	22
2.3.1 Untersuchungen zur Pollenvitalität .....	22
2.3.2 Pollenkeimung in vitro .....	24
2.3.3 Untersuchung zur Reifezeit der Pollen .....	27
2.3.4 Untersuchungen zur Lagerung von Pollen .....	30
2.3.5 Pollenkeimung in vivo .....	31
2.3.6 Kreuzungen .....	36
2.3.6.1 Kreuzungen zwischen <i>Streptocarpella</i> -Arten und <i>Saintpaulia</i> - Genotypen .....	36
2.3.6.2 Kreuzungen innerhalb der Untergattung <i>Streptocarpella</i> .....	37
2.3.7 „embryo rescue“-Versuche .....	46
2.3.8 In-vitro-Bestäubungen .....	47
2.4 Diskussion .....	48
<b>3 Protoplastenkultur bei <i>Saintpaulia ionantha</i>-Sorten .....</b>	<b>61</b>
3.1 Einleitung .....	61
3.2 Material und Methoden .....	61
3.2.1 Pflanzenmaterial .....	61
3.2.2 Zusammensetzung und Herstellung des Regenerationsmediums (9.1) für <i>Saintpaulia ionantha</i> -Blattexplantate (in vitro) .....	62

3.2.3	Zusammensetzung und Herstellung des Sprosserhaltungsmediums für <i>Saintpaulia ionantha</i> .....	62
3.2.4	Zusammensetzung und Herstellung der Präplasmolyselösung .....	62
3.2.5	Zusammensetzung und Herstellung der Enzymlyse .....	62
3.2.6	Zusammensetzung und Herstellung der Pufferlösung 1 .....	62
3.2.7	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für Protoplasten ...	63
3.2.8	Kultur des pflanzlichen Ausgangsmaterials .....	63
3.2.9	Isolierung und Reinigung der Protoplasten .....	64
3.2.10	Kultur der Protoplasten in Alginatfilm .....	67
3.2.11	Kalluskultur .....	67
3.2.12	Sprossregeneration .....	68
3.2.13	Versuche zur Isolation und Kultur der Protoplasten von vier <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten .....	68
3.2.14	Bonituren und Auswertungen .....	68
3.3	Ergebnisse .....	70
3.3.1	Isolierung der Protoplasten aus vier <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten .....	70
3.3.2	Kultur der Protoplasten aus vier <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten .....	71
3.3.3	Kalluskultur .....	73
<b>4</b>	<b>Protoplastenkultur bei <i>Streptocarpus</i>-Arten der Untergattung <i>Streptocarpella</i> .....</b>	<b>75</b>
4.1	Einleitung .....	75
4.2	Material und Methoden .....	75
4.2.1	Pflanzenmaterial .....	75
4.2.2	Zusammensetzung und Herstellung der Medien für die Kultur des Ausgangsmaterials .....	76
4.2.2.1	Zusammensetzung und Herstellung der Regenerationsmedien für <i>Streptocarpus</i> .....	76
4.2.2.2	Zusammensetzung und Herstellung der Sprosserhaltungsmedien für <i>Streptocarpus</i> .....	76
4.2.2.3	Zusammensetzung und Herstellung des Kallusinduktionsmediums ...	76
4.2.2.4	Zusammensetzung und Herstellung des Suspensionskulturmediums	76

4.2.3	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für Protoplasten...	77
4.2.4	Kultur des pflanzlichen Ausgangsmaterials .....	77
4.2.4.1	Versuche zur Sprossinduktion an In-vitro-Explantaten.....	77
4.2.4.2	In-vitro-Sprosskultur auf festem Medium.....	77
4.2.4.3	In-vitro-Sprosskultur in flüssigem Medium .....	78
4.2.4.4	Untersuchungen zur Suspensionskultur.....	78
4.2.4.5	Untersuchungen zur Meristemkultur .....	78
4.2.5	Untersuchung zur Optimierung der Enzymlyösung .....	79
4.2.6	Untersuchung zur Isolierung von Protoplasten aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien .....	80
4.2.6.1	Isolierung der Protoplasten aus Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus .....	80
4.2.6.2	Isolierung der Protoplasten aus In-vitro-Sprosskulturen.....	80
4.2.6.3	Isolierung der Protoplasten aus regenerierten, jungen Sprossen.....	81
4.2.6.4	Isolierung der Protoplasten aus Suspensionskultur .....	81
4.2.7	Untersuchung zur Kultur der Protoplasten.....	81
4.2.7.1	Untersuchung zur Optimierung des Kulturmediums.....	81
4.2.7.2	Untersuchung zur Kultur der Protoplasten im flüssigen Medium und Optimierung der Osmolarität .....	82
4.2.7.3	Kultur der Protoplasten in Alginatfilmen .....	83
4.2.7.4	Untersuchungen zu „feeder cell layer“ .....	83
4.2.8	Kalluskultur .....	83
4.2.9	Untersuchungen zur Optimierung des Sprossregenerationsmediums.....	84
4.2.10	Bestimmung der Vitalität der Protoplasten.....	85
4.2.11	Bonituren und Auswertungen .....	85
4.2.12	Statistische Auswertungen .....	86
4.3	Ergebnisse .....	86
4.3.1	Kultur des Ausgangsmaterials für die Protoplastenisolierung.....	86
4.3.1.1	Versuche zur Gewinnung von In-vitro-Explantaten .....	86
4.3.1.2	In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium.....	88

4.3.1.3	In-vitro-Sprosskultur im flüssigen Medium .....	88
4.3.1.4	Untersuchungen zur Kallusinduktion für Suspensionskultur .....	88
4.3.1.5	Untersuchungen zur Meristemkultur .....	90
4.3.2	Untersuchung zur Optimierung der Enzymlösung bei verschiedenen Pflanzenmaterialien .....	90
4.3.3	Untersuchungen zum für Protoplastenisolationen geeigneten Pflanzenmaterial .....	92
4.3.4	Qualität der Protoplasten aus verschiedenen Pflanzenmaterialien .....	97
4.3.5	Optimierung der Kulturmedien .....	102
4.3.6	Kultur der Protoplasten im flüssigen Medium .....	103
4.3.7	Kultur der Protoplasten in Alginatfilm.....	105
4.3.8	Kalluskultur .....	108
4.4	Diskussion .....	113
<b>5</b>	<b>Protoplastenfusion.....</b>	<b>129</b>
5.1	Einleitung.....	129
5.2	Material und Methoden.....	131
5.2.1	Pflanzenmaterial.....	131
5.2.2	Zusammensetzung und Herstellung der Medien für die Protoplastenfusion .....	131
5.2.3	Versuche zur Optimierung des Protokolls für die Protoplastenfusion .....	133
5.2.3.1	Protokoll P1 (nach NAUMANN 1994).....	133
5.2.3.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Protoplastenfusion .....	134
5.2.3.3	Einfluss der PEG-Behandlungszeit auf die Vitalität der Protoplasten.....	135
5.2.3.4	Einfluss des Zentrifugierens auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten nach der Fusion .....	135
5.2.3.5	Einfluss der Anreicherung der Protoplastensuspensionslösung und der PEG-Lösung auf die Vitalität der Protoplasten nach der Fusion .....	136
5.2.3.6	Einfluss der Floatierungsbehandlung mit Saccharoselösung nach der Fusion auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten .....	136
5.2.4	Vergleich der Fusionsprotokolle .....	137

5.2.5	Versuche zur chemischen Fusion der Protoplasten .....	137
5.2.5.1	Versuche zur Protoplastenfusion zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	137
5.2.5.2	Versuche zur Protoplastenfusion zwischen <i>Streptocarpus</i> -Arten.....	138
5.2.6	Versuche zur elektrischen Fusion der Protoplasten .....	139
5.2.6.1	Versuche zur Ermittlung geeigneter Parameter für die elektrische Fusion der Protoplasten von <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus</i> .....	139
5.2.6.2	Versuche zur Elektrofusion zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus</i> .....	141
5.2.7	Kultur der Protoplasten nach der Fusion .....	141
5.2.8	Bestimmung der Ploidiestufe der Kallusse aus Fusionsversuchen und somatischen Hybriden .....	141
5.2.9	Identifizierung der Kallusse aus Fusionsversuchen und der somatischen Hybriden durch molekulare Marker.....	141
5.2.10	Bonituren und Auswertungen .....	142
5.3	Ergebnisse .....	143
5.3.1	Optimierung des Protokolls für die Protoplastenfusion .....	143
5.3.1.1	Einfluss des pH-Werts auf die Protoplastenfusion .....	143
5.3.1.2	Einfluss der PEG-Behandlungsdauer auf die Vitalität der Protoplasten.....	145
5.3.1.3	Einfluss des Zentrifugierens auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten nach der Fusion .....	147
5.3.1.4	Einfluss der Anreicherung der Protoplastensuspensionslösung und der PEG-Lösung auf die Vitalität der Protoplasten nach der Fusion .....	148
5.3.1.5	Einfluss der Floatierungsbehandlung mit Saccharoselösung nach der Fusion auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten .....	149
5.3.2	Vergleich der Fusionsprotokolle .....	151
5.3.3	Protoplastenfusion zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus</i> - Arten .....	155
5.3.3.1	Kalluskultur.....	159

5.3.3.2	Bestimmung der Ploidiestufen der Kallusse aus Protoplastenfusionen zwischen <i>Streptocarpus</i> -Arten und <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten .....	159
5.3.3.3	Identifizierung der Kallusse aus den Fusionen zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus</i> .....	163
5.3.4	Protoplastenfusion innerhalb von <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	165
5.3.4.1	Kalluskultur.....	166
5.3.4.2	Bestimmung der Ploidiestufe der Kallusse .....	166
5.3.4.3	Versuche zur Sprossbildung .....	169
5.3.5	Optimierung der Elektrofusion .....	174
5.3.6	Elektrofusion zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus caulescens</i> .....	177
5.4	Diskussion .....	178
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>199</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>202</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>205</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>229</b>
9.1	Protokolle .....	244

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b> Genotypenbeschreibung von fünf Sorten von <i>Saintpaulia ionantha</i> und zwei Kultivaren aus einem Wildarten.....	8
<b>Tabelle 2.2:</b> Gewählte <i>Streptocarpus</i> -Arten für die Untersuchungen.....	9
<b>Tabelle 2.3:</b> Sequenzen der verwendeten Zufalls-Primer (A) für die RAPD-PCR .....	19
<b>Tabelle 2.4:</b> Die PCR-Bedingungen zur Amplifikation von RAPD-Markern .....	20
<b>Tabelle 2.5:</b> „embryo rescue“-Versuche zu Kreuzungen zwischen <i>Streptocarpella</i> -Arten und <i>Saintpaulia</i> -Genotypen .....	37
<b>Tabelle 2.6:</b> Kreuzungen zwischen <i>Streptocarpella</i> -Arten .....	38
<b>Tabelle 3.1:</b> Zusammensetzung der Medien für die Protoplastenkultur .....	63
<b>Tabelle 3.2:</b> Ergebnisse der Isolierung der Protoplasten von vier <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten.....	71
<b>Tabelle 3.3:</b> Teilungsfrequenzen der Protoplasten von vier <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten zu zwei Zeitpunkten .....	72
<b>Tabelle 4.1:</b> Kombination von Cellulase und Macerozyme in den untersuchten Enzymlösungen.....	79
<b>Tabelle 4.2:</b> Das variierte Kulturmedium.....	82
<b>Tabelle 4.3:</b> Die Zusätze zum Sprossregenerationsmedium für Kallusse aus Protoplasten von <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	84
<b>Tabelle 4.4:</b> Ausbeute von Protoplasten aus verschiedenen Pflanzenmaterialien von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten durch drei verschiedene Enzymlösungen .....	91
<b>Tabelle 4.5:</b> Ausbeute an Protoplasten aus Blättern von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten, die aus dem Gewächshaus entnommen wurden .....	93
<b>Tabelle 4.6:</b> Ausbeute an Protoplasten aus Stängeln von drei <i>Streptocarpus</i> -Arten, die aus dem Gewächshaus entnommen wurden .....	93
<b>Tabelle 4.7:</b> Vergleich der Durchmesser der Protoplasten von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten nach Herkunft und Kulturbedingungen .....	100

<b>Tabelle 4.8:</b> Vitalität der Protoplasten von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten aus verschiedenen Geweben und Kulturbedingungen.....	101
<b>Tabelle 4.9:</b> Teilungsfrequenzen der Zellen aus Protoplasten von zwei <i>Streptocarpus</i> -Arten in drei Kulturmedien .....	102
<b>Tabelle 4.10:</b> Teilungsfrequenzen der Zellen aus Protoplasten von zwei <i>Streptocarpus</i> -Arten in drei Kulturmedien .....	103
<b>Tabelle 4.11:</b> Teilungsfrequenzen der Zellen aus Protoplasten von <i>Streptocarpus</i> -Arten nach 14 / 28 Tagen .....	107
<b>Tabelle 4.12:</b> Protoplastenentwicklungen aus Versuchen von vier <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	110
<b>Tabelle 4.13:</b> Wurzelbildung von Kallussen aus Protoplasten aus Blättern bei S1 und S3 .....	111
<b>Tabelle 5.1:</b> Einige für die Protoplastenfusion zwischen <i>Saintpaulia</i> und <i>Streptocarpus</i> und innerhalb von <i>Streptocarpella</i> -Arten verwendete Lösungen .....	132
<b>Tabelle 5.2:</b> Varianten der PEG-Lösung PEG1 .....	134
<b>Tabelle 5.3:</b> Versuche zu Fusionen zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten und <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	138
<b>Tabelle 5.4:</b> Versuche zu Fusionen innerhalb der <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	138
<b>Tabelle 5.5:</b> Verschiedene Behandlungen bei der Elektrofusion .....	140
<b>Tabelle 5.6:</b> Verschiedene Behandlungen bei der Elektrofusion .....	140
<b>Tabelle 5.7:</b> Vergleich der pH-Werte bei den verschiedenen PEG-Lösungen .....	143
<b>Tabelle 5.8:</b> Vergleich der pH-Werte bei den verschiedenen PEG-Lösungen vor und nach dem Autoklavieren.....	144
<b>Tabelle 5.9:</b> Anteil zweikerniger Protoplasten in Abhängigkeit von der PEG-Behandlungsdauer .....	146
<b>Tabelle 5.10:</b> Vergleich der Anzahl von Protoplasten nach der Fusion mit und ohne Zentrifugieren.....	147
<b>Tabelle 5.11:</b> Aggregatbildung der Protoplasten durch PEG-Behandlung bei verschiedenen Protokollen .....	151

<b>Tabelle 5.12:</b> Vergleich des Anteils zweikerniger Protoplasten nach der Fusion zwischen S3 und U03 ermittelt durch Anfärbung mit Ethidiumbromid .....	154
<b>Tabelle 5.13:</b> Die Ergebnisse von Protoplastenfusionen zwischen fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten und zwei <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten.....	158
<b>Tabelle 5.14:</b> Die durchflusscytometrischen Ergebnisse von Kallussen aus Fusionensexperimenten zwischen <i>Streptocarpus</i> und <i>Saintpaulia ionantha</i> ...	162
<b>Tabelle 5.15:</b> Die Ergebnisse aus Fusionen innerhalb von <i>Streptocarpus</i> -Arten...	167
<b>Tabelle 5.16:</b> Ergebnisse von durchflusscytometrischen Untersuchungen zufällig ausgewählter Kalusse aus Fusionen zwischen <i>Streptocarpus</i> -Arten..	168
<b>Tabelle 5.17:</b> Die vermuteten Häufigkeitsverteilungen für zwei <i>Streptocarpus</i> -Arten S1 und S12 bei Homo- und Heterofusionen .....	172
<b>Tabelle 5.18:</b> Verschiedene Behandlungen bei der Elektrofusion zwischen Protoplasten verschiedener Arten .....	193
<b>Tabelle 9.1:</b> Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus</i> -Arten auf den zwei Medien PM1 und PM2 .....	235
<b>Tabelle 9.2-a:</b> Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus</i> -Arten auf den zwei Medien PM1 und PM2. ....	235
<b>Tabelle 9.3-b:</b> Vergleich der In-vitro-Pollenkeimung von verschiedenen <i>Saintpaulia</i> -Gonotypen und <i>Streptocarpus</i> -Arten aus Blüten in zwei Entwicklungsstadien: Knospen und Blüten.....	235
<b>Tabelle 9.4:</b> Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von <i>Streptocarpus</i> -Arten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit .....	236
<b>Tabelle 9.5:</b> Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von <i>Streptocarpus</i> -Arten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit .....	236
<b>Tabelle 9.6:</b> Kreuzungen zwischen <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	237
<b>Tabelle 9.7:</b> Zusammensetzung der Medien für die Protoplastenkultur von <i>Saintpaulia ionantha</i> .....	241
<b>Tabelle 9.8:</b> Protoplastenausbeute aus regenerierten Sprossen bei fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten nach sechswöchiger Kultur unter Licht oder in Dunkelheit. ....	242

<b>Tabelle 9.9:</b> Protoplastenausbeute aus Blättern von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten, die aus In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium entnommen wurden.....	242
<b>Tabelle 9.10:</b> Protoplastenausbeute aus Blättern von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten, die unter verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert wurden .....	242
<b>Tabelle 9.11:</b> Protoplastenausbeute aus Stängeln von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten, die unter verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert wurden .....	242
<b>Tabelle 9.12:</b> Protoplastenausbeute aus Blättern und Stängeln von <i>Streptocarpus</i> -Arten nach dreiwöchiger Kultur im flüssigen Medium in Dunkelheit .....	242
<b>Tabelle 9.13:</b> Änderungen der Durchmesser der kultivierten Protoplasten aus drei <i>Streptocarpus</i> -Arten im flüssigen Medium mit verschiedenen Osmolaritäten.....	243
<b>Tabelle 9.14:</b> Zusammensetzung des CPW .....	243
<b>Tabelle 9.15:</b> Zusammensetzung des TAE-Puffer .....	243
<b>Tabelle 9.16:</b> Zusammensetzung des Ladepuffers.....	243

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Phänogramm von <i>Streptocarpus</i> und <i>Saintpaulia</i> , das auf der Sequenzanalyse aus Kombinationen von ITS1 und ITS2 basiert. ....	3
<b>Abbildung 1.2:</b> Phänogramm von 26 <i>Streptocarpus</i> -Arten und drei <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten, erstellt mit RAPD-Marker .....	4
<b>Abbildung 2.1:</b> Zwei <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten.....	10
<b>Abbildung 2.2:</b> Blüten und Blättertypen von einigen <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	10
<b>Abbildung 2.3:</b> Einige <i>Streptocarpus</i> -Arten aus der Untergattung <i>Streptocapella</i> .....	11
<b>Abbildung 2.4:</b> Anfärbung von Pollen einiger <i>Saintpaulia</i> -Genotypen und <i>Streptocarpus</i> -Arten mit FDA .....	22
<b>Abbildung 2.5:</b> Anfärbung von Pollen von <i>Saintpaulia</i> -Genotypen und <i>Streptocarpus</i> -Arten mit MTT .....	23
<b>Abbildung 2.6:</b> Einschätzung der Pollenvitalität durch FDA und MTT .....	23
<b>Abbildung 2.7:</b> Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von fünf <i>Saintpaulia</i> -Genotypen und 12 <i>Streptocarpus</i> -Arten auf zwei Medien.....	24
<b>Abbildung 2.8:</b> Pollenkeimung von S3 und S12 nach drei Stunden Kultur .....	25
<b>Abbildung 2.9:</b> In-vitro-Pollenkeimung von verschiedenen Genotypen .....	25
<b>Abbildung 2.10:</b> Regressionslinie zwischen der Pollenvitalität, ermittelt mit FDA-Färbung, und der Pollenkeimung in vitro .....	26
<b>Abbildung 2.11:</b> Regressionslinie zwischen der Pollenvitalität, ermittelt mit MTT-Färbung, und der Pollenkeimung in vitro .....	27
<b>Abbildung 2.12:</b> Die Blütenöffnung von <i>Streptocarpus</i> führte zur Bestäubung. ....	27
<b>Abbildung 2.13:</b> Vergleich der In-vitro-Pollenkeimung von verschiedenen <i>Saintpaulia</i> -Genotypen und <i>Streptocarpus</i> -Arten aus Blüten in zwei Entwicklungsstadien.....	28
<b>Abbildung 2.14:</b> Fruchtblattentwicklung bei <i>Streptocarpus</i> .....	29
<b>Abbildung 2.15:</b> Verschiedene Stadien der Blütenentwicklung bei <i>Streptocarpus</i> .....	30

<b>Abbildung 2.16:</b> Pollenkeimung in Abhängigkeit von Lagerzeit und -temperatur.....	31
<b>Abbildung 2.17:</b> Untersuchung von Pollenkeimung und Pollenschlauchbildung mit Anilinblau bei vier <i>Saintpaulia</i> -Genotypen .....	32
<b>Abbildung 2.18:</b> Keimung und Pollenschlauchwachstum von Pollenkörnern der Gattung <i>Saintpaulia</i> auf den Narben der Gattung <i>Streptocarpus</i> .....	32
<b>Abbildung 2.19:</b> Pollenkörner von <i>Streptocarpus</i> -Arten keimten auf den Narben von anderen Arten der Gattung <i>Streptocarpus</i> und bildeten Pollenschläuche .....	33
<b>Abbildung 2.20:</b> Pollenschläuche von U13 im Fruchtknoten von S1. ....	34
<b>Abbildung 2.21:</b> Befruchtung bei S25 x S12 .....	34
<b>Abbildung 2.22:</b> Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum bei Bestäubungen innerhalb der Untergattung <i>Streptocarpella</i> (S25 x S12).....	35
<b>Abbildung 2.23:</b> Die Sämlinge in Styroporkisten vor dem Pikieren ).....	38
<b>Abbildung 2.24:</b> Bestimmung der Konzentrationen der DNA.....	39
<b>Abbildung 2.25:</b> Zwei Hybriden aus S1 ( <i>S. saxorum</i> x <i>S. stomandrus</i> ) und S2 ( <i>S. saxorum</i> ).....	40
<b>Abbildung 2.26:</b> Vergleich der RAPD-Marker von Hybriden aus S1 ( <i>S. saxorum</i> x <i>S. stomandrus</i> ) und S2 ( <i>S. saxorum</i> ) anhand der Amplifikation des Primers A02 .....	40
<b>Abbildung 2.27:</b> Zwei Hybriden aus S3 ( <i>S. caulescens</i> ) und S2 ( <i>S. saxorum</i> ) .....	41
<b>Abbildung 2.28:</b> Vergleich der RAPD-Marker von Hybriden aus S3 ( <i>S. caulescens</i> ) und S2 ( <i>S. saxorum</i> ) anhand der Amplifikation des Primers A08.....	42
<b>Abbildung 2.29:</b> Zwei Hybriden aus S14 ( <i>Streptocarpus</i> 'Blue Moon') und S26 ( <i>S. kirkii</i> ). ....	42
<b>Abbildung 2.30:</b> Vergleich der RAPD-Marker von S14 ( <i>Streptocarpus</i> spec Sorte 'Blue Moon'), S26 ( <i>Streptocarpus kirkii</i> ) und einer F1 aus der Kreuzung zwischen S14 und S26 anhand der Amplifikate des Primers A13.....	43
<b>Abbildung 2.31:</b> Zwei Hybriden aus der Kreuzung zwischen S25 ( <i>S. caulescens</i> v. <i>pallens</i> ) und S12 ( <i>S. glandulosissimus</i> ) .....	44

<b>Abbildung 2.32:</b> Blätter von Hybriden aus der Kreuzung S25 x S12 mit verschiedenen Formen.....	44
<b>Abbildung 2.33:</b> Zwei Hybriden aus der Artkreuzung zwischen S14 ( <i>Streptocarpus</i> 'Blue Moon') und S8 ( <i>Streptocarpus</i> 'Boysenberry Delight').....	45
<b>Abbildung 2.34:</b> Eine Hybride aus der Kreuzung zwischen S8 ( <i>Streptocarpus</i> 'Boysenberry Delight') und S2 ( <i>S. saxorum</i> ) und eine Hybride aus der Artkreuzung zwischen S1 ( <i>S. saxorum</i> x <i>S. stomandrus</i> ) und S14 ( <i>Streptocarpus</i> 'Blue Moon').....	46
<b>Abbildung 2.35:</b> Keimung der Embryonen aus Selbstungen von zwei <i>Streptocarpus</i> -Pflanzen auf dem „embryo rescue“-Medium nach sechs Wochen.....	46
<b>Abbildung 2.36:</b> Auf das „embryo rescue“-Medium aufgelegte Plazenten mit Samenanlagen aus Kreuzungen zwischen verschiedenen <i>Streptocarpus</i> -Arten und <i>Saintpaulia</i> -Genotypen .....	47
<b>Abbildung 2.37:</b> Plazenten und Samenanlagen von zwei <i>Saintpaulia</i> -Genotypen und einigen <i>Streptocarpus</i> -Arten, die auf dem Medium bestäubt worden waren.....	48
<b>Abbildung 2.38:</b> Vergrößerung von einigen Samenanlagen sechs Wochen nach In-vitro-Bestäubung bei einigen Kreuzungen von verschiedenen <i>Streptocarpus</i> -Arten und <i>Saintpaulia</i> -Genotypen.....	48
<b>Abbildung 3.1:</b> Regenerierte Sprosse an Blattexplantaten des Genotyps U08 nach sechs Wochen Kultur in Dunkelheit bei 24 °C .....	64
<b>Abbildung 3.2:</b> Schematischer Ablauf der Isolierung und Kultur von Protoplasten aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien aus Gewächshaus- und In-vitro-Kultur.....	66
<b>Abbildung 3.3:</b> Einschätzung der Vitalität von Protoplasten bei U08 mittels FDA direkt nach der Isolierung .....	70
<b>Abbildung 3.4:</b> Teilung der Protoplasten von <i>Saintpaulia ionantha</i> nach 14 Tagen.....	71
<b>Abbildung 3.5:</b> Mikrokallusbildung der Protoplasten bei U03 einen Monat nach der Protoplastenisolierung.....	72

<b>Abbildung 3.6:</b> Zwei Mikrokalluse von U03 nach sechs Wochen und ein Mikrokallus von U08 nach 2 Monaten Kultur in Alginafilm.....	73
<b>Abbildung 3.7:</b> Ein Kallus von U03 nach zehnwöchiger Kultur auf Medium KR10 und nach 12 und 15 Wochen auf Medium 9.1 .....	74
<b>Abbildung 3.8:</b> Aus Protoplasten regenerierte Sprosse von U08 auf hormonfreiem Sprosserhaltungsmedium 9.0.....	74
<b>Abbildung 4.1:</b> Die Gefäße für die Kultur der Protoplasten im flüssigen Medium. ....	83
<b>Abbildung 4.2:</b> Sprossregeneration an Blattexplantaten von S1 und S3 unter Licht nach 6 Wochen.....	86
<b>Abbildung 4.3:</b> Sprossregeneration an Blattexplantaten von S3 und S1 in Dunkelheit nach 6 Wochen .....	87
<b>Abbildung 4.4:</b> Vergleich der Regenerationsintensität von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten bei Kultur unter Licht und in Dunkelheit. ....	87
<b>Abbildung 4.5:</b> Erscheinungsbild von Sprossen bei Kultur im flüssigen Medium von drei <i>Streptocarpus</i> -Arten, die in Dunkelheit kultiviert wurden. ....	88
<b>Abbildung 4.6:</b> Kallusbildung an Explantaten von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten auf dem Kallusinduktionsmedium B5 mit zwei 2,4-D-Konzentrationen .....	89
<b>Abbildung 4.7:</b> Kallusbildung auf Explantaten von zwei <i>Streptocarpus</i> -Arten auf dem Kallusinduktionsmedium mit 0,2 mg / l 2,4-D .....	89
<b>Abbildung 4.8:</b> Ausbeute an Protoplasten durch drei verschiedene Enzymlösungen aus verschiedenen Pflanzenorganen von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	92
<b>Abbildung 4.9:</b> Vergleich der Ausbeute von Protoplasten aus regenerierten Sprossen bei fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten nach sechswöchiger Kultur unter Licht oder in Dunkelheit.....	94
<b>Abbildung 4.10:</b> Ausbeute von Protoplasten aus Blättern von <i>Streptocarpus</i> -Arten, die aus In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium entnommen wurden .....	95

<b>Abbildung 4.11:</b> Ausbeute von Protoplasten aus Blättern von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten, die unter verschiedenen Lichtbedingungen herangewachsen waren .....	95
<b>Abbildung 4.12:</b> Protoplastenausbeute von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten aus Stängeln, die unter verschiedenen Lichtbedingungen herangewachsen waren .....	96
<b>Abbildung 4.13:</b> Ausbeute von Protoplasten aus Blättern und Stängeln von fünf <i>Streptocarpus</i> -Arten nach dreiwöchiger Kultur im flüssigen Medium in Dunkelheit .....	97
<b>Abbildung 4.14:</b> Freigesetzte Protoplasten in Suspensionen von verdautem Pflanzengewebe aus drei <i>Streptocarpus</i> -Arten nach 16 Stunden Enzymbehandlung und einer Stunde auf einem Kreisschüttler .....	99
<b>Abbildung 4.15:</b> Anfärbung der Protoplasten aus S1 (Stängel) durch FDA zur Einschätzung der Vitalität.....	101
<b>Abbildung 4.16:</b> Änderungen der Durchmesser der kultivierten Protoplasten aus drei <i>Streptocarpus</i> -Arten im flüssigen 8pm7-Medium mit verschiedenen Osmolaritäten. ....	104
<b>Abbildung 4.17:</b> Die Vitalität der kultivierten Protoplasten aus <i>Streptocarpus</i> -Arten im flüssigen 8pm7-Medium mit verschiedenen Osmolaritäten.....	105
<b>Abbildung 4.18:</b> Die Zellteilung bei Protoplastenkulturen bei zwei <i>Streptocarpus</i> -Arten. ....	106
<b>Abbildung 4.19:</b> Die Mikrokallusse aus Protoplasten von Stängeln bei S1 und die Mikrokallusse von Protoplasten aus Blättern bei S2 .....	108
<b>Abbildung 4.20:</b> Mikrokallusse aus Protoplasten von Blättern bei S3 nach vier Wochen und Mikrokallusse aus Protoplasten von Blättern bei S1 nach sechs Wochen .....	109
<b>Abbildung 4.21:</b> Kallusse von S3 aus Protoplasten aus Blättern von In-vitro-Sprossen, die in flüssigem Medium in Dunkelheit kultiviert worden waren, nach zweimaliger Subkultur auf dem Medium KR10 .....	111

<b>Abbildung 4.22:</b> Wurzelbildung von Kallussen aus Protoplasten bei S1 nach zweimaliger Subkultur auf Medien mit unterschiedlichen Wachstumsregulatoren .....	112
<b>Abbildung 5.1:</b> Vergleich von Vitalität und Anteil zweikerniger Protoplasten in Abhängigkeit von zwei verschiedenen pH-Werten bei der Protoplastenfusion zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> (U8) und <i>Streptocarpus</i> (S3). .....	144
<b>Abbildung 5.2:</b> Vergleich der Vitalität der Protoplasten in Abhängigkeit von der PEG-Behandlungszeit während der Protoplastenfusion zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> (U8) und <i>Streptocarpus</i> (S3).....	145
<b>Abbildung 5.3:</b> Vergleich der Vitalität der Protoplasten nach der Protoplastenfusion mit und ohne Zentrifugieren bei zwei Wiederholungen. ...	148
<b>Abbildung 5.4:</b> Vergleich der Vitalität der Protoplasten nach der Fusion mit und ohne Anreicherung der Protoplasten .....	149
<b>Abbildung 5.5:</b> Vergleich der Vitalität der Protoplasten nach der Fusion und nach der Reinigung durch Saccharoselösung .....	150
<b>Abbildung 5.6:</b> Kernanzahl der Protoplasten nach der Fusion und nach der Reinigung bei der Protoplastenfusion zwischen zwei <i>Streptocarpus</i> -Arten.....	151
<b>Abbildung 5.7:</b> Die Aggregation der Protoplasten ca. eine min. nach der PEG-Behandlung .....	152
<b>Abbildung 5.8:</b> Die Vitalität der Protoplasten nach der Fusion bei verschiedenen Protokollen .....	153
<b>Abbildung 5.9:</b> Zweikernige Protoplasten nach der Fusion nach der Anfärbung durch DAPI und Ethidiumbromid .....	154
<b>Abbildung 5.10:</b> Protoplasten, vermutlich von <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus caulescens</i> in der PS6-Lösung .....	155
<b>Abbildung 5.11:</b> Zweikerniger Protoplast aus der Fusion zwischen Protoplasten von <i>Streptocarpus caulescens</i> und <i>Saintpaulia ionantha</i> .....	156
<b>Abbildung 5.12:</b> Entwicklung von Protoplasten aus der Fusion zwischen <i>Streptocarpus caulescens</i> und <i>Saintpaulia ionantha</i> (U08).....	156

<b>Abbildung 5.13:</b> Durchflusscytometrische Histogramme von Blättern zweier <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten .....	159
<b>Abbildung 5.14:</b> Durchflusscytometrische Histogramme von Blättern zweier <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	160
<b>Abbildung 5.15:</b> Ploidiestufenbestimmung durch durchflusscytometrische Histogramme von Kallussen aus der Fusion zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus</i> .....	160
<b>Abbildung 5.16:</b> Durchflusscytometrisches Histogramm eines Kallus aus der Fusion zwischen <i>Saintpaulia ionantha</i> und <i>Streptocarpus caulescens</i> .....	161
<b>Abbildung 5.17:</b> Die prozentuale Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von Kallussen mit einem Hauptpeak aus vier Fusionen zwischen <i>Streptocarpus</i> -Arten und <i>Sanitpaulia ionantha</i> .....	162
<b>Abbildung 5.18:</b> Vergleich von S3, U08 und 15 Kallussen aus der Fusion von S3 und U08 anhand des Primers A09 .....	163
<b>Abbildung 5.19:</b> Vergleich von S3, U08 und 15 Kallussen aus der Fusion von S3 und U08 anhand des Primers A15.....	164
<b>Abbildung 5.20:</b> Fusion zwischen Protoplasten aus S1 und S12 nach Zugabe des Mediums BNE 9 mit einem pH-Wert von 9,5 .....	165
<b>Abbildung 5.21:</b> Durchflusscytometrische Histogramme für Blätter der zwei <i>Streptocarpus</i> -Arten .....	168
<b>Abbildung 5.22:</b> Die prozentuale Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von Kallussen mit einem „Hauptpeak“ aus Fusionen zwischen <i>Streptocarpus</i> -Arten.....	169
<b>Abbildung 5.23:</b> Die Entwicklung von Sprossen auf einem Kallus aus der Protoplastenfusion zwischen S1 x S12 auf dem Medium .....	170
<b>Abbildung 5.24:</b> S1 ( <i>S. saxorum</i> x <i>S. stomandrus</i> ), S12 ( <i>S. glandulosissimus</i> ) und die Pflanze aus der Protoplastenfusion zwischen S1 und S12 .....	170
<b>Abbildung 5.25:</b> Durchflusscytometrisches Histogramm des Kallus .....	171
<b>Abbildung 5.26:</b> Vergleich von S1, S12 und 14 Kallussen aus der Fusion anhand des Primers A09.....	172

<b>Abbildung 5.27:</b> Vergleich von S1, S12 und 9 Kallussen aus der Fusion zwischen S1 x S12 anhand des Primers A04.....	173
<b>Abbildung 5.28:</b> Vergleich von S1, S12 und der regenerierten Pflanze aus der Fusion zwischen S1 x S12 anhand des Primers A20 .....	174
<b>Abbildung 5.29:</b> Zwei zweikernige Protoplasten nach der Elektrofusion zwischen S3 und U08.....	174
<b>Abbildung 5.30:</b> Vergleich der Verluste an Protoplasten während der Elektrofusion zwischen S3 und U8 bei verschiedenen Behandlungen .....	175
<b>Abbildung 5.31:</b> Einfluss verschiedener Behandlungen während der Elektrofusion auf Intaktheit, Vitalität und Zweikernigkeit der Protoplasten .....	176
<b>Abbildung 5.32:</b> Ein zweikerniger Protoplast nach der Elektrofusion zwischen S3 ( <i>Streptocarpus caulescens</i> ) und U08 ( <i>Saintpaulia ionantha</i> ) .....	177
<b>Abbildung 9.1:</b> Das Phänogramm der Subfamilie Gesneriaceae nach der Sequenzierung des Chloroplastengens „ndh F“ .....	229
<b>Abbildung 9.2:</b> Phänogramm von <i>Saintpaulia</i> -Arten und <i>Streptocarpus holstii</i> , ....	230
<b>Abbildung 9.3:</b> Phänogramm von <i>Streptocarpus</i> -Arten. ....	231
<b>Abbildung 9.4:</b> Vergleich der prozentualen In-vitro-Pollenkeimung von <i>Saintpaulia ionantha</i> -Sorten und <i>Streptocarpus</i> -Arten auf den zwei Medien ..	232
<b>Abbildung 9.5:</b> Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von Knospen und geöffneten Blüten aus verschiedenen <i>Streptocarpus</i> -Arten und <i>Saintpaulia</i> -Genotypen .....	232
<b>Abbildung 9.6:</b> Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von verschiedenen <i>Streptocarpus</i> -Arten und <i>Saintpaulia</i> -Genotypen in Bezug zur Lagerungszeit.....	232
<b>Abbildung 9.7:</b> Regressionslinie zwischen der Pollenvitalität, ermittelt mit FDA-Färbung, und der Pollenkeimung in vitro.....	233
<b>Abbildung 9.8:</b> Regressionslinie zwischen der Pollenvitalität, ermittelt mit MTT-Färbung, und der Pollenkeimung in vitro.....	234

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>2,4-D</b>	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<b>2iP</b>	6- ( $\gamma$ - $\gamma$ -Dimethylallylamino) purin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Alternate current (Wechselstrom)
<b>AS</b>	Adeninsulphat
<b>ASH</b>	Asymmetrische somatische Hybride
<b>BAP</b>	6-Benzylaminpurin
<b>Bp</b>	Basenpaar
<b>BR</b>	Brassinosteroid
<b>CPW</b>	Cell and Protoplasts Washing Medium
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cpDNA</b>	Chloroplast DNA
<b>DAPI</b>	4,6-Diamidino-2-phenylindol
<b>DC</b>	Direcet current (Gleichstrom)
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxide
<b>DNA</b>	Desoxyribose Nucleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxy Nukleotidtriphosphat
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>Eth.Br.</b>	Ethidiumbromid
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FG</b>	Freiheitsgrad
<b>FM</b>	Frischmasse
<b>FDA</b>	Fluoreszeindiacetat
<b>G.H</b>	Gewächshaus
<b>HEPES</b>	2- (4- (2-Hydroxyethyl) -1-Piperaziny) - Ethansulfonsäure
<b>H<sub>2</sub>O</b>	deionisiertes Wasser
<b>H.Sec</b>	Hochfrequenzdauer Sekunden
<b>HFS</b>	Hochfrequenzstärke V
<b>ITS</b>	Internal Transcribed Spacer
<b>IAA</b>	Indol-3-Essigsäure
<b>Kb</b>	Kilobasenpaare

<b>Kin</b>	Kinetin
<b>KM8p</b>	Protoplastenkulturmedium nach KAO UND MICHAYLUK
<b>M</b>	Molar
<b>MES</b>	2- (N-Morpholino) ethansulfonsäure
<b>MT</b>	Metatopolin
<b>MTT</b>	2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>NAA</b>	Naphthylessigsäure ( $\alpha$ -Isomer)
<b>NaAc</b>	Natriumacetat
<b>NaHCl</b>	Natriumhypochlorit
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>PCR</b>	Polymerase Ketten Reaktion
<b>PEG</b>	Polyäthylenglycol
<b>P.S.</b>	Petrischale
<b>PVP</b>	PolyVinilPirollion
<b>Pulse</b>	Spannungshöhe V
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>rDNA</b>	Ribosomal DNA
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	Ribose Nucleinsäure
<b>Rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>S.ms</b>	Spannungspulsdauer Mikrosekunden
<b>SSH</b>	Symmetrische somatische Hybride
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TDZ</b>	Thidiazuron
<b>Taq</b>	Thermus aquaticus
<b>TE</b>	Tris-EDTA-Puffer
<b>U</b>	Unit
<b>Ver.</b>	Versuch
<b>V.T.</b>	Volumenteil
<b>Wdh.</b>	Wiederholung
<b>W.W.</b>	Wechselwirkung

## 1 Einleitung

### 1.1 *Saintpaulia* und *Streptocarpus*

Die *Gesneriaceae* sind eine große Familie, die zum großen Teil tropische Kräuter und Sträucher umfasst. Viele von ihnen bilden attraktive Blüten und werden als Zierpflanzen verwendet. Sie wachsen gut bei relativ wenig Licht und gemäßigten Temperaturen. Viele, wie die *Streptocarpus*-Arten, benötigen Schutz vor direkter Sonnenstrahlung und hohen Temperaturen.

Während viele Wildarten der Gattung *Saintpaulia* gefährdet sind (WALTER UND GILLET 1998), zählt *Saintpaulia ionantha* lange zu den wirtschaftlich bedeutendsten blühenden Topfpflanzen. Beispielsweise wurden 2000 in der Bundesrepublik Deutschland knapp 11 Mio. Pflanzen produziert (STAT. BUNDESAMT 2000), inzwischen wird jedoch von einer geringeren Menge ausgegangen.

Die Gattung *Saintpaulia* stammt aus Südkenia und Nordosttansania. Die Arten sind lokal in den Gebirgen in Tansania und Kenia beheimatet. Die heute als Topfpflanzen verwendeten *Saintpaulia ionantha*-Hybriden entstanden aus Kreuzungen von *Saintpaulia confusa* und *Saintpaulia ionantha* (ERHARDT UND ERHARDT 1993). Ende des 19. Jahrhunderts wurde das Usambaraveilchen von WENDLAND (1898) erstmals beschrieben. Seit der Erstbeschreibung wurde *Saintpaulia* intensiv züchterisch bearbeitet.

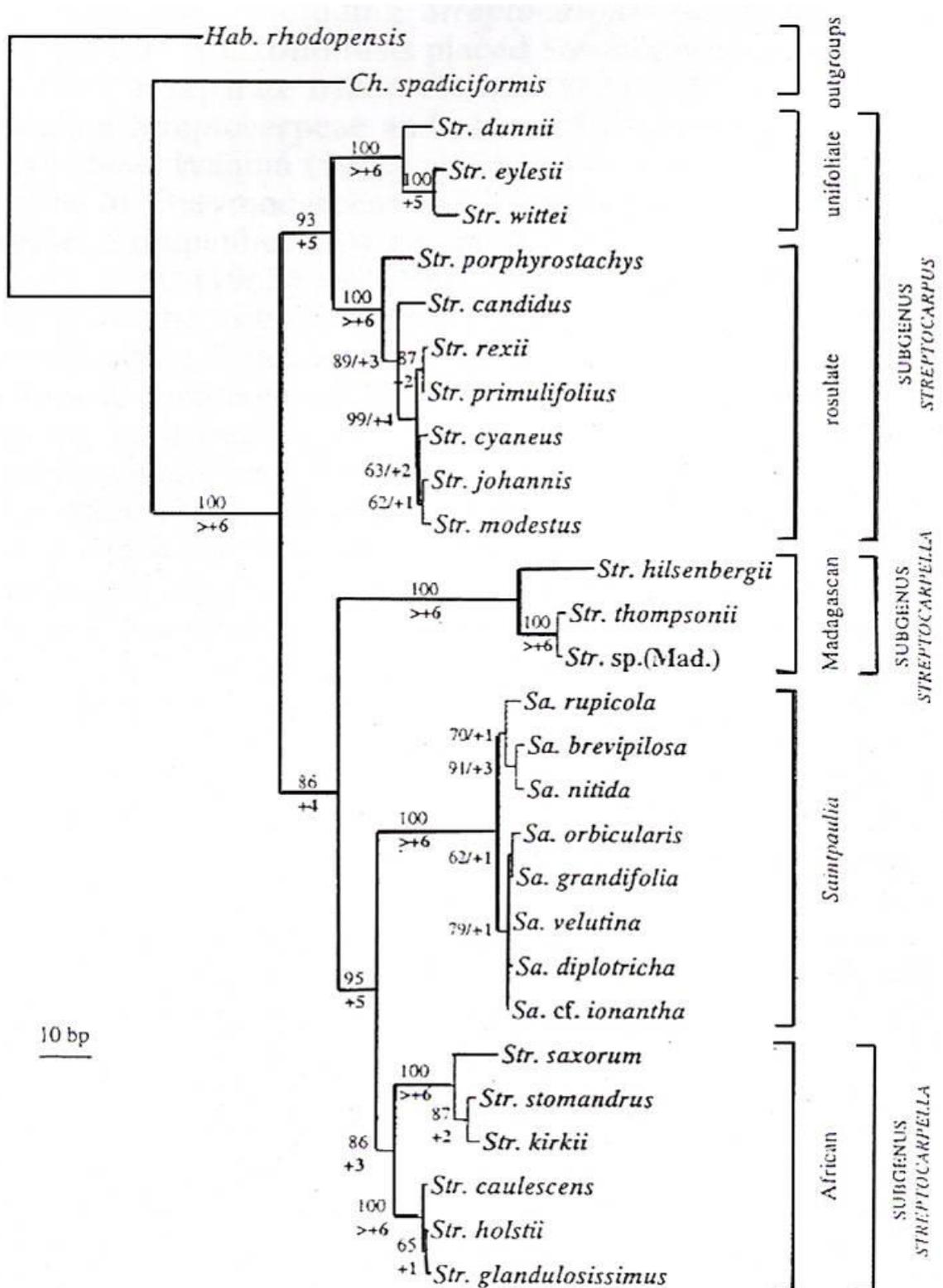
Die Gattung *Streptocarpus* ist in Südafrika (87 Arten) und Madagaskar und auf den Comoro-Inseln (41 Arten) beheimatet. Vier *Streptocarpus*-Arten stammen aus Asien, die allerdings nicht eng mit den afrikanischen und madagaskarischen Arten verwandt sind. Zurzeit sind die *Streptocarpus*-Arten nach ihren morphologischen Merkmalen in zwei Untergattungen gegliedert. Die Untergattung *Streptocarpella* (44 Arten) besitzt gestreckte Sprossachsen. Bei der Untergattung *Streptocarpus* (88 Arten) ist das apikale Sprossmeristem degeneriert, und im Extremfall wird aus dem Keimblatt eine kräftige rosettenförmige Pflanze gebildet. Bei diesen Rosettentypen werden die Blütenstängel auf der Basis der Lamina oder sprossförmige Blattstiele „phyllomorph“ gebildet (JONG 1973, 1978). Diese Rosettentypen sind auch wirtschaftlich bedeutend. Die Anzahl der Chromosomen ist bei der Untergattung *Streptocarpus*  $x = 16$ , bei der Untergattung *Streptocarpella*  $x = 15$  (LAWRENCE 1940), sowie bei *Saintpaulia*  $x = 15$ .

*Saintpaulia* und *Streptocarpus* sind in vielen Eigenschaften ähnlich. Beide haben zumeist violette Blüten und eine ähnliche Pollenstruktur. Die Ähnlichkeit dieser Eigenschaften legt nahe, dass die beiden Gattungen mit hoher Wahrscheinlichkeit nah verwandt sind. Die

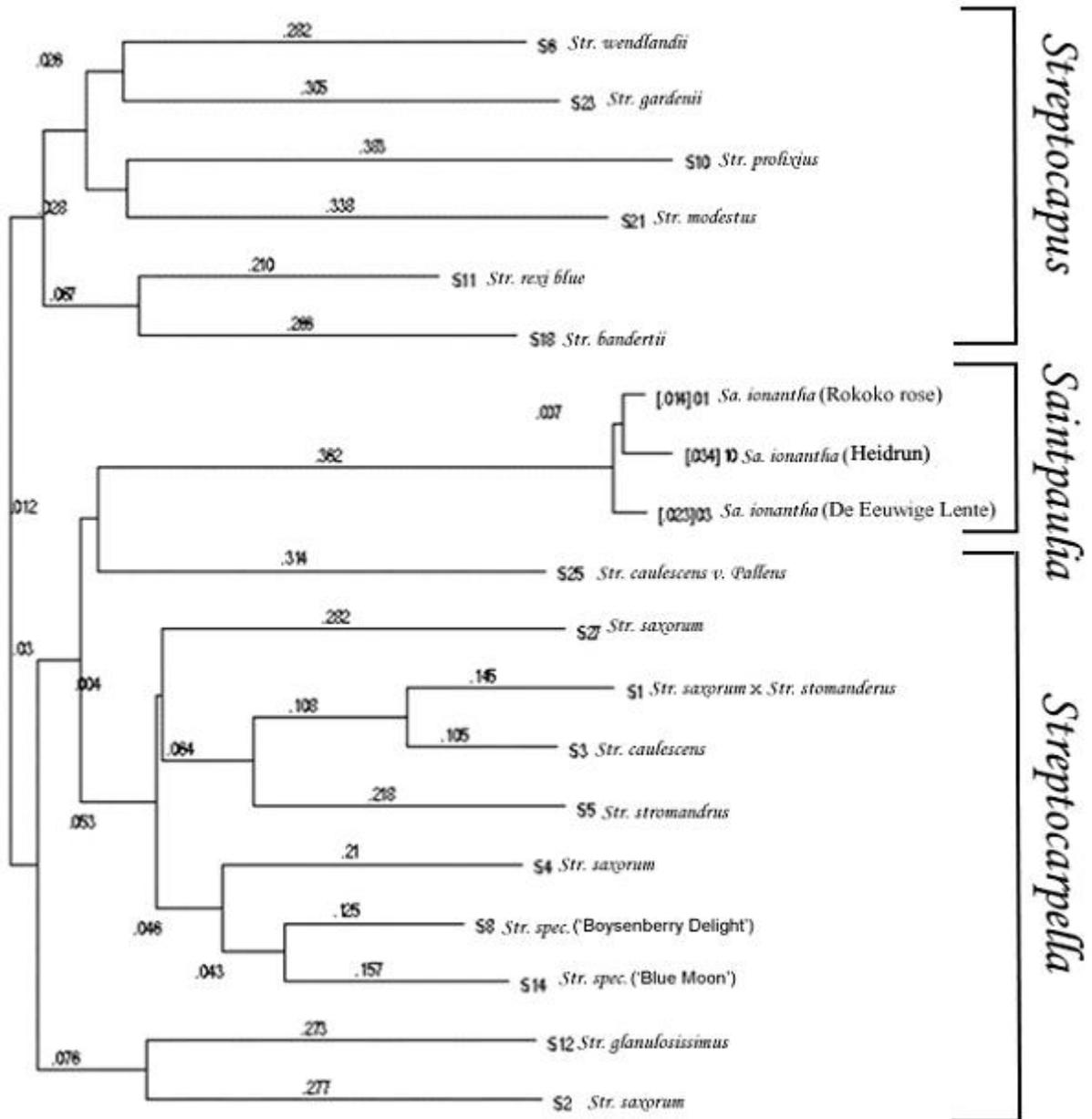
Verwandtschaftsgrade verschiedener *Streptocarpus*- und *Saintpaulia*-Arten wurden anhand molekularer Marker von mehreren Wissenschaftlern (MÖLLER UND CRONK 1997; 1999; 2001a, b; SMITH ET AL. 1997; MÖLLER ET AL 1999; JONG UND MÖLLER 1999; HUGHES ET AL. 2004) auf verschiedene Art und Weise (DNA, cpDNA, rDNA, cDNA) untersucht (s. Abb. 9.1, Abb. 9.2, Abb. 9.3).

Eine Untersuchung der Sequenzierung des Chloroplasten-Gens *ndhF* (SMITH ET AL. 1997, s. A1.3) hat gezeigt, dass *Saintpaulia* nah verwandt mit der Untergattung *Streptocarpella* ist (SMITH ET AL. 1998). Auch durch die Analyse von ribosomaler DNA (ITS) von 146 *Streptocarpus*-Arten konnte die Verwandtschaft zwischen *Streptocarpus* und *Saintpaulia* festgestellt werden (MÖLLER UND CRONK 2001a) (Abb.1.1).

Für eine Diplomarbeit wurden 17 *Streptocarpus*-Arten und drei *Saintpaulia ionantha*-Sorten ausgesucht und durch RAPD-Marker die genetische Distanz zwischen den Genotypen berechnet (AFKHAMI 2002). Das Phänogramm zeigt die Verwandtschaft zwischen *Saintpaulia* und der Untergattung *Streptocarpella* (Abb. 1.2).



**Abbildung 1.1:** Phänogramm von *Streptocarpus* und *Saintpaulia*, das auf der Sequenzanalyse aus Kombinationen von ITS1 und ITS2 basiert. Oben sind *Streptocarpus*-Arten mit Rosettenwuchs (Untergattung *Streptocarpus*) und unten die Arten aus der Untergattung *Streptocarpella* dargestellt. Die *Saintpaulia*-Arten liegen dazwischen, mit größerer Nähe zu den *Streptocarpella*-Arten (MÖLLER UND CRONK 2001b)



**Abbildung 1.2:** Phänogramm von 26 *Streptocarpus*-Arten und drei *Saintpaulia ionantha*-Sorten, erstellt mit RAPD-Marker über den Distanzkoeffizienten nach Dice. *Saintpaulia ionantha* sind näher mit der Untergattung *Streptocarpella* verwandt

## 1.2 Züchtungsmethoden

Seit mehr als 10.000 Jahren baut der Mensch Pflanzen als Nahrungsmittel, Rohstoff und Zierpflanzen an. Züchtung fängt zunächst durch Auslese (Selektion) von Pflanzen mit erwünschten Eigenschaften an. Mit Hilfe der Pflanzenzüchtung können in einer neuen Linie Eigenschaften neu miteinander kombiniert werden. Durch die Anwendung von Kreuzungen entstanden im Laufe der Zeit aus Wildpflanzen unsere heutigen Kulturpflanzen. Deren Eigenschaften, die noch heute die Grundlage der klassischen Genetik bilden, werden immer wieder neu kombiniert. In den letzten 30 Jahren wurde die Züchtung mit neuen Methoden aus

den Bereichen Biologie und Biotechnologie verbessert oder ergänzt. Die Anwendungen von In-vitro-Kulturtechniken, Mutationsinduktion, Genommutation, Gentransformation und Protoplastenfusion sind neue Methoden, die heute je nach Zuchtziel verwendet werden. Darüber hinaus werden in zunehmendem Maße auch molekulare Strategien eingesetzt, die zum Teil die klassischen Methoden unterstützen, aber auch völlig neue Möglichkeiten eröffnen.

### **1.3 Besonderheiten der Zierpflanzenzüchtung**

Die Züchtung von Zierpflanzen hat eine lange Tradition und wird weltweit praktiziert. Außer allgemeinen Zuchtzielen wie Resistenz gegen Krankheiten, Schädlinge, Frost usw. gibt es einige Besonderheiten, die nur für Zierpflanzen wichtig sind. Manchmal stehen die Interessen eines Züchters von Zierpflanzen im Gegensatz zu den Zuchtzielen für Nutzpflanzen. Bei Sonnenblumen für die Ölproduktion sind z.B. Pflanzen erwünscht, die wenige Verzweigungen haben und deren Blütenzahl reduziert ist, wobei sich alle Blüten gleichzeitig öffnen sollen. Bei Sonnenblumen, die als Zierpflanzen dienen sollen, sind hingegen mehrere Verzweigungen und eine hohe Anzahl von Blüten erwünscht. Auch werden die Pflanzen selektiert, die ihre Blüten über einen längeren Zeitraum öffnen.

Manchmal können bei Zierpflanzen, im Gegensatz zu Kulturpflanzen, sogar virusbefallende Pflanzen erwünscht sein, wenn diese interessante Muster auf der Blüte oder den Blättern bilden. Chimären, die durch eine genetische Störung weniger Photosynthese leisten, sind bei vielen Zierpflanzen beliebt. Viele Zierpflanzen werden vegetativ vermehrt. Deshalb spielen Gattungskreuzungen und zum Teil Protoplastenfusionen von verschiedenen Gattungen bei der Zierpflanzenzüchtung eine große Rolle. Beispielsweise wurden aus solchen Kreuzungen bei Rosen neue Arten hergestellt (BRICHET, H. 2003). Somit kommt der In-vitro-Kultur eine hohe Bedeutung zu. Dazu gehören die Anwendung der „embryo rescue“-Technik, Protoplastenfusion und In-vitro-Bestäubung.

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Die Nachfrage nach neuen Zierpflanzen ist in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen. Dabei geht es nicht um die Wildarten, sondern um die Zierpflanzen, die durch züchterische Arbeit und Kreuzungen hergestellt wurden. Die Kreuzung zwischen zwei Genotypen außerhalb einer Art ist problematisch. Daher ist die Herstellung neuer interessanter Zierpflanzen mit Kreuzungen begrenzt.

Das Verfahren der sogenannten „somatischen Hybridisierung“ beinhaltet das Verschmelzen (Fusionieren) zweier Protoplasten unterschiedlicher Herkunft (auch unterschiedlicher Art).

Die aus dem Produkt regenerierte Pflanze vereint das Erbmateriale beider Ausgangszellen. Im Gegensatz zu konventionellen Kreuzungen, bei denen durch das Verschmelzen von zwei haploiden gametischen Zellen (Eizelle und Pollen) eine neue Pflanze gebildet wird, werden durch die somatische Hybridisierung zwei Protoplasten aus verschiedenen Pflanzenteilen, beispielsweise Blättern, Sprossen oder Wurzeln, miteinander kombiniert und eine z.B. tetraploide Pflanze hergestellt, die eine im Vergleich zu normalen diploiden Pflanzen verdoppelte Chromosomenanzahl besitzt.

Diese Methode wurde in den 1970er Jahren entwickelt. Eine Voraussetzung für die Protoplastenfusion ist die Regenerationsfähigkeit mindestens eines Partners der Fusion, daher müssen aus Protoplasten eines Partners Pflanzen regeneriert worden sein. Innerhalb der Gattung *Petunia* (ETTINGER-PALTIN ET AL. 1984, TAGUCHI ET AL. 1993) und zwischen den Gattungen *Petunia* und *Salpiglossis* (LEE ET AL. 1994) wurden beispielsweise erfolgreiche Protoplastenfusionen durchgeführt.

Die regenerierten Pflanzen aus der Protoplastenfusion können mit molekularen Markern, z.B. RAPD-Markern, identifiziert werden.

In den folgenden Kapiteln werden Versuche und Untersuchungen dargestellt, die zwei Gattungen *Sainpaulia ionantha* und *Streptocarpus* sowie Arten innerhalb der Gattung *Streptocarpus* zu kombinieren, mit dem Ziel, neue Zierpflanzen herzustellen.

## 2 Gametische Hybridisierungen

### 2.1 Einleitung

Zu den grundlegenden Techniken, derer sich Züchter bedienen, um Vielfalt zu erzeugen, gehören Kreuzungen. Dabei wird der Pollen einer Vaterpflanze auf die Narbe einer Mutterpflanze aufgebracht. Bei der Kreuzung wird das gesamte Erbgut der Kerngene zweier Pflanzen nach den seit 1866 bekannten mendelschen Vererbungsregeln kombiniert. Dabei wird das Erbgut von zwei verschiedenen Elternpflanzen durch gezielte Kreuzung vermischt. Auf diese Weise ist seit der Erkenntnis der Vererbungslehre durch Mendel eine systematische Züchtung möglich, und es entstehen Pflanzen, die die Merkmale beider Eltern in sich tragen.

Intraspezifische Kreuzung führt innerhalb einer Art in der Regel zu Samenansatz, intergenerische (zwischen verschiedenen Gattungen) und interspezifische (zwischen Arten aus gleichen oder unterschiedlichen Gattungen oder Familien) Kreuzungen sind jedoch nur selten oder unter Zuhilfenahme besonderer Behandlungen der Pflanze oder Kulturtechniken möglich. Um entscheiden zu können, welche Maßnahmen geeignet sind, um die Kreuzungsbarriere zu überwinden, sind Informationen über die physiologischen und

biologischen Abläufe nach dem Auftragen des Pollens auf die Narbe entscheidend.

Hybriden zwischen den Arten und Polyploidie werden heute als die wichtigste Quelle für Evolution und Domestizierung von blühenden Pflanzen erkannt (VAN TUYL UND KI-BYUNG 2004). Kreuzungen zwischen den Arten spielen bei Züchtungen von Zierpflanzen für die Variation eine sehr wichtige Rolle und liefern Möglichkeiten, die in einer Art alleine nicht vorhanden sind (VOLKER UND ORME, 1998).

Derzeit gibt es viele Zierpflanzen, die aus Artkreuzungen entstanden sind. Dazu zählen z.B. *Rudbeckia hirta* x *R. laciniata* (AL-ATABEE, ET AL. 1990), *Helianthus annuus* L (BARTH ET AL. 1993), *Tulipa kaufmanniana* x *T. gesneriana* L (CUSTERS ET AL. 1995), *Dianthus barbatus* x *Gypsophyla paniculata* (NAKANO ET AL. 1996), *Rosa hybrida* (MOTTLEY ET AL. 1996), *Rhododendron* (EECKHAUT ET AL. 2007). Auch zukünftig bieten interspezifische oder intergenerische Hybridisierungen die Möglichkeit, Variabilität zu schaffen, aus der dann neue Formen ausgelesen werden.

Je weiter die genetische Distanz zwischen zwei Arten ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass Barrieren die Entwicklung von Hybriden verhindern. Durch moderne Zuchtmethoden lassen sich diese Barrieren jedoch vielfach überwinden. Um die richtigen Methoden auswählen zu können, ist die Kenntnis der Art und des Zeitpunkts des Auftretens der Inkompatibilität unerlässlich. Bestehen bereits vor der Verschmelzung von Pollen und Eizelle zur Zygote Inkompatibilitätsreaktionen, so lassen sich diese durch verschiedene Techniken der Bestäubung umgehen. Bei Lilien beispielsweise sind Kreuzungen über Artgrenzen hinweg dadurch möglich, dass die Narbe abgeschnitten wird („cut-style“), eine kompatible Narbe auf den Griffel gepfropft wird („grafted style“) und Phytohormone oder In-vitro-Befruchtungen eingesetzt werden (VAN TUYL ET AL. 1991). Unverträglichkeitsreaktionen zwischen Pollen und Narbe lassen sich teilweise auch durch spezielle Umweltbedingungen wie hohe Temperaturen oder durch den Einsatz chemischer Substanzen ausschalten (ASCHER, 1973).

Treten die Barrieren jedoch erst nach der Befruchtung auf, so sind andere Maßnahmen zu ihrer Überwindung zu ergreifen. Wenn die Pollenschläuche die Samenanlagen erreichen und eine Befruchtung stattfindet, so ist es in vielen Fällen gelungen, den sich entwickelnden Embryo zu einer Pflanze heranzuziehen, indem er aus dem mütterlichen Gewebe herauspräpariert und auf einem Nährmedium in vitro zum Austrieb gebracht wird („embryo rescue“). Je nach Pflanzenart muss der optimale Zeitpunkt für die Entnahme des Embryos oder des gesamten Fruchtknotens, wie bei *Cyclamen*-Artbastarden berichtet (ISHIZAKA UND UEMATSU 1995, EWALD 1996), in Versuchen ermittelt werden. Als Beispiel für gelungene interspezifische Hybridisierungen im Bereich der Zierpflanzen durch den Einsatz von

„embryo rescue“ seien hier nur einige genannt: *Lilium* (VAN TUYL ET AL. 1991), *Alstroemeria* (DE JEU UND JACOBSEN 1995) oder *Dianthus* (NIMURA ET AL. 2003). Beispiele für intergenerische Hybriden im Bereich der Zierpflanzen sind weniger häufig als interspezifische. Die Kreuzung über Gattungsgrenzen hinweg gelang z.B. in der Familie *Orchidaceae*, beispielsweise zwischen *Vanda* und *Ascocenda* (LEE ET AL. 1996, FUCHS 1997) oder zwischen *Phalaenopsis* und *Doritis* (z.B. CHANG ET AL. 2000). Als drittes Beispiel wurde eine Kreuzung von *Schlumbergera* und *Hatiora* publiziert (BOYLE UND IDNUM 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden Kreuzungen zwischen den Gattungen *Streptocarpus* und *Saintpaulia* sowie einige intragenerische Kreuzungen innerhalb der Gattung *Streptocarpus* durchgeführt.

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 Pflanzenmaterial

Für diese Versuche wurden sieben Genotypen von *Saintpaulia ionantha* (Tab. 2.1) ausgesucht. Es wurden fünf Sorten von *Saintpaulia ionantha*, im April 2001 von Fa. Thiesse und über den Blumengroßmarkt Hannover erhalten, sowie zwei Kultivaren aus einer Wildart, erhalten 2003 vom Berggarten Hannover, verwendet.

**Tabelle 2.1:** Genotypenbeschreibung von fünf Sorten von *Saintpaulia ionantha* und zwei Kultivaren aus einer Wildart

Genotyp	Züchter / Herkunft	Sortenname	Blütenbeschreibung
U01	Fischer (Serie Ballet)	‘Rokoko Rose’	rosa, gefüllt
U02	S & G	‘Blue Flame’	weiß mit blauer Mitte, z.T. blauer Rand
U03	MIHO Optimara	‘De Eeuwige Lente’	dunkelblau, große Blüten
U08	Fischer (Serie Ballet)	‘Claudia’	weiß, einfach
U09	Fischer (Serie Ballet)	‘Shannon’	dunkelrot-violett, einfach
U13	Berggarten Hannover		dunkelblau, kleine Blüten
U14	Berggarten Hannover		Blau, kleine Blüten

Tabelle 2.2 listet die verwendeten 16 *Streptocarpus*-Arten mit ihrer Herkunft sowie den

Beschreibungen auf. Der weiße Teil der Tabelle stellt die Arten aus der Untergattung *Streptocarpella* und der graue Teil die Arten aus der Untergattung *Streptocarpus* dar:

**Tabelle 2.2:** Gewählte *Streptocarpus*-Arten für die Untersuchungen

Genotyp	Art	Herkunft	Sortenname	Beschreibung
S1	<i>S. saxorum</i> x <i>S. stomandrus</i>	Selecta	'Good Hope'	Gestreckte Sprossachsen, z. T. hängend Blätter bis 4 cm lang, schwach gezähnt
S2	<i>S. saxorum</i>	Selecta	-	Gestreckte Sprossachsen, z. T. hängend, kurze Internodien Blätter bis 2 cm lang, schwach gezähnt
S3	<i>S. caulescens</i>	Berggarten	-	Gestreckte Sprossachsen, z. T. hängend, längere Internodien Blätter 4-5 cm lang, schwach gezähnt
S4	<i>S. saxorum</i>	Berggarten	-	Gestreckte Sprossachsen, z. T. hängend, Blätter bis 2 cm lang
S5	<i>S. stomandrus</i>	Berggarten	-	Gestreckte Sprossachsen, z. T. hängend Blätter bis 5 cm lang, schwach gezähnt
S6	<i>S. wendlandii</i>	Berggarten	-	Unifoliat
S8	<i>Streptocarpus spec.</i>	Dibleys	'Boysenberry Delight'	Gestreckte Sprossachsen Blätter bis 6 cm lang, schwach gezähnt
S10	<i>S. prolixus</i>	Dibleys	-	Rosette 2-3 Blätter
S11	<i>S. rexii blue</i>	Dibleys	-	Rosette Blätter bis 19 cm lang, glänzend
S12	<i>S. glandulosissimus</i>	Dibleys	-	Gestreckte Sprossachsen, z. T. hängend Blätter bis 5 cm lang, glatter Rand
S14	<i>Streptocarpus spec.</i>	Dibleys	'Blue Moon'	Gestreckte Sprossachsen Blätter bis 3 cm lang, schwach gezähnt
S18	<i>S. baudertii</i>	Dibleys	-	Rosette Blätter bis 23 cm lang, gezähnt
S21	<i>S. modestus</i>	Dibleys	-	Rosette Blätter gezähnt
S23	<i>S. gardenii</i>	Dibleys	-	Rosette Blätter bis 17 cm lang, gezähnt
S25	<i>S. caulescens v. pallens</i>	B&T Seeds (über Selecta Klemm)	-	Gestreckte Sprossachsen Blätter 2-3 cm lang, schwach gezähnt
S26	<i>S. kirkii</i>	Dibleys	-	Gestreckte Sprossachsen Blätter bis 5 cm lang, glatter Rand
S27	<i>S. saxorum</i>	Dibleys	-	Gestreckte Sprossachsen, z. T. hängend Blätter bis 3,5 cm lang

Folgende Abbildung (Abb.2.1) stellt zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten dar:



**Abbildung 2.1:** Zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten: links Sorte 'De Eeuwige Lente' mit violetten Blüten und rechts Sorte 'Claudia' mit weißen Blüten

Abbildung 2.2 zeigt die Blüten- und Blättertypen von einigen Arten in der Übersicht, und Abbildung 2.3 stellt einige *Streptocarpus*-Arten aus der Untergattung *Streptocarpella* dar:



**Abbildung 2.2:** Blüten und Blättertypen von einigen *Streptocarpus*-Arten



Abbildung 2.3: Einige *Streptocarpus*-Arten aus der Untergattung *Streptocapella*

### 2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für die Pollenkeimung in vitro

Für ein Züchtungsprogramm durch Kreuzung ist die Herstellung und Anwendung eines geeigneten Mediums für die Pollenkeimung in vitro wichtig. Ein solches Medium ist eine der Voraussetzungen für ein erfolgreiches Bestäuben in vitro.

Zwei Medien wurden hergestellt und die Pollenkeimung auf den Medien verglichen. Das erste Pollenkeimungsmedium (PM1) wurde nach „fast plants“\* (1997) vorbereitet. Einem Liter Medium wurden 130 g Saccharose, 0,417 g ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,200 g ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0,101 g ( $\text{KNO}_3$ ) und 0,217 g ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) zugesetzt. Abweichend vom Protokoll wurde als Verfestigungsmittel 1 g / l Gelrite (Duchefa, Cat: DUC-G1101.1000) eingesetzt. Danach wurde das Medium bei 1,1 kg / cm<sup>2</sup> Dampfdruck in einem Autoklaven bei 121 °C erhitzt. Dieses Medium wurde für das Bestäuben in vitro (s. 2.2.11) variiert und mit 90 g Saccharose in zwei Formen, einmal ohne Verfestigungsmittel und einmal mit Gelrite, vorbereitet. Anschließend wurden jeweils 5 ml unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser gefüllt.

Das zweite Medium (PM2) wurde nach BREWBAKER UND KWACK (1963) hergestellt. Einem Liter Medium wurden 30 g Saccharose, 0,3 g ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,1 g ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0,1 g ( $\text{KNO}_3$ ) und 0,2 g ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) und 10 g Agar zugesetzt. Dann wurde es wie das erste Medium autoklaviert und in Plastikpetrischalen gefüllt. Der pH-Wert der beiden Medien wurde mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf 5,7 bis 5,8 eingestellt.

### 2.2.3 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für „embryo rescue

Einem Liter „embryo rescue“-Medium wurden 250 mg Edamin, 100 mg Inosit, 2 mg Glycin, 0,5 mg Nicotinsäure, 0,1 mg Thiamin-HCl, 0,5 mg Pyridoxin-HCl und 8 g Plant Agar (Duchefa) zugesetzt. Die Konzentration an Makro- und Mikroelementen entsprach mit Ausnahme des auf 2 mM reduzierten Gehalts an  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (GRUNEWALDT 1977) den Angaben von MURASHIGE UND SKOOG (1962). Das Medium für *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus* enthielt pro Liter 0,1 mg des Phytohormons IAA und 0,5 mg des Phytohormons  $\text{GA}_3$ . Der Saccharosegehalt des Mediums wurde in zwei Versuchen zwischen 40 g / l und 60 g / l variiert. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf

---

\* Wisconsin Fast Plants, University of Wisconsin-Madison, College of Agricultural and Life Sciences, Department of Plant Pathology, 1630 Linden Drive, Madison, WI 53706 1-800-462-7417, wfpqfastplants.cals.wisc.edu

5,7 bis 5,8 eingestellt. Danach wurden die Medien bei 1,1 kg / cm<sup>2</sup> Dampfdruck für 20 min. in einem Autoklaven bei 121 °C erhitzt. Anschließend wurden jeweils 12 ml unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser gefüllt.

#### **2.2.4 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für die In-vitro-Bestäubungen**

Das Medium für die Kultur von Samenanlagen für die Versuche des Bestäubens in vitro wurde wie das Medium für „embryo rescue“ vorbereitet. Nur enthielt dieses Medium nach CHI (2000) pro Liter 0,1 mg NAA und 60 g Saccharose.

#### **2.2.5 Vorbereitung und Zusammensetzung der Anilinblau-Lösung**

In einer Flasche wurden 100 ml destilliertem Wasser 100 mg Anilinblau (Schmid GmbH & Co.) und 0,1M (767,6 mg) K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Darmstadt) zugesetzt. Die Lösung wurde für 10 Stunden der Sonnenstrahlung ausgesetzt, bis sich die Farbe von violett auf gelb veränderte. Danach wurde die Lösung im Kühlschrank gelagert.

#### **2.2.6 Untersuchungen zur Pollenlagerung**

Zuerst wurden die Antheren von frisch geöffneten Blüten genommen und durch Belüftung an der Werkbank für einige Stunden getrocknet, so dass die Pollenkörner durch Stöße auf dem Boden einer Petrischale mit Hilfe einer Pinzette voneinander getrennt werden konnten. Ein Teil der Pollen wurde sofort für weitere Versuche verwendet und ihre Keimungsfähigkeit überprüft. Die weiteren Pollen wurden zum Teil für zwei Wochen im Kühlschrank, zum Teil für drei, sechs und neun Monate im Gefrierschrank für weitere Versuche gelagert und dann auf dem Keimungsmedium kultiviert. Die Pollenkeimung wurde in fünf Gesichtsfeldern an jeweils ca. 500 Pollen gezählt.

Diese Versuche wurden in jeweils zwei Wiederholungen durchgeführt.

#### **2.2.7 Untersuchungen zur Bestimmung der Bestäubungsfähigkeit der Pollen**

Für die Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Kastration bzw. Kreuzung wurden verschiedenen Genotypen Antheren von Blüten aus verschiedenen Stadien, wie ganz jungen Knospen, Knospen, geschlossenen Blüten und geöffneten Blüten (Abb. 2.15, Stadien c-h), entnommen und die Pollen auf ihre Vitalität und Keimfähigkeit untersucht.

#### **2.2.8 Bewertung der Pollenvitalität**

Die Pollenvitalität wurde anhand von zwei Chemikalien untersucht. Dabei wurden die Pollen aus Blüten von fünf *Saintpaulia*-Genotypen (U03, U08, U09, U13, und U14, s. Tabelle 2.1) und zwölf *Streptocarpus*-Arten (S1, S2, S3, S5, S7, S8, S11, S12, S14, S19, S20 und S25,

s. Tabelle 2.2) verwendet.

### 2.2.8.1 Bewertung der Pollenvitalität mit Fluoreszeindiacetat (FDA)

Die Pollenvitalität kann anhand der Färbung mit Fluoreszeindiacetat (FDA, Sigma) nach WIDHOLM (1972) folgendermaßen abgeschätzt werden: Einer Probe wurden 5-10 µl einer 0,25%igen FDA-Lösung in DMSO (Serva) (REUSTLE 1989) zugegeben. Nach kurzer Einwirkzeit wurde diese mit einem Zeiss-Inversmikroskop IM35 bei 100facher Vergrößerung mit der Filterkombination BP 450-490, FT 510, LP 520 betrachtet. Die Lebensfähigkeit wurde in fünf Gesichtsfeldern an jeweils ca. 500 Pollen eingeschätzt, indem die Anzahl fluoreszierender Pollen auf die Gesamtzahl bezogen wurde.

Diese Versuche wurden in jeweils zwei Wiederholungen durchgeführt.

### 2.2.8.2 Bewertung der Pollenvitalität mit 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT oder Thiazolyl blue)

Die Pollenvitalität kann durch die Färbung mit 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT, Sigma, nach KATUM UND FLOWERS 1995) folgendermaßen abgeschätzt werden: Auf der Waage wurde in einer 50 ml-Flasche 100 mg 2,5-Diphenyl Tetrazoliumbromid mit 500 mg Saccharose gemischt und mit H<sub>2</sub>O bis 10 g aufgefüllt. Eine Probe wurde mit 10-15 µl dieser Lösung gemischt und nach kurzer Einwirkzeit mit einem Zeiss-Inversmikroskop IM35 bei 100facher Vergrößerung betrachtet. Die Lebensfähigkeit wurde in fünf Gesichtsfeldern an jeweils ca. 500 Pollen ermittelt, indem die Anzahl dunkelpinkfarbener Pollen auf die Gesamtzahl bezogen wurde.

$$[\%]_{\text{vitale Pollen}} = \frac{\text{Anzahl floureszierender} \text{ \textit{oder} \text{ dunkelpinkfarbener Pollen}}}{\text{Gesamte Pollenanzahl}} \times 100$$

Diese Versuche wurden in jeweils zwei Wiederholungen durchgeführt

### 2.2.9 Untersuchungen zur Pollenkeimung in vitro

Die Pollen verschiedener *Streptocarpus*-Genotypen und *Saintpaulia*-Genotypen wurden mit Hilfe eines Pinsels aufgenommen und so auf das Pollenkeimungsmedium gestreut, dass die Pollenkörner möglichst gleichmäßig auf dem Medium verteilt waren. Die Kultivierung erfolgte zwischen zwei und 20 Stunden bei 24 °C in dunkler Umgebung.

Die Bonitur der aus den Pollen gekeimten Pollenschläuche erfolgte je nach Art und Sorte nach zwei bis 24 Stunden. Zur Auswertung wurde für jeden Genotyp die Anzahl der Pollen mit Schlauch durch die Gesamtzahl der Pollen geteilt und mit 100 multipliziert. Auf jeder

Petrischale wurden fünf Gesichtsfelder und jeweils ca. 500 Pollen ausgezählt.

$$[\%]\text{gekeimter Pollen} = \frac{\text{Anzahl Pollen mit Pollenschlauch}}{\text{Gesamte Pollenanzahl}} \times 100$$

Diese Versuche wurden in jeweils zwei Wiederholungen durchgeführt

### 2.2.10 Kastration und Bestäubungstechnik

Zur Kastration wurden die Pollensäcke im unteren Röhrenteil mit einer Pinzette ertastet, und mit Druck und gleichzeitigem Ziehen wurden die Pollensäcke und ein Teil der Blütenröhre entfernt. Die Übertragung des Pollens erfolgte, indem die Blütenstiele so gebogen wurden, dass die Narbe auf dem Boden einer Petrischale mit Pollenstaub in Kontakt gebracht werden konnte. Die Isolierung der gekreuzten Blüten mit Hilfe einer Pergamenttüte war wegen der schwachen Blütenstängel der *Streptocarpella*-Arten und der sehr kurzen und kompakten Blütenstängel der *Saintpaulia*-Genotypen problematisch. Deshalb wurden ständig, besonders während der Kastrationszeit und bis zwei Wochen nach der Bestäubung, alle überflüssigen Blüten von den Pflanzen entfernt.

### 2.2.11 Untersuchung zur Pollenkeimung in vivo

Aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen Versuchs (s. 2.2.7.) und der Vorversuche wurden die Blüten von allen Genotypen, die in den Tabellen 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben wurden (s. 2.2.10), im Gewächshaus kastriert. Sobald die Narben bereit (weich und klebrig) waren, wurden alle *Streptocarpus*-Arten mit den *Saintpaulia*-Genotypen in beiden Richtungen gekreuzt. Bei manchen Varianten wurde die Narbe von *Saintpaulia*-Genotypen vor der Kreuzung verletzt, entfernt oder der Griffel abgetrennt. In weiteren Versuchen wurden alle *Streptocarpus*-Arten miteinander in beiden Richtungen gekreuzt. Bei den *Saintpaulia ionantha*-Sorten und *Streptocarpus*-Arten der Untergattung *Streptocarpella* wurden nach 24 Stunden und bei *Streptocarpus*-Arten der Untergattung *Streptocarpus* nach 48 Stunden die Fruchtknoten mit Griffel und Narben aus den Blüten genommen. Jede Probe wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und mit 1000 µl Fixiermittel (1 VT Milchsäure 90 % und 2VT EtOH 96 %) aufgefüllt. Anschließend wurde das Fixiermittel abgesaugt und die Fruchtknoten wurden mit 1000 µl sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. In jedes Reaktionsgefäß wurden 1000 µl 1M NaOH zugegeben und die Gefäße für 45 min. im Wasserbad bei 60 °C inkubiert. Danach wurden die Proben erneut wie oben beschrieben mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und nach dem Absaugen des Wassers mit Anilinblau-Lösung (s. 2.2.4) für mindestens 15 min. angefärbt und präpariert.

Zur Präparation wurden die Fruchtblätter mit Hilfe einer Pinzette auf einen Objektträger gelegt und mit einem Tropfen Glycerin und einem Deckglas bedeckt. Nach leichtem Quetschen wurde die Probe mit einem Zeiss-Axiosop (40 Pol) mit der Filterkombination A2 zur UV-Anregung (BP 270-380, 400, LP 430) betrachtet. Die durch Anilinblau angefärbte Callose leuchtet bei UV-Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop bläulich-weiß und ermöglicht die Sichtbarmachung der Pollenschläuche im Fruchtblattgewebe.

In diesem Versuch wurde jede Variante fünfmal und der Versuch zweimal wiederholt.

Um die Geschwindigkeit des Pollenschlauchwachstums zu messen, wurden die Proben zehn Stunden nach den Kreuzungen entnommen und nach der Behandlung mit Anilinblau unter dem Mikroskop präpariert und beobachtet. Dabei wurden die längsten Pollenschläuche unter dem Mikroskop gemessen und durch zehn geteilt.

### **2.2.12 Untersuchungen zu „embryo rescue“**

Zunächst wurde ein Versuch zur Anpassung des Mediums für „embryo rescue“ und danach im Zusammenhang mit den Kreuzungen (s. 2.2.13) ein zweiter Versuch durchgeführt

#### **2.2.12.1 Anpassung des Mediums für „embryo rescue“**

Im Gewächshaus wurden zwei *Streptocarpus*-Arten (S1 und S3) und zwei *Saintpaulia*-Genotypen (U03 und U13) wie im Kapitel 2.2.10 beschrieben kastriert und in beide Richtungen gekreuzt. Als Kontrolle wurden die Pflanzen auch mit ihren eigenen Pollen bestäubt (Selbstung). Für jede Variante wurden acht Blüten eingesetzt. Nach jeweils einer, zwei, drei und vier Wochen wurde ein Teil der Blüten aus dem Gewächshaus entnommen und im Labor unter sterilen Bedingungen präpariert.

Diese Blüten wurden an einer Werkbank unter sterilen Bedingungen folgendermaßen oberflächensterilisiert:

Zunächst wurden sie für 10 min. in einer Natriumhypochloritlösung mit 1,5 % aktivem Chlor unter Zusatz von einem Tröpfchen Tween 20 mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Nach dieser Behandlung wurden die Blüten insgesamt dreimal für eine, zwei und schließlich fünf min. in autoklaviertem Wasser gewaschen und bis zur Präparation im letzten Waschwasser belassen.

Zur Präparation der Fruchtknoten wurden unter sterilen Bedingungen an der Werkbank unter einem Zeiss-Stereomikroskop Stemi-DV4 alle Bestandteile der Blüten außer den Fruchtknoten abgetrennt. Danach wurden die Fruchtknoten mit einem Längsschnitt durch die Mitte aufgeschnitten. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Samenanlagen mit den Plazenta entnommen und auf das in zwei unterschiedliche Petrischalen befindliche „embryo rescue“-

Medium gelegt. Die einzelnen herausgelösten Samenanlagen wurden mit der Spitze eines Skalpell auf das Medium gebracht.

Die Samenanlagen von jedem Fruchtknoten wurden auf zwei Petrischalen mit Medien mit jeweils verschiedenem Saccharosegehalt gelegt und mit Parafilm verschlossen. So wurden insgesamt 120 Petrischalen verwendet. Die Kultur erfolgte bei 24 °C im Dunkeln.

### **2.2.12.2 Versuch zu „embryo rescue“**

Eine, zwei und drei Wochen nach der Kreuzung (s. 2.2.13) wurden hintereinander jeweils ca. 20 % der Kapseln von jeder Variante aus dem Gewächshaus entnommen und wie im vorherigen Kapitel (2.2.12.1) beschrieben oberflächensterilisiert und auf dem „embryo rescue“-Medium kultiviert. Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt.

### **2.2.13 Kreuzungen**

Bei dem ersten Versuch wurden die Blüten von acht Genotypen aus der Untergattung *Streptocarpella* (S1, S3, S4, S5, S8, S12, S14 und S25, s. Tabelle 2.2.2) wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben im Gewächshaus kastriert und jeweils mit den Pollen von vier *Saintpaulia*-Genotypen (U03, U09, U13 und U14) bestäubt, wobei jede Kreuzung bis zu 400 mal durchgeführt wurde. Nach einer Woche wurden ca. 20 % der Blüten für „embryo rescue“-Versuche (s. 2.2.12.2) verwendet und diese Versuche in den folgenden drei Wochen wiederholt (ca. 25 %, 33 % und 50 % der verbleibenden Fruchtblätter). Anschließend wurden von jeder Variante die verbliebenen Blüten bis zur Reife an den Pflanzen gelassen. Die Kreuzungsvarianten aus der zweiten Wiederholung werden in der Tabelle 2.5 dargestellt.

Beim zweiten Versuch wurden elf *Streptocarpella*-Arten (S1, S2, S3, S4, S5, S8, S12, S14, S25, S26 und S28) in beide Richtungen miteinander gekreuzt. Die Anzahl der Kreuzungen wurde in Abhängigkeit von den vorhandenen Blüten variiert.

Danach wurden die Kapseln kurz vor der Reife mit Hilfe einer Papiertüte und einer Klammer isoliert, damit die Samen nicht verloren gingen. Anschließend wurden die Kapseln abgeerntet und in Styroporkisten mit Einheitserde „P“ im Gewächshaus ausgesät. Die Kisten wurden unter Folie bei einer Tages- und Nachttemperatur von 26 °C (Bodentemperatur 25 °C) und hoher Luftfeuchtigkeit von 98 %-100 % und 16 Stunden Licht bis zur Keimung gehalten. Nach drei bis vier Wochen, als die Sämlinge keimten, wurde die Folie abgedeckt. Zwei Monate nach der Aussaat wurden die Sämlinge in R+S-Kisten mit Einheitserde „P“ pikiert und für zwei Monate bei einer Tages- und Nachttemperatur von 25 °C belassen (Abb. 2.9). Anschließend wurden die Pflanzen in 10cm-Töpfe mit Einheitserde eingetopft und bei 22 °C Tag / Nacht Temperatur und 16 Stunden Licht kultiviert.

Dabei wurden während der Kultur für die Beleuchtung Assimilationslampen mit 5 Klux / m<sup>2</sup> / sec. verwendet. Die Pflanzen wurden bei Unterschreitung von 15 Klux Sonnenstrahlung beleuchtet und bei Überschreitung von 25 Klux schattiert. Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt.

#### **2.2.14 Versuch zum Bestäuben in vitro**

Im Gewächshaus wurden Blüten von fünf *Streptocarpus*-Arten (S1, S3, S8, S12 und S25) und vier *Saintpaulia*-Genotypen (U03, U09, U13 und U14) wie im Kapitel 2.2.9 beschrieben kastriert und isoliert. Nach fünf bis sechs Tagen, sobald die Narbe bereit war, wurden Fruchtblätter aus kastrierten und einigen geöffneten Blüten von ähnlichen Genotypen aus dem Gewächshaus entnommen und im Labor präpariert.

Zur Präparation wurden im ersten Schritt zunächst die Blüten wie im Kapitel 2.2.11 beschrieben oberflächensterilisiert. Danach wurden sie an der Werkbank unter sterilen Bedingungen mit einem Zeiss-Stereomikroskop-Stemi-DV4 präpariert, ihre Pollensäcke entnommen und die Pollenkörner in 0,5 ml flüssigem Pollenkeimungsmedium (mit auf 7 % reduzierten Saccharosegehalt) (VAN TUYL ET AL. 1991) suspendiert. Mit einer Pipette wurden die Pollen auf das Pollenkeimungsmedium in Petrischalen als parallele Linien in einer Breite von ca. 0,5 cm und einer Länge von 3 cm gegossen (CHI 2000). Im zweiten Schritt wurden die Fruchtblätter wie die Blüten oberflächensterilisiert und wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben präpariert. Danach wurden der Samenanlagen von jedem Genotyp auf die Pollen von entsprechenden Kreuzungspartnern gelegt.

In diesem Versuch wurden alle fünf *Streptocarpus*-Arten mit vier *Saintpaulia*-Genotypen jeweils acht Mal in beide Richtungen bestäubt. Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt.

#### **2.2.15 Identifizierung der Hybriden**

Zur Identifizierung der Hybriden wurden die Pflanzen neben der visuellen Beobachtung auch anhand von molekularen Markern getestet.

##### **2.2.15.1 RAPD Primer**

Die Versuche wurden mit Decamer-Primern (Tab. 2.3) vom Kit A (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) für RAPD-PCR durchgeführt.

**Tabelle 2.3:** Sequenzen der verwendeten Zufalls-Primer (A) für die RAPD-PCR (Kit A der Fa. Carl Roth)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Primer	Sequenz (5' → 3')
A02	TGCCGAGCTG	A13	CAGCACCCAC
A04	AATCGGGCTG	A15	TTCCGAACCC
A08	GTGACGTAGG	A20	GTTGCGATCC
A09	GGGTAACGCC		

### 2.2.15.2 DNA-Extraktion nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997)

1. 50 mg der jungen Blätter von den Hybriden wurden aus dem Gewächshaus entnommen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt.
2. In jedes Gefäß wurden 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS; pH 7,5, autoklaviert) zugegeben und im Vortex homogenisiert (max. 30 sec).
3. In jede Probe wurden 20 µl RNase (10 mg / ml) zugegeben und sofort für 5 sec. im Vortex homogenisiert und der Deckelinnenrand durch Schwenken gereinigt.
4. Die Gefäße wurden für 15 min. bei 65 °C im Wasserbad inkubiert und dabei gelegentlich geschwenkt (ca. alle 4 min.).
5. In jedes Gefäß wurden 200 µl eiskaltes Kaliumacetat (5 M) zugegeben. Die Gefäße wurden leicht geschwenkt, um die Gewebepellets aufzulösen.
6. Die Proben wurden für 10 min. auf Eis inkubiert.
7. Die Proben wurden für 20 min. bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert.
8. Von jeder Probe wurden sehr vorsichtig 500 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
9. In jedes Gefäß wurde 500 µl eiskaltes Isopropanol zugegeben und so gemischt, dass die beiden Phasen vollständig durchmischt waren.
10. Als die DNA-Fäden sichtbar wurden (nach max. 10 min.) wurden die Proben für 10 min. bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert.
11. Danach wurden die Überstände abgegossen und das weiß-graue Pellet (DNA) mit 1 ml 70 %igem, eiskaltem EtOH gewaschen (max. 2-5 min.).
12. Die Gefäße wurden für 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert.
13. Anschließend wurde der Alkohol vorsichtig abgegossen. Danach wurden die Gefäße über Kopf auf ein Papiertuch gestellt und die Pellets für eine halbe Stunde getrocknet.
14. Die DNA wurde für eine Stunde in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend bei -20° C gelagert.

Die Isolierung der DNA aus dem Pflanzenmaterial mit dem Qiagen DNeasy Plant Kit erfolgte schrittweise nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurden jeweils 100 mg junge Blätter in flüssigem Stickstoff gründlich gemörsert und gefroren weiter verwendet. Die Eluierung der DNA aus den Säulen erfolgte im Kit in zwei Schritten durch Zugabe von jeweils 100 µl Puffer.

### 2.2.15.3 Bestimmung von Menge und Qualität der DNA

Die isolierte DNA sollte in Bezug auf ihre Qualität und ihre Konzentration (Quantifizierung) untersucht werden. Wichtige Qualitätskriterien sind die Intaktheit (durchschnittliche Länge) und die Reinheit der RNA, die durch Gelelektrophorese bestimmt werden können. Die Konzentration der isolierten DNA wird in der Regel durch Agarosegelelektrophorese zusammen mit Standards bekannter Konzentrationen bestimmt.

Für die Herstellung des Agarosegels wurden in einem Erlenmeyerkolben 400 mg Biozym LE Agarose (Nr. 840004) eingewogen und mit 50 ml TAE-Puffer (Tab. 9.15) aufgefüllt. Die Suspension wurde für 80 Sekunden in der Mikrowelle bis zum Sieden (vollständige Lösung der Agarosepartikel) erhitzt und anschließend unter fließendem Wasser abgekühlt. Danach wurden 1,5 µl Ethidiumbromidstammlösung (100 mg / ml) zugegeben und gut gemischt. Anschließend wurde die Lösung in den zuvor vorbereiteten Gelträger gegossen und ein Kamm darin eingesteckt.

Von jeder DNA-Probe wurden 15 µl mit 3 µl Ladepuffer (Tab. 9.16) gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 70 V für eine Stunde. Danach wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator (UV-B Tube 8W Nr. 29 84 40) fotografiert.

### 2.2.15.4 PCR-Bedingungen

Die Reaktionsgefäße wurden in die PCR-Maschine (T3 Thermocycler Biometra) gestellt, und das in Tabelle 2.4 aufgeführte Programm wurde für die RAPD-Markernerstellung verwendet.

**Tabelle 2.4:** Die PCR-Bedingungen zur Amplifikation von RAPD-Markern

Temperatur (°C)	Zeit (min.)	Zyklenzahl
94	5	1
92	1	40
35	1	
72	2	
72	10	1

### 2.2.15.5 Anwendung von RAPD-Markern

Durch einige Versuche wurden *Saintpaulia*- und *Streptocarpus*-Genotypen und F1-Pflanzen mit passenden „Primern“ (s. Kap. 2.2.15.1) mittels RAPD-PCR verglichen.

Wegen der hohen DNA-Konzentrationen einiger Genotypen, die zu Ungenauigkeiten beim Pipettieren führen könnten, wurden alle DNA-Proben mit AE-Puffer (Qiagen DNeasy Plant Kit) oder destilliertem autoklaviertem Wasser auf 4 ng /  $\mu$ l verdünnt.

Für weitere Versuchsvorbereitungen wurden in einem 2 ml-Reaktionsgefäß für jede Probe 2,5  $\mu$ l Williams (10 x  $\mu$ l), 2  $\mu$ l dNTPs (1 mMol /  $\mu$ l), 2  $\mu$ l Primer (5 mMol /  $\mu$ l), 4  $\mu$ l Taq (0,25 U /  $\mu$ l) nach Bedarf zusammen gemischt und als Mastermix vorbereitet. Danach wurden je 10,5  $\mu$ l dieses Mastermixes, 9,5  $\mu$ l dest. autoklaviertes Wasser und anschließend jeweils 5  $\mu$ l DNA (4ng /  $\mu$ l) in zuvor beschriftete, autoklavierte 0,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und nach kurzem Zentrifugieren in die PCR-Maschine gestellt. Gleichzeitig wurden in einem Erlenmeyerkolben 1,5 g Biozym LE Agarose (Nr. 840004) eingewogen und mit TAE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde für 1,5 min. in der Mikrowelle bis zum Sieden (vollständige Lösung der Agarosepartikel) erhitzt und anschließend unter fließendem Wasser abgekühlt. Danach wurden 4  $\mu$ l Ethidiumbromidstammlösung (100 mg / ml) zugegeben und gut gemischt. Anschließend wurde die Lösung in den zuvor vorbereiteten Gelträger gegossen und zwei Kämme darin eingesteckt.

Nach Beendigung der PCR wurden die Reaktionsprodukte auf dem Agarosegel aufgetrennt und fotografiert.

### **2.2.16 Statistische Auswertungen**

Die Korrelation stellt einen quantitativen Zusammenhang zwischen zwei oder mehreren zufälligen Variablen dar. Der Zusammenhang zwischen den Daten der Bewertung der Pollenvitalität (s. 2.2.8) und der Pollenkeimung in vitro (s. 2.2.9) wurde durch den Korrelationskoeffizienten (nach Pearson) und die Regressionsanalyse berechnet.

Die Einschätzung der Pollenvitalität mit Hilfe von FDA und MTT wurde bei allen Genotypen anhand einer zweifaktoriellen Anlage analysiert und verglichen, wobei die Chemikalien als erster Faktor in zwei Stufen (MTT und FDA) und die Arten als zweiter Faktor angenommen wurden. Danach wurde ein Globaltest durchgeführt und anschließend die Varianten mit Hilfe eines Tukey-Tests verglichen. Die gleiche Analyse wurde in Bezug zur Pollenvitalität und Pollenkeimung bei Knospen und geöffneten Blüten durchgeführt.

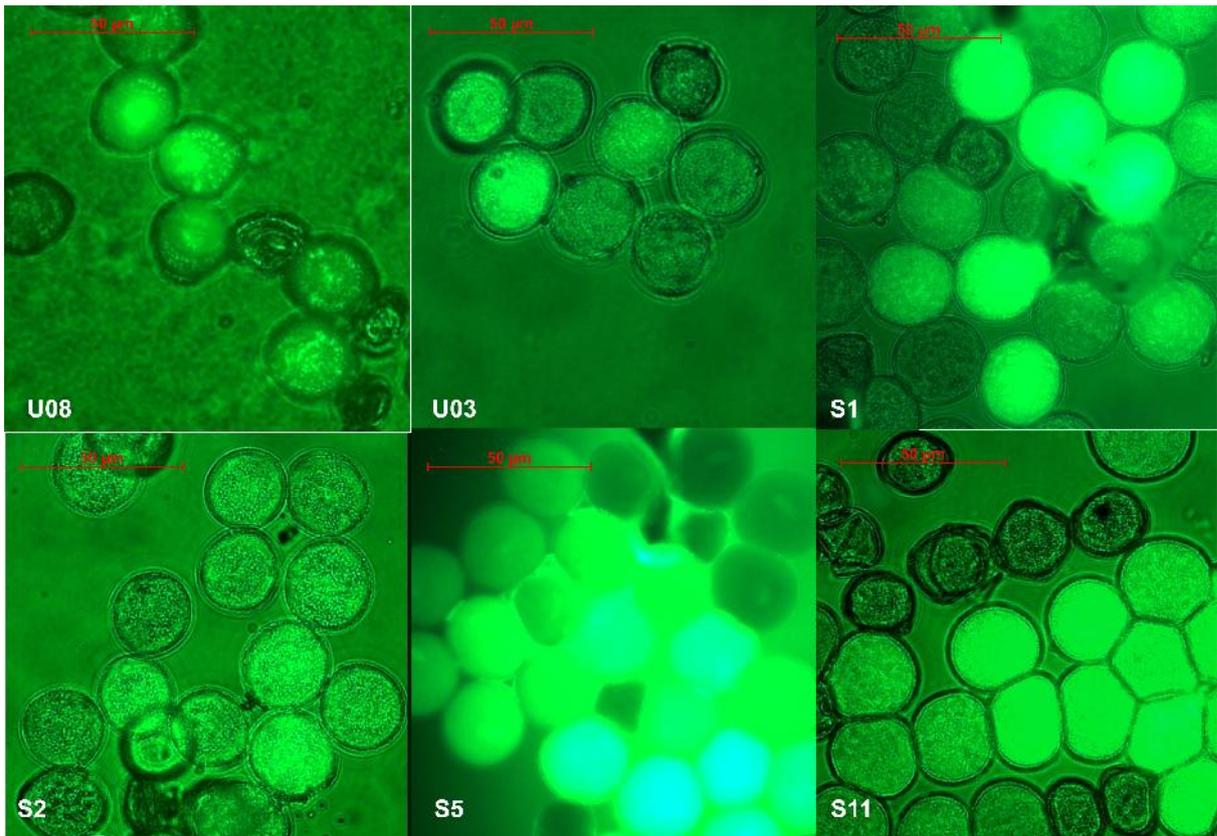
Die Unterschiede der Pollenkeimung in vitro bei unterschiedlicher Lagerzeit wurden jeweils im Rahmen einer zweifaktoriellen Anlage analysiert und verglichen, wobei die Lagerungszeit als erster Faktor in vier Stufen und die Genotypen als zweiter Faktor vorgegeben waren. Danach wurde ein Globaltest durchgeführt und anschließend wurden die Varianten mit Hilfe eines „many to one“-Tests (Dunnet) verglichen.

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Untersuchungen zur Pollenvitalität

Um die Lebensfähigkeit der Pollen schnell einzuschätzen, wurden sie mit FDA und MTT gefärbt.

Nach Anfärbung mit FDA wurden die schwach und stark fluoreszierenden Pollen als vital und die nicht fluoreszierenden als nicht vital betrachtet (Abb. 2.4).



**Abbildung 2.4:** Anfärbung von Pollen einiger *Saintpaulia*-Genotypen und *Streptocarpus*-Arten mit FDA

Weiterhin wurde die Pollenvitalität mit MTT-Färbung bestimmt. Die lebensfähigen Pollen wurden durch MTT dunkelrot gefärbt. Die nicht gefärbten Pollen wurden als nicht vital gewertet. Abbildung 2.5 zeigt die gefärbten Pollen von einigen Genotypen nach MTT-Behandlung. Eine zweifaktorielle Analyse zum Vergleich der Behandlungen, in der die Chemikalien als erster und die Genotypen als zweiter Faktor angenommen wurden, zeigte signifikante Unterschiede (P-Wert: 0,0007) zwischen FDA und MTT bei der Einschätzung der Pollenvitalität. Abbildung 2.6 stellt die Einschätzung der Pollenvitalität durch MTT und FDA bei verschiedenen Genotypen dar. Aus der Achsenskalierung in Abbildung 2.6 ist

deutlich zu erkennen, dass insgesamt eindeutig mehr Pollen durch FDA als vital eingeschätzt wurden als durch MTT. Jedoch war diese Abweichung für die einzelnen Genotypen unterschiedlich groß.

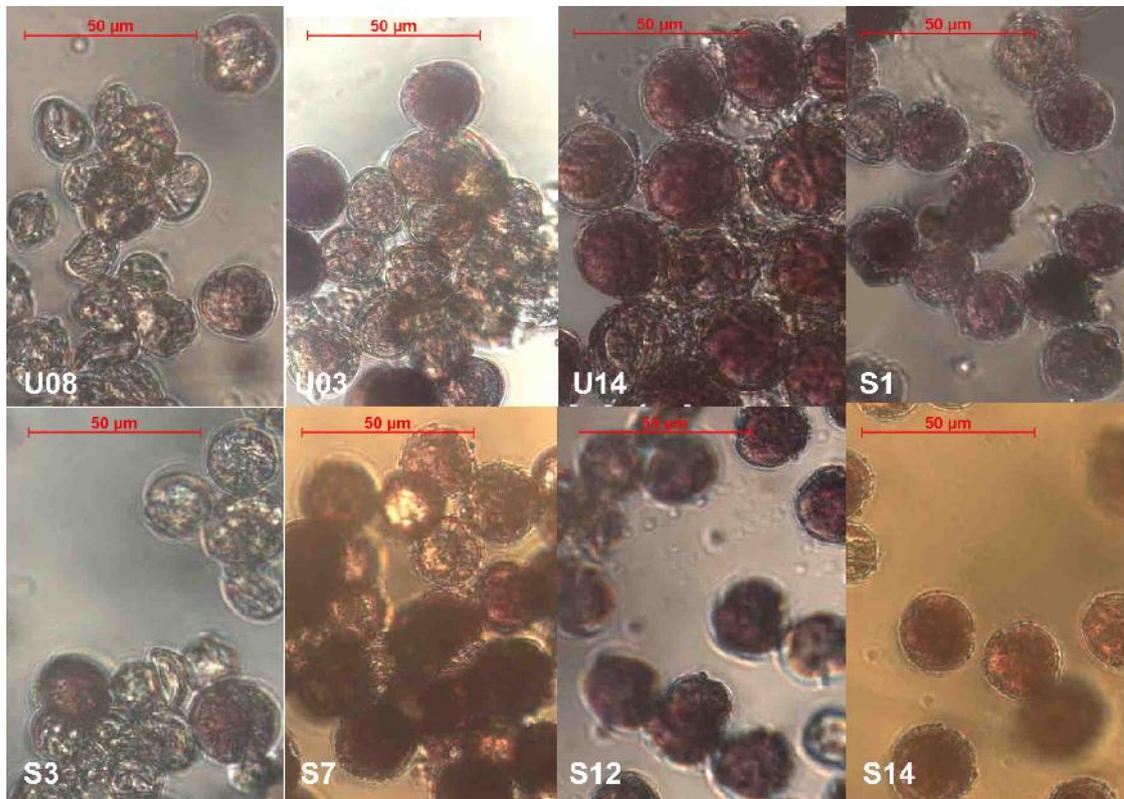


Abbildung 2.5: Anfärbung von Pollen von *Saintpaulia*-Genotypen und *Streptocarpus*-Arten mit MTT

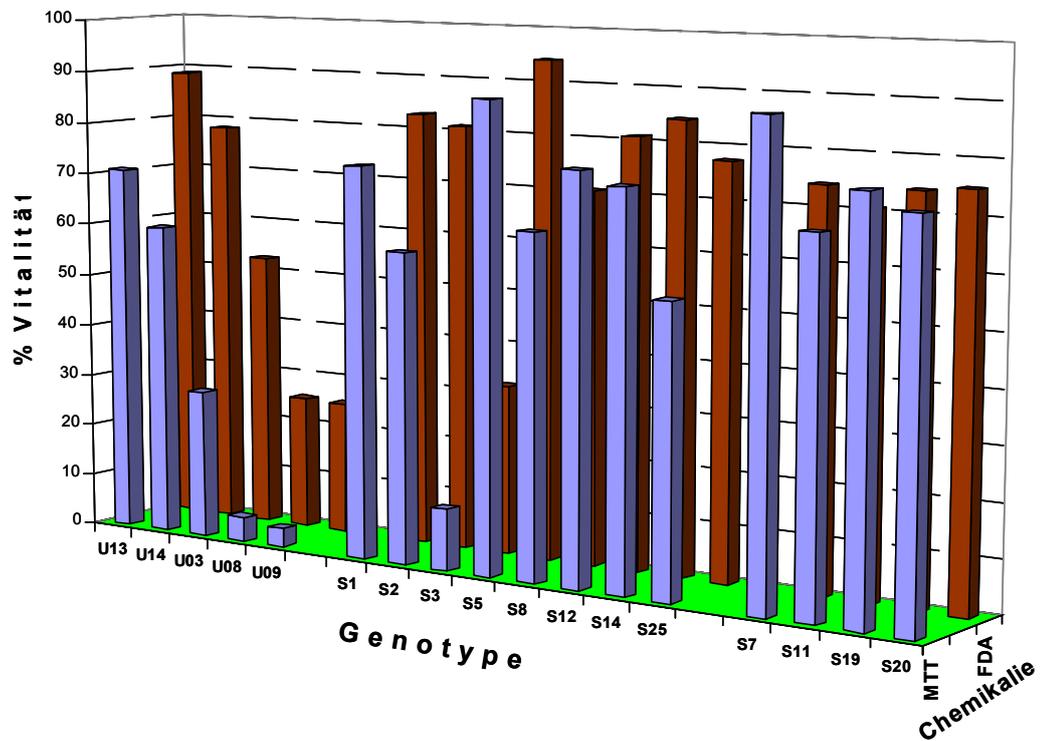
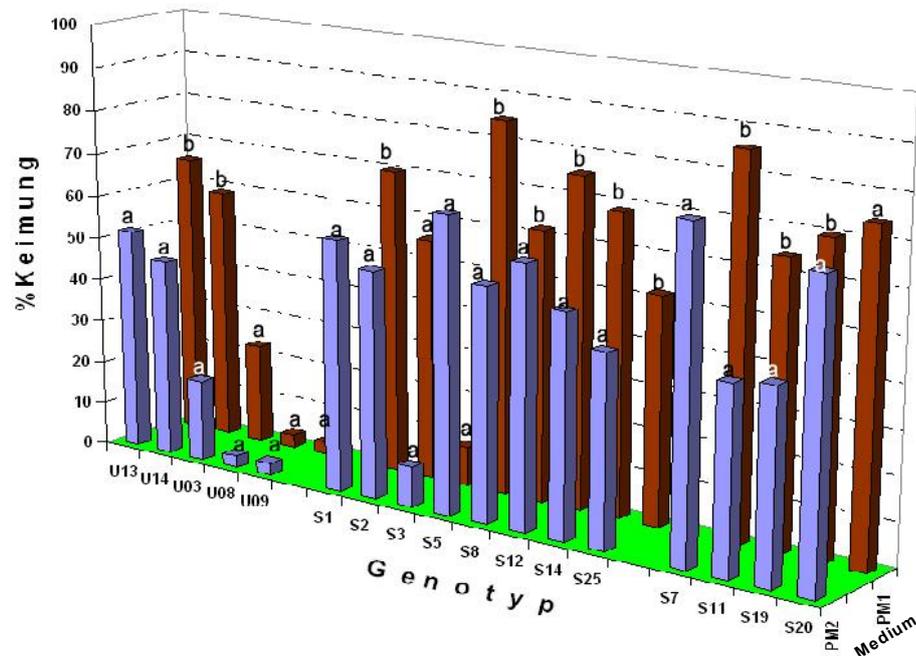


Abbildung 2.6: Einschätzung der Pollenvitalität durch FDA und MTT bei verschiedenen Genotypen von *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia*-Sorten

### 2.3.2 Pollenkeimung in vitro

Während der Versuche wurde beobachtet, dass manche getrocknete Pollenkörner einiger Arten der Untergattung *Streptocarpus* (S11, S19 und S20) nach einem Tag Lagerung im Kühlschrank ohne Medium keimten. Bei den anderen untersuchten Genotypen war für die Pollenkeimung in vitro die Kultur der Pollenkörner auf dem Pollenkeimungsmedium notwendig. Die prozentuale Pollenkeimung von fünf *Saintpaulia*-Genotypen und 12 *Streptocarpus*-Arten wurde auf zwei Pollenkeimungsmedien PM1 und PM2 untersucht. Bei der statistischen Auswertung wurden zunächst die Homogenität der Varianzen und vorhandene Gaußverteilungen bei den beiden Wiederholungen mittels der Boxen betrachtet (s. Abb. 9.4). Die Varianzen waren homogen und die Daten gaußverteilt. Die Boxen zeigten auch eine höhere prozentuale Pollenkeimung auf dem Medium PM1. Der Globaltest stellte mit einem p-Wert von  $0,0001 < \alpha$  (s. Tab. 9.1) signifikante Unterschiede bei der Pollenkeimung auf verschiedenen Medien dar.

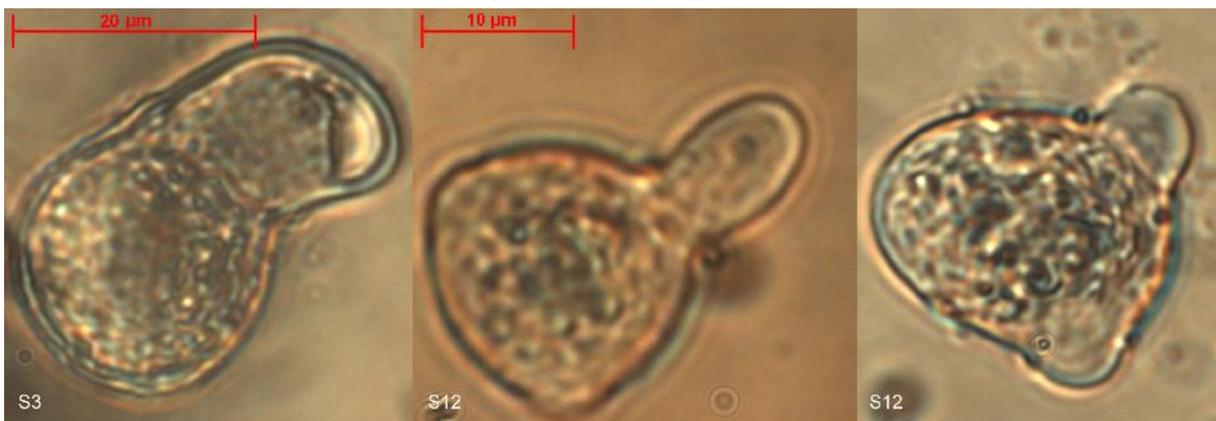
Weil die Wechselwirkung zwischen Medien und Genotypen signifikant war (p-Wert:  $0,0001 < \alpha$ ) (s. Tab. 9.1), wurden die Daten nach Arten sortiert und analysiert. Anschließend wurden verschiedene Varianten mit einem t-Test miteinander verglichen (s. Tab. 9.2-a). Nach diesen Ergebnissen wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Pollenkeimung von U03, U08, U09, S2, S3, S20 auf den beiden Medien festgestellt, aber bei den anderen Genotypen waren die Unterschiede signifikant (Abb. 2.7).



**Abbildung 2.7:** Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von fünf *Saintpaulia*-Genotypen und 12 *Streptocarpus*-Arten auf zwei Medien PM1 und PM2. Verglichen wurde jeweils die Keimung für einen Genotyp auf zwei Medien. Werte mit gleichen Buchstaben unterschieden sich nicht signifikant nach t-Test bei  $P = 0,05$

Insgesamt wurde deutlich, dass die Pollenkeimung auf dem Medium PM1 bei 12 Genotypen höher war. Daher wurden weitere Untersuchungen mit dem Medium PM1 vorgenommen.

In vitro keimten die Pollenkörner von manchen Genotypen wie S5, S12 und S25 nach 15 min. Die erste Keimung wurde bei S8 nach einer Stunde, bei S11 nach 2 Stunden und bei den *Saintpaulia*-Genotypen nach mehreren Stunden beobachtet. Jedes Pollenkorn hatte drei Pole, auf dem Medium keimte es normalerweise aus einem Pol. Selten wurde die Keimung aus zwei Polen beobachtet (Abb. 2.8, S12 rechts).



**Abbildung 2.8:** Pollenkeimung von S3 (links) und S12 (Mitte) aus einem Pol und von S12 aus zwei Polen (rechts) nach drei Stunden Kultur auf dem Medium PM1

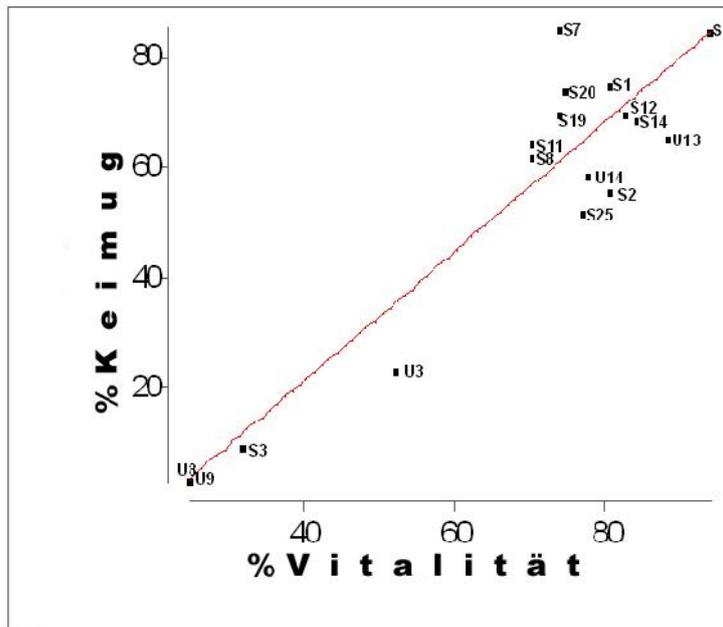
Bei einzelnen Genotypen keimten nicht alle Pollenkörner gleichzeitig. Deshalb wurden alle Proben nach 20 Stunden bonitiert (Abb. 2.9).



**Abbildung 2.9:** In-vitro-Pollenkeimung von verschiedenen Genotypen nach 12 Stunden Kultur auf dem Medium PM1

Um den Zusammenhang zwischen der Einschätzung der Pollenvitalität durch FDA und der Pollenkeimung in vitro aussagekräftig darstellen zu können, wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson mit einem P-Wert von 0,0001 betrug 0,92708. Daher ergab die Korrelationsanalyse eine signifikante Korrelation, also einen Zusammenhang, zwischen der Vitalität, die mit FDA ermittelt wurde, und der

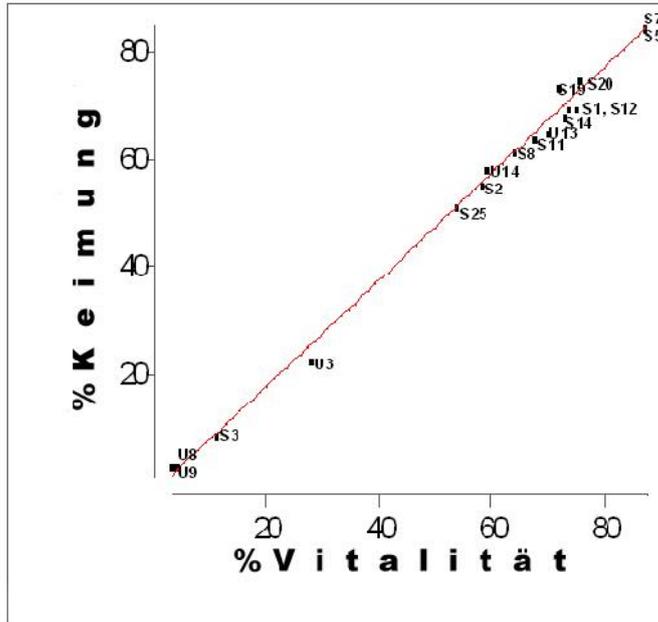
Pollenkeimung in vitro. Die Analyse der Daten anhand von „Proc Reg“ wurde als Grafik in Abb. 2.10 dargestellt. Die lineare Regressionsanalyse zeigte, dass das Bestimmtheitsmaß 0,86 betrug. Die Schätzungen für die Intercept-Parameter und die Steigung betragen -26,7861 bzw. 1,1810. Beide Parameter dieser Gleichung waren zum 5 %-Niveau signifikant von Null verschieden, die P-Werte betragen jeweils 0,0001 (s. Abb. 9.7). Somit ergab sich die folgende Regressionsgleichung: Keimung = -26,7861 + 1,1810 \* Vitalität.



**Abbildung 2.10:** Regressionslinie zwischen der Pollenvitalität, ermittelt mit FDA-Färbung, und der Pollenkeimung in vitro bei 12 *Streptocarpus*-Arten und fünf *Saintpaulia*-Genotypen

Weiterhin wurde das gleiche Verfahren für die Bestimmung des Zusammenhangs zwischen der durch MTT-Färbung eingeschätzten Pollenvitalität und der Pollenkeimung in vitro durchgeführt. Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte eine starke Korrelation zwischen der Einschätzung der Pollenvitalität mit MTT und der In-vitro-Pollenkeimung bei den genannten Genotypen (s. 2.2.8). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson mit einem P-Wert von 0,0001 betrug 0,99748. Somit stellte die Regressionsanalyse einen deutlichen und signifikanten Zusammenhang zwischen der mit MTT eingeschätzten Pollenvitalität und der Pollenkeimung in vitro dar.

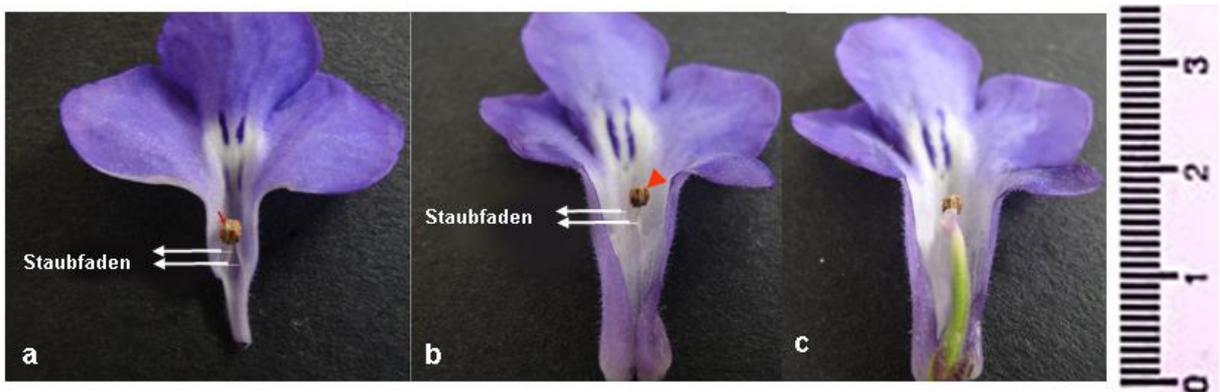
Die Regressionslinie (Abb. 2.11) und das Bestimmtheitsmaß von 0,99 stellten eine starke Regression zwischen der Einschätzung der Vitalität durch MTT und der Pollenkeimung in vitro bei verschiedenen *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen dar. Die Schätzungen für die Intercept-Parameter und die Steigung betragen -2,1711 bzw. 0,9870. Beide Parameter dieser Gleichung waren zum 5 %-Niveau signifikant von Null verschieden, die P-Werte betragen jeweils 0,0001 (s. Abb. 9.8). Somit ergab sich die folgende Regressionsgleichung: Keimung = -2,1711 + 0,9870 \* Vitalität.



**Abbildung 2.11:** Regressionslinie zwischen der Pollenvitalität, ermittelt mit MTT-Färbung, und der Pollenkeimung in vitro bei 12 *Streptocarpus*-Arten und fünf *Saintpaulia*-Genotypen

**2.3.3 Untersuchung zur Reifezeit der Pollen**

Die morphologische Beobachtung zeigte, dass die zwei Staubbeutel von *Streptocarpus* mit einem kurzen Filament so auf dem Blütenblatt verwachsen waren, dass sie sich bei der Öffnung der Blüten durch diese mechanische Wirkung trennten und die Pollen entlassen wurden. Deshalb wurde die Bestäubung durch die Blütenöffnung gefördert (Abb. 2.12).

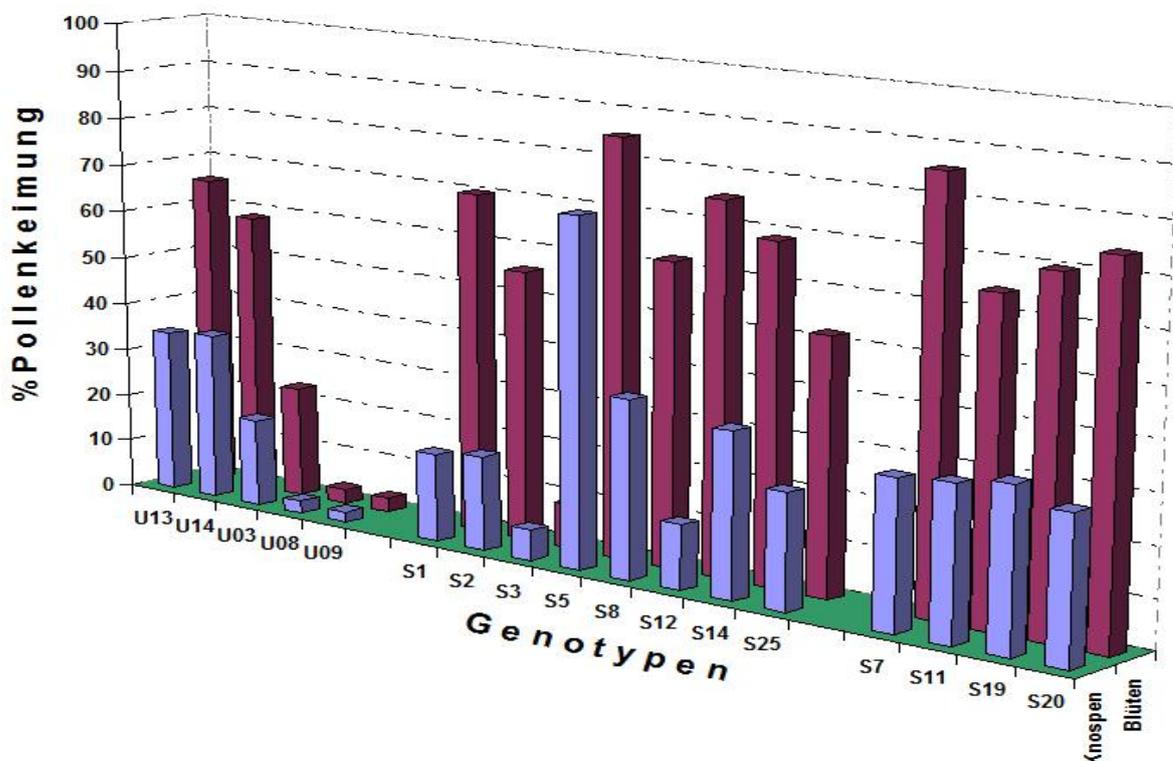


**Abbildung 2.12:** Die Blütenöffnung von *Streptocarpus* (S1) führte zur Bestäubung: Durch die Öffnung der Blüte wurden die Staubfäden voneinander weggezogen (a). Die Staubbeutel wurden durch diesen Vorgang voneinander abgetrennt (b). Durch das Entlassen der Pollenkörner wurde die Narbe bestäubt (c).

Um den richtigen Zeitpunkt für die Pollenernte festzustellen, wurde die Keimung von Pollen aus geöffneten Blüten mit der aus geschlossenen Knospen bei verschiedenen Genotypen verglichen. Bei der statistischen Auswertung wurden zunächst die Homogenität der Varianzen und vorhandene Gaußverteilungen bei den beiden Wiederholungen mittels „Boxplots“ betrachtet (Abb. 9.5). Die Varianzen waren homogen und die Daten gaußverteilt. Die Boxen zeigten auch, dass, obwohl die Pollen von Knospen weniger keimten als die Pollen aus geöffneten Blüten, der Prozentsatz gekeimter Pollen bei geschlossenen Blüten mit einem Mittelwert von 25,7 % so hoch war, dass diese Pollen zu ungewünschter Befruchtung der Fruchtknoten führen könnten.

Die statistischen Auswertungen der Anteile gekeimter Pollen (s. 2.2.6) wurden im Rahmen einer zweifaktoriellen Anlage durchgeführt. Eine globale Analyse stellte mit einem p-Wert von  $0,0001 < \alpha$  signifikante Unterschiede bei der Pollenkeimung je nach Entwicklungsstand der Blüten dar.

Folgende Grafik stellt die Unterschiede der prozentualen Pollenkeimung zwischen Knospen und geöffneten Blüten bei einigen *Saintpaulia*-Genotypen und *Streptocarpus*-Arten ausführlich dar (Abb. 2.13).



**Abbildung 2.13:** Vergleich der In-vitro-Pollenkeimung von verschiedenen *Saintpaulia*-Genotypen und *Streptocarpus*-Arten aus Blüten in zwei Entwicklungsstadien. Bei allen Genotypen außer U08 wurden signifikante Unterschiede bei der Pollenkeimung in vitro zwischen Knospen und Blüten nachgewiesen.

Weitere Analysen (t-Test) zeigten signifikante Unterschiede bei den Pollenkeimungen zwischen Blüten und Knospen bei allen Genotypen außer U08 (Tab. 9.2-b). Trotz signifikanter Unterschiede war bei einigen Genotypen wie S5 (Mittelwert = 71,4 %), U13 (Mittelwert = 34 %) und U14 (Mittelwert = 34,9 %) die Keimung von Pollen aus Knospen sehr hoch

Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Staubbeutel der beiden Gattungen vor den Fruchtblättern reiften, die Pollen also entlassen wurden, bevor die Narbe ausgereift war. Diese Eigenschaft wird allgemein „Protandrie“ genannt.

Im Vergleich zu Staubblättern entwickelten sich die Fruchtblätter von *Streptocarpus* zögernder (Abb. 2.14). Das Fruchtblatt war vor der Blütenöffnung kurz und die Narbe widerstandsfähig. Nach der Blütenöffnung wuchs das Fruchtblatt bis unter den Staubbeutel (Abb. 2.1 c). Obwohl die Narbe zu diesem Zeitpunkt für die Pollenaufnahme nicht ausgereift war, wurden die Pollenkörner durch das Ausreißen der Staubbeutel auf die Narbe entlassen. Nach einigen Stunden wurde die Narbe durch Ausscheidungen weich, verdickt, klebrig und empfängnisbereit.



**Abbildung 2.14:** Fruchtblattentwicklung bei *Streptocarpus saxorum* x *Streptocarpus stomandrus*; vor der Blütenöffnung war das Fruchtblatt kurz und nicht reif (a). Nach der Blütenöffnung war die Narbe nicht ganz bereit (b), aber nach einigen Stunden wurde sie weich, verdickt, klebrig und empfängnisbereit (c)

Weil für eine erfolgreiche, gezielte Kreuzung eine rechtzeitige Kastration erforderlich war, mussten die Blüten in sehr frühen Stadien wie c oder d (Abb.2.15) kastriert werden.



**Abbildung 2.15:** Verschiedene Stadien der Blütenentwicklung bei *Streptocarpus saxorum* x *Streptocarpus stomandrus*

### 2.3.4 Untersuchungen zur Lagerung von Pollen

Die Keimfähigkeit von im Kühlschrank und im Gefrierschrank gelagerten Pollen wurde mit der von frischen Pollen verglichen. Bei der statistischen Auswertung wurden zunächst die Homogenität der Varianzen und vorhandene Gaußverteilungen bei den beiden Wiederholungen mittels Boxplot betrachtet (Abb. 9.6). Die Varianzen waren homogen und die Daten gaußverteilt. Die Boxen zeigten allgemein, dass eine zweiwöchige Lagerung im Kühlschrank die Pollenkeimung stärker beeinträchtigte als eine dreimonatige Lagerung im Gefrierschrank, wobei die Keimung auch im Gefrierschrank bei längerer Lagerung beeinträchtigt wurde.

Die statistischen Auswertungen der Anzahl der gekeimten Pollen (s. 2.2.6) wurden im Rahmen einer zweifaktoriellen Anlage durchgeführt. Eine globale Analyse stellte mit einem p-Wert von  $0,0001 < \alpha$  signifikante Unterschiede bei der Pollenkeimung der verschiedenen Genotypen dar.

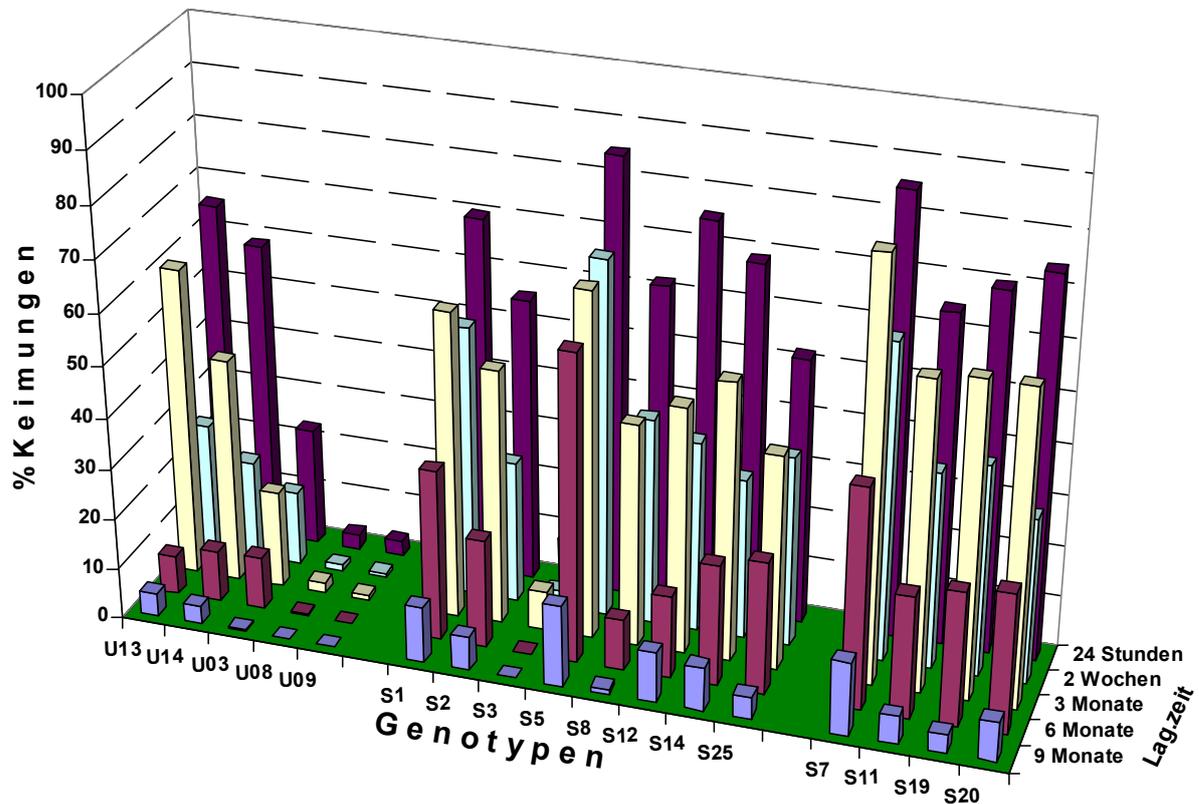
Weil die Wechselwirkung zwischen Genotypen und Lagerzeit signifikant war (p-Wert von  $0,0001 < \alpha$ ), wurden die Daten nach den Genotypen sortiert und global analysiert. Anschließend wurden verschiedene Varianten mit einem „Many to one test“ (Dunnett) mit frischen Pollen verglichen.

Dabei zeigten alle Genotypen signifikante Unterschiede bei der Keimfähigkeit zwischen den frischen Pollen und den Pollen, die für zwei Wochen im Kühlschrank gelagert worden waren. Die Keimfähigkeit der Pollen wurde nach drei Monaten Lagerung im Gefrierschrank nicht stark reduziert. Zwar wurden bei den Genotypen S1, S19, S12, S14, S20, S25, S5, S8, U9 und U14 signifikante Unterschiede festgestellt, aber die Unterschiede bei den Genotypen S11, S2, S3, S7, U03, U08 und U13 waren nicht signifikant.

Bei Lagerung nach sechs Monaten im Gefrierschrank wurde die Keimfähigkeit der Pollen bei allen Genotypen signifikant reduziert. Nach neun Monaten nahmen die Schäden z.T. weiter zu, bei einigen Genotypen (S3, U08, U09, Tab. 9.3, 9.4) war die Keimfähigkeit jedoch schon

nach sechs Monaten soweit reduziert, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen der Lagerung nach sechs und neun Monaten festgestellt wurden.

Die folgende dreidimensionale Grafik (Abb. 2.16) stellt einen ausführlichen Vergleich des Einflusses der Lagerzeit der Pollen auf die Pollenkeimung bei verschiedenen Genotypen dar:



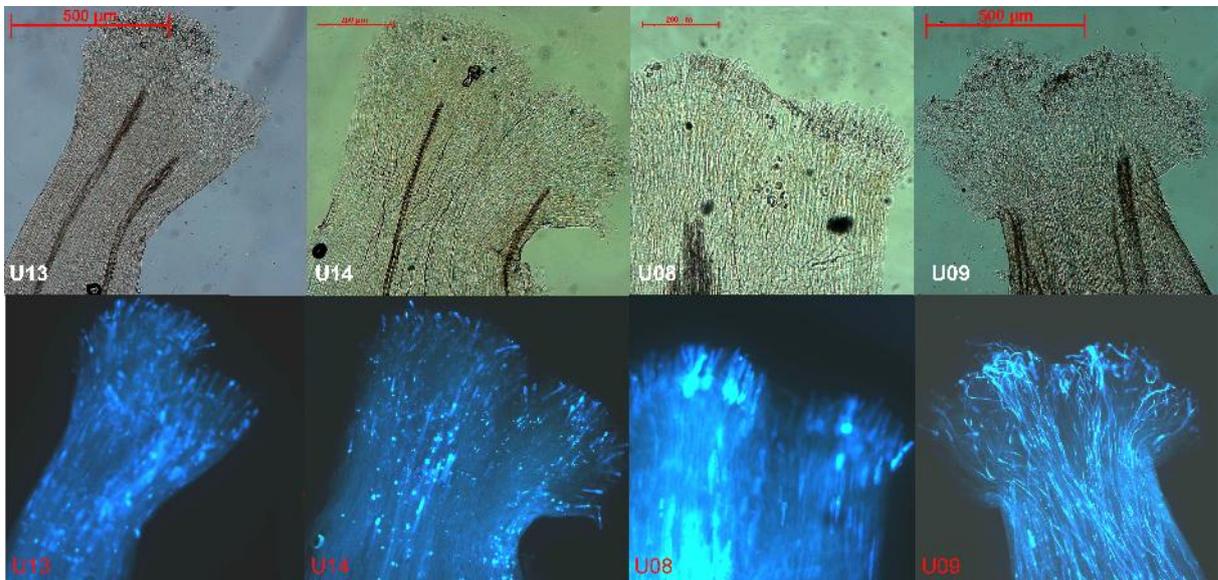
**Abbildung 2.16:** Pollenkeimung in Abhängigkeit von Lagerzeit und -temperatur bei verschiedenen Genotypen von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus* (24 Stunden bei Raumtemperatur, 2 Wochen im Kühlschrank bei +4 °C, drei, sechs und neun Monate im Gefrierschrank bei -20 °C)

### 2.3.5 Pollenkeimung in vivo

Die Pollenkeimung in vivo wurde bei allen Genotypen (Tabellen 2.2.1 und 2.2.2) untersucht. Dabei wurden alle *Streptocarpus*-Arten mit den *Saintpaulia*-Genotypen in beide Richtungen und die *Streptocarpus*-Arten miteinander in beide Richtungen gekreuzt. Danach wurden die Fruchtknoten mit Griffel und Narbenpartien aus den Blüten entnommen und die Pollenschlauchbildung bei allen Kombinationen überprüft (s. 2.2.11).

Die Untersuchungen zeigten, dass die Pollenkörner von allen untersuchten Genotypen (*Saintpaulia*-Genotypen und *Streptocarpus*-Arten) auf den Narben von *Saintpaulia* U13, U08 und U14 nicht keimen konnten. Bei U03 war die Pollenkeimung auf der Narbe schwierig, weil von zehn Proben aus den beiden Wiederholungen nur bei zwei Varianten (U03 x S7 und U03 x S11) Pollenkeimung beobachtet wurde, und auf diesen Narben auch nur zwei bzw. vier

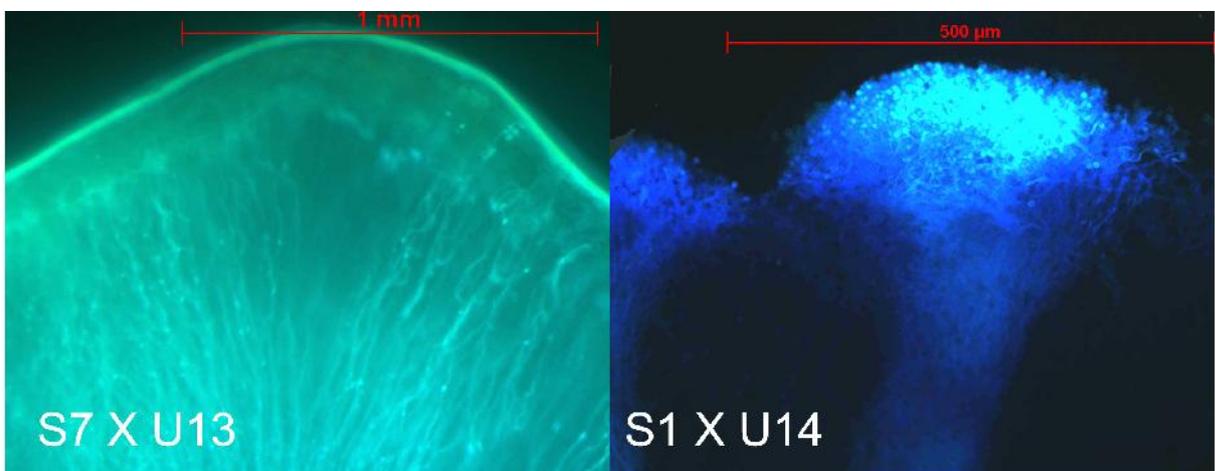
Pollenkörner keimten. Die Pollenkörner von allen untersuchten Genotypen konnten auf der Narbe von U09 gut keimen (Abb. 2.17).



**Abbildung 2.17:** Untersuchung von Pollenkeimung und Pollenschlauchbildung (Selbstung) mit Anilinblau bei vier *Saintpaulia*-Genotypen: Oben: die Narben mit Pollenkörnern unter dem Lichtmikroskop, unten unter Fluoreszenzlicht. Nur bei U09 keimten die Pollen auf der Narbe und bildeten Pollenschläuche

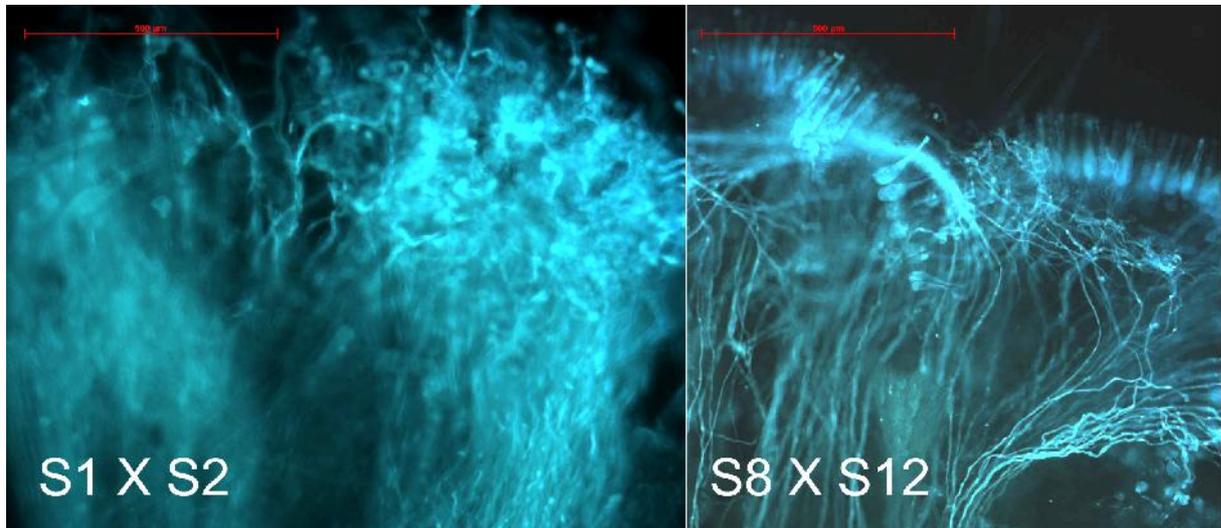
Bei den *Saintpaulia*-Genotypen, auf deren Narben keine Pollen keimten, konnten auch durch Verletzung der Narbe oder Abschneiden der Narbe („cut style“) oder des Griffels keine positiven Wirkungen erzielt werden.

Die Pollen von *Saintpaulia*-Genotypen konnten auf den Narben von *Streptocarpus*-Arten keimen (Abb. 2.18).



**Abbildung 2.18:** Keimung und Pollenschlauchwachstum von Pollenkörnern der Gattung *Saintpaulia* auf den Narben der Gattung *Streptocarpus* (Färbungen mit Anilinblau)

Auch die Pollen von *Streptocarpus*-Arten (beide Untergattungen) konnten auf den Narben der jeweils anderen *Streptocarpus*-Arten keimen und Pollenschläuche bilden (Abb. 2.19). Nur bei S12 war für die Fremdbestäubung (U13, U14, U9, S1, S2, S5, S25) eine Verletzung der Narbe erforderlich.



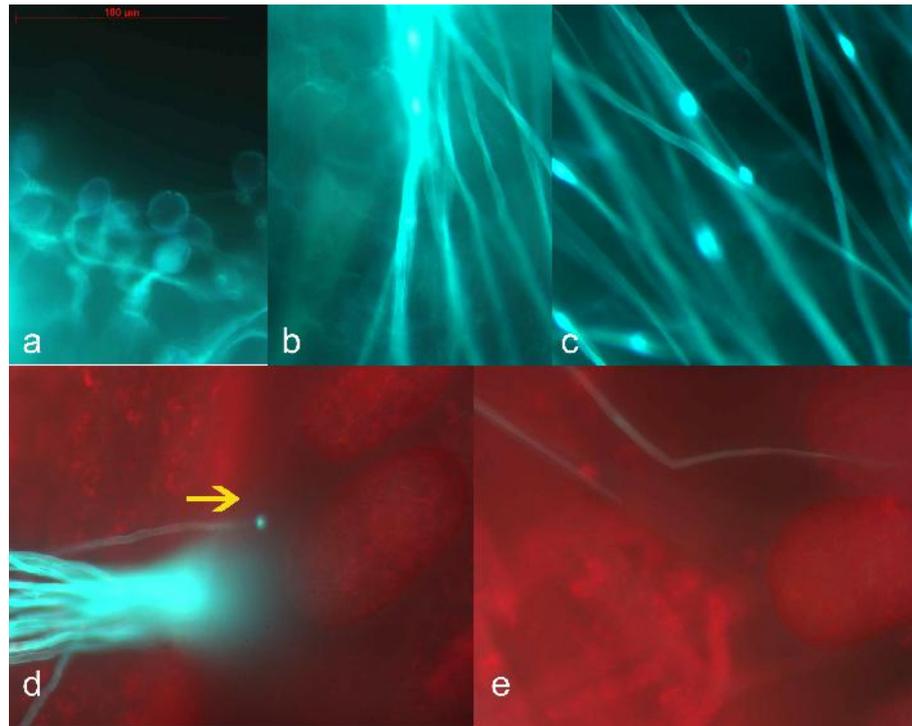
**Abbildung 2.19:** Pollenkörner von *Streptocarpus*-Arten keimten auf den Narben von anderen Arten der Gattung *Streptocarpus* und bildeten Pollenschläuche

Die Pollenschläuche mit ihren pfeilförmigen Spitzen durchdrangen die Griffel, während sie sich in zwei oder vier Gruppen vereinigten und parallel zum Griffel wuchsen, ohne sich zu überkreuzen (Abb. 2.18, 2.19, 2.22). Die Abmessungen zeigten, dass die Pollenschläuche zehn Stunden nach den Kreuzungen ca. 80 µm in den Griffel wuchsen.

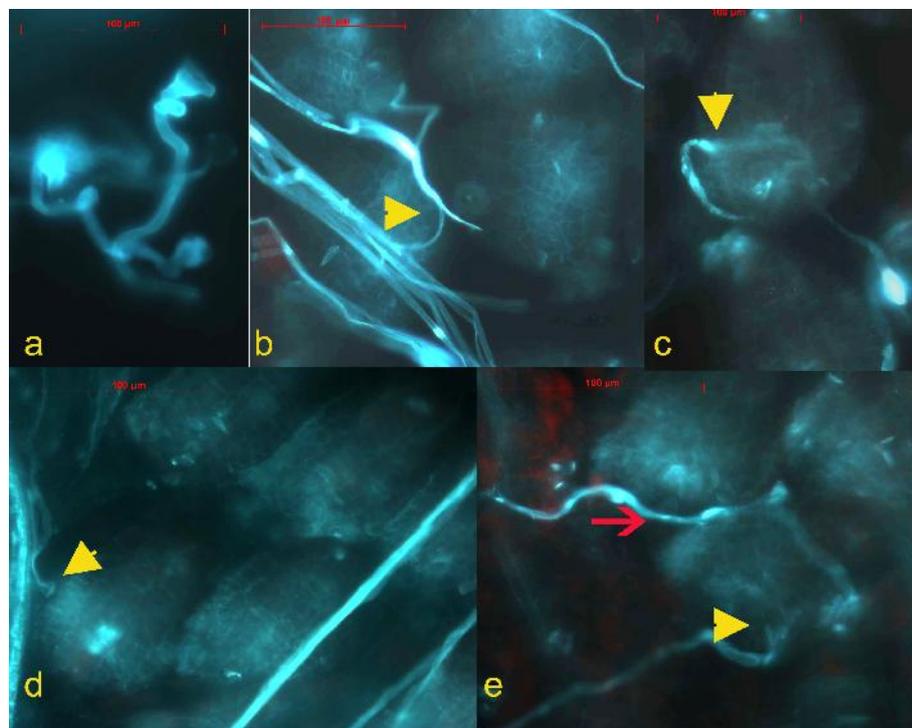
Sobald die Pollenschläuche die Fruchtknoten erreichten (Abb. 2.20 b), trennten sie sich voneinander (Abb. 2. 20 c), und einzelne Pollenschläuche wuchsen zur Befruchtung zu einer Samenanlage.

Die Pollenschläuche der *Saintpaulia*-Genotypen erreichten zwar die Samenanlagen in den Fruchtknoten von *Streptocarpus* (Abb. 2.20 d), aber nach dem Kontakt mit den Samenanlagen konnte kein Eindringen in die Samenanlagen beobachtet werden (Abb. 2.20 e).

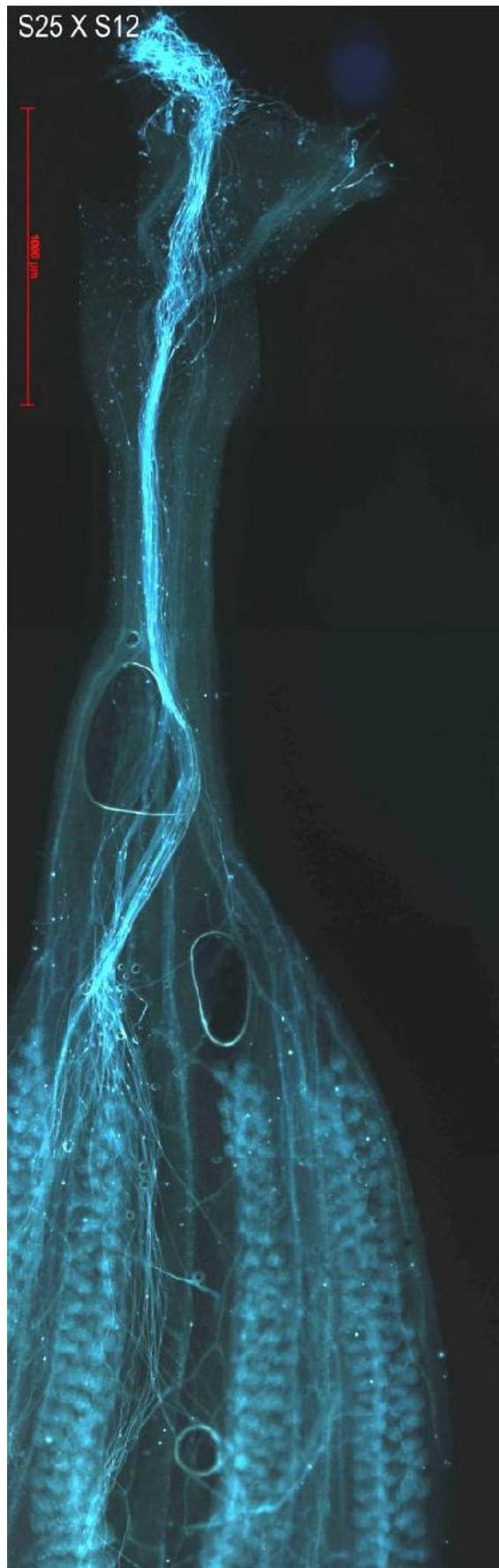
Die Pollenkeimung von den Narben bis zum Erreichen der Fruchtknoten war bei allen *Streptocarpus*-Arten ähnlich. Bei einigen Artkreuzungen innerhalb von *Streptocarpella*-Arten konnte jedoch eine Befruchtung beobachtet werden. Abbildung 2.21 stellt die Befruchtung von Samenanlagen von S25 (*Streptocarpus caulescens* v. *pallens*) durch die Pollenschläuche von S12 (*Streptocarpus glandulosissimus*) dar.



**Abbildung 2.20:** Pollenschläuche von U13 im Fruchtknoten von S1: Die Pollen von *Saintpaulia ionantha* keimten auf den Narben von *Streptocarpus saxorum* (a). Nach der Trennung (b und c) erreichten die Pollenschläuche (Pfeil) die Samenanlagen (d), aber eine Befruchtung wurde nicht nachgewiesen (e).



**Abbildung 2.21:** Befruchtung bei S25 x S12: Die Pollen von S12 keimten auf den Narben von S25 (a), ein Pollenschlauch richtet sich auf eine Samenanlage aus (b), ein Pollenschlauch dringt in eine Samenanlage ein (c), eine Samenanlage nach der Befruchtung (d), ein Pollenschlauch (roter Pfeil) richtet sich nach Kontakt mit einer befruchteten Samenanlage (gelber Pfeil) auf eine andere Samenanlage aus (e)



**Abbildung 2.22:** Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum bei Bestäubungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella* (S25 x S12)

### 2.3.6 Kreuzungen

Bei Kreuzungen in großer Zahl wurden zwei Versuche mit jeweils zwei Wiederholungen durchgeführt. Weil die Pollen von *Streptocarpus* auf den *Saintpaulia*-Narben schwierig keimten (s. 2.3.6), wurde beim ersten Versuch die Kreuzung zwischen *Streptocarpella* und *Saintpaulia* nur in einer Richtung durchgeführt. Beim zweiten Versuch wurden die Arten aus der Untergattung *Streptocarpella* miteinander gekreuzt.

Beim ersten Durchlauf der beiden Versuche (*Streptocarpella* x *Saintpaulia* und die Kreuzungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella*) wurden die Pflanzen im Gewächshaus von einem nicht bekannten Bakterium befallen.

Die Untersuchungen zur Identifizierung des Bakteriums für eine mögliche Behandlung der Pflanzen waren erfolglos. Obwohl der Extrakt der Pflanzen auf bekannten Medien für Bakterien keine Koloniebildung zeigte, äußerten sich Symptome einer Bakterienerkrankung auf den Kapseln. Zehn Tage nach der Bestäubung wurden die Samenanlagen braun, und die kultivierten Samenanlagen bildeten auf dem „embryo rescue“-Medium Bakterienkolonien. Offensichtlich konnten diese Bakterien nur bei Vorhandensein von Pflanzengewebe leben.

Für die Wiederholung wurden gesunde Pflanzen aus der In-vitro-Kultur in das Gewächshaus gebracht. Für die Auswertung wurden ausschließlich die Daten aus der zweiten Wiederholung verwendet, da der erste Durchlauf aufgrund der Krankheit der Pflanzen keine verwertbaren Ergebnisse lieferte.

#### 2.3.6.1 Kreuzungen zwischen *Streptocarpella*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen

Tabelle 2.5 stellt die Ergebnisse der Kreuzungen zwischen *Streptocarpella*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen aus der zweiten Wiederholung dar. Weil bei manchen Varianten nicht genügend Blüten vorhanden waren, wurde dort die Anzahl der Kreuzungen reduziert.

Nach der Bestäubung fielen die meisten Fruchtblätter in den ersten drei Tagen herunter. Teile der Fruchtblätter wurden für „embryo rescue“-Versuche verwendet (grauer Teil der Tabelle). Wie in Tabelle 2.5 zu sehen ist, wurden nur von zwei Varianten Samen geerntet. Die Samen wurden im Gewächshaus kultiviert, aber eine Keimung wurde nicht beobachtet. Die anderen geernteten Kapseln waren kleiner und besaßen keine Samen.

**Tabelle 2.5:** „embryo rescue“-Versuche zu Kreuzungen zwischen *Streptocarpella*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen

♀		♂	Anzahl von Kreuzungen	Entnahme nach einer Woche	Entnahme nach zwei Wochen	Entnahme nach drei Wochen	Entnahme nach vier Wochen	Verbleibende Kapseln nach vier Wochen	Geerntete Kapseln	Geerntete Kapseln mit Samen
S1	X	U03	400	50	45	33	25	25	12	
S1	X	U09	310	48	27	22	17	17	5	
S1	X	U13	362	67	35	27	32	32	29	2
S1	X	U14	170	20	17	16	15	15	9	
S3	X	U03	400	50	30	25	15	15	2	
S3	X	U09	400	40	20	15	15	15	2	
S3	X	U13	400	45	15	15	8	8	0	
S3	X	U14	400	45	25	20	12	12	8	
S4	X	U03	30	2	2	2	3	3	0	
S4	X	U09	30	2	2	2	5	5	2	
S4	X	U13	30	2	2	2	7	7	3	
S4	X	U14	30	2	2	2	5	5	3	
S5	X	U03	400	45	30	20	12	12	5	
S5	X	U09	400	50	35	25	20	20	12	
S5	X	U13	400	55	34	30	30	30	14	
S5	X	U14	400	50	35	30	27	27	12	
S8	X	U03	400	45	35	20	15	15	4	
S8	X	U09	400	45	40	35	33	33	14	
S8	X	U13	400	54	43	40	29	29	19	3
S8	X	U14	400	50	40	40	30	30	17	
S12	X	U03	50	5	5	5	9	9	2	
S12	X	U09	35	5	5	5	8	8	0	
S12	X	U13	50	5	5	5	5	6	3	
S12	X	U14	50	5	5	5	2	2	2	
S14	X	U03	15	2	2	0	0	0	0	
S14	X	U09	15	2	2	1	0	5	0	
S14	X	U13	15	2	2	1	1	3	0	
S14	X	U14	76	5	5	5	10	11	0	
S25	X	U03	400	35	25	20	17	17	5	
S25	X	U09	400	35	20	20	19	19	4	
S25	X	U13	400	40	30	25	21	21	8	
S25	X	U14	400	35	20	20	20	20	7	

### 2.3.6.2 Kreuzungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella*

Die Auflistung sämtlicher Kreuzungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella* wäre zu umfangreich und für die weiteren Auswertungen ohne Bedeutung, daher beschränkt sich die folgende Tabelle (2.6) auf die Kreuzungen, die zur Kapselbildung führten. Eine ausführliche Tabelle (Tab. 9.5) folgt im Anhang.

Wegen der ungenügenden Anzahl vorhandener Blüten wurden die Kreuzungen in unterschiedlicher Anzahl (zwischen fünf und 30) durchgeführt.

**Tabelle 2.6:** Kreuzungen zwischen *Streptocarpella*-Arten mit Kapselbildung, Samenentwicklung und Samenbildung

♀		♂	Anzahl der Kreuzungen	Geerntete Kapseln	Samen in Kapseln	gekeimt
S1	X	S2	30	7	vorhanden	+
S1	X	S3	10	3	keine	
S1	X	S4	30	5	keine	
S1	X	S8	30	4	vorhanden	+
S1	X	S12	30	7	keine	
S1	X	S14	20	4	vorhanden	+
S1	X	S25	30	4	vorhanden	+
S3	X	S2	20	6	vorhanden	+
S3	X	S4	20	2	keine	
S3	X	S8	30	7	keine	
S3	X	S12	30	6	keine	
S3	X	S25	30	12	keine	
S3	X	S26	20	3	keine	
S4	X	S8	10	6	keine	
S5	X	S1	30	1	keine	
S8	X	S2	30	8	keine	
S8	X	S5	30	6	keine	
S8	X	S12	30	18	vorhanden	+
S8	X	S25	30	12	vorhanden	+
S14	X	S1	5	2	vorhanden	-
S14	X	S12	5	2	vorhanden	-
S14	X	S26	5	1	vorhanden	+
S25	X	S1	30	5	keine	
S25	X	S2	30	2	keine	
S25	X	S5	30	10	vorhanden	+
S25	X	S8	30	6	vorhanden	+
S25	X	S12	30	22	vorhanden	+
S25	X	S14	30	5	vorhanden	-

- nicht gekeimt
- + gekeimt, aber Hybridstatus nicht nachgewiesen
- + Hybriden

Nach der Aussaat wurden die Kisten bis zur Keimung der Samen wie in Kapitel 2.2.13 beschrieben im Gewächshaus aufgestellt (Abb. 2.23).



**Abbildung 2.23:** Die Sämlinge in Styroporkisten vor dem Pikieren (links), die F1-Pflanzen nach dem Pikieren in Pikierkisten im Gewächshaus (rechts)

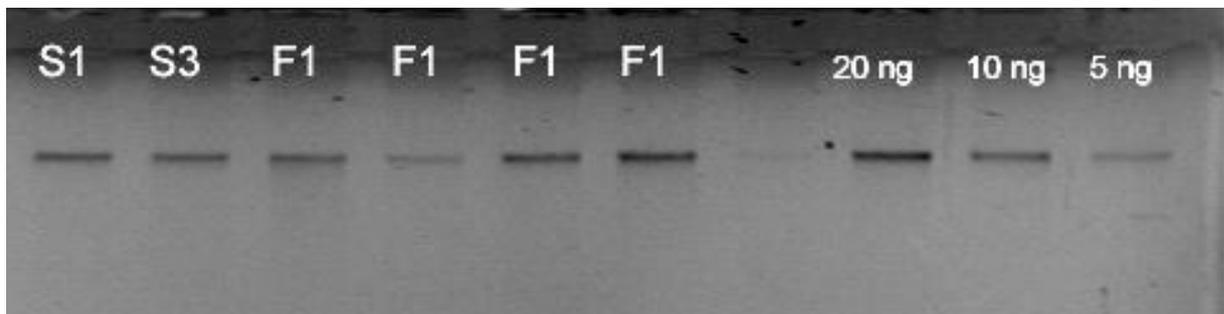
In der F1 traten bei einigen Pflanzen viele interessante Ergebnisse auf. Manche stellten eine Mischung von verschiedenen Eigenschaften der beiden Elternteile, jedoch mit unterschiedlicher Intensität, dar.

Bei einigen Hybriden (S1 x S2, S3 x S2, S26 x S14) wurden die F1-Pflanzen anhand der molekularen Marker untersucht und der Erfolg der Kreuzungen festgestellt.

DNA-Isolierungen wurden aus der In-vitro-Kultur von Kreuzungspartnern und F1-Pflanzen durch die Anwendung von „Qiagen-Kits“ sowie nach der „Dorokhov-Methode“ (DOROKHOV UND KLOCKE 1997) durchgeführt und Qualität und Quantität der DNA-Extraktionen durch Gelelektrophorese untersucht. Mit „Qiagen-Kits“ wurden aus Blättern und Kallussen 8 ng DNA / g FM gewonnen. Bei Anwendung der Dorokhov-Methode wurden aus Blättern 15 ng DNA / g FM und aus Kallussen 5 ng DNA / g FM gewonnen.

Die Gele zeigten, dass alle Proben genomische DNA enthielten, die weitgehend intakt war (kein Schmier). Der RNase-Verdau hatte offensichtlich funktioniert, und die DNA-Moleküle waren nicht geschert, da nirgendwo ribosomale bzw. kleine Banden auftraten. Die gleichmäßige Laufstrecke der Proben stellte die relative Reinheit der DNA-Proben in Bezug auf Verunreinigung mit Kohlenhydraten dar.

Als Beispiel wird in Abbildung 2.24 die Auftrennung der nach der Dorokhov-Methode isolierten DNA der Proben S1, S3 und vierer Hybriden dargestellt:



**Abbildung 2.24:** Bestimmung der Konzentrationen der durch die Dorokhov-Methode extrahierten DNA

Die Beschreibung sämtlicher Hybriden benötigt weitere und nähere Untersuchungen und wäre sehr umfangreich. Deshalb werden hier in einem kurzen Bericht die Hybriden, die sicher als solche identifiziert wurden, und deren Eigenschaften dargestellt.

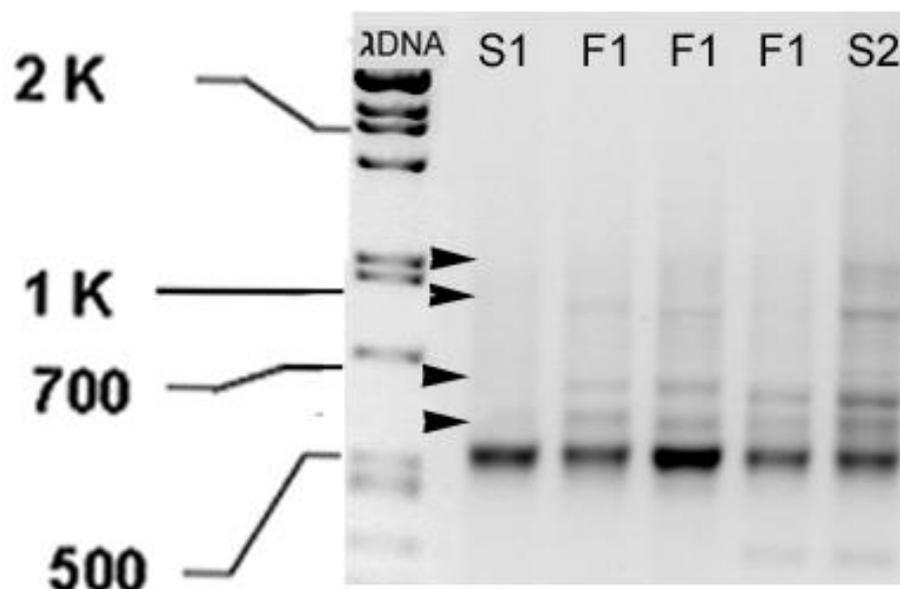
**S1 x S2:** S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*) wies gestreckte Sprossachsen mit mittlerer Internodienlänge auf. Die Blätter waren bis zu 4 cm lang, schwach gezähnt und besaßen eine dunkle Blattoberfläche. S1 bildete relativ viele violette Blüten, die zwischen 2 und 3 cm lang waren.

S2 (*S. saxorum*) stellte durch ihre gestreckten, hängenden Sprossachsen mit kurzen Internodien eine kompakte Pflanze dar. Sie blühte sehr wenig und zeigte ihre hellvioletten Blüten sehr selten. Die Blätter waren bis zu 3 cm lang, schwach gezähnt und graugrün. Die Hybriden aus S1 x S2 ergaben viele Blüten, kurze Internodien und einen kompakten Wuchstyp. Manche hatten hängende Sprossachsen, und die Blätter stellten ein Spektrum zwischen den beiden Arten dar. Einige präsentieren schmale, ovale Blätter, die bei den Eltern nicht zu sehen waren. Die Blütenfarbe war bei einigen hellviolett, bei anderen dunkelviolet (Abb. 2.25).



**Abbildung 2.25:** Zwei Hybriden aus S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*) und S2 (*S. saxorum*)

Mit RAPD-Markern gelang der Hybridnachweis mit Primer A02 (Abb. 2.26), der bei S1 und S2 jeweils spezifische Banden lieferte.



**Abbildung 2.26:** Vergleich der RAPD-Marker von Hybriden (F1) aus S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*) und S2 (*S. saxorum*) anhand der Amplifikation des Primers A02

Die Ähnlichkeit zwischen den zwei *Streptocarpus*-Arten wurde anhand der Banden bei 500 und 550 bp deutlich, die nächste Bande jedoch (ca. 600 bp) wurde bei S2 und den Proben aus den F1-Pflanzen kräftiger ausgeprägt. Unterschiede wurden besonders bei zwei Banden (ca.1000 und 1200 bp) erkennbar, die nur bei S2 und den Kreuzungsprodukten auffällig wurden. Weil bei unseren Versuchen S2 als Pollenelter verwendet wurde, bestätigten diese Bandenmuster bei den F1-Pflanzen die erfolgreiche Kreuzung zwischen S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*) und S2 (*S. saxorum*).

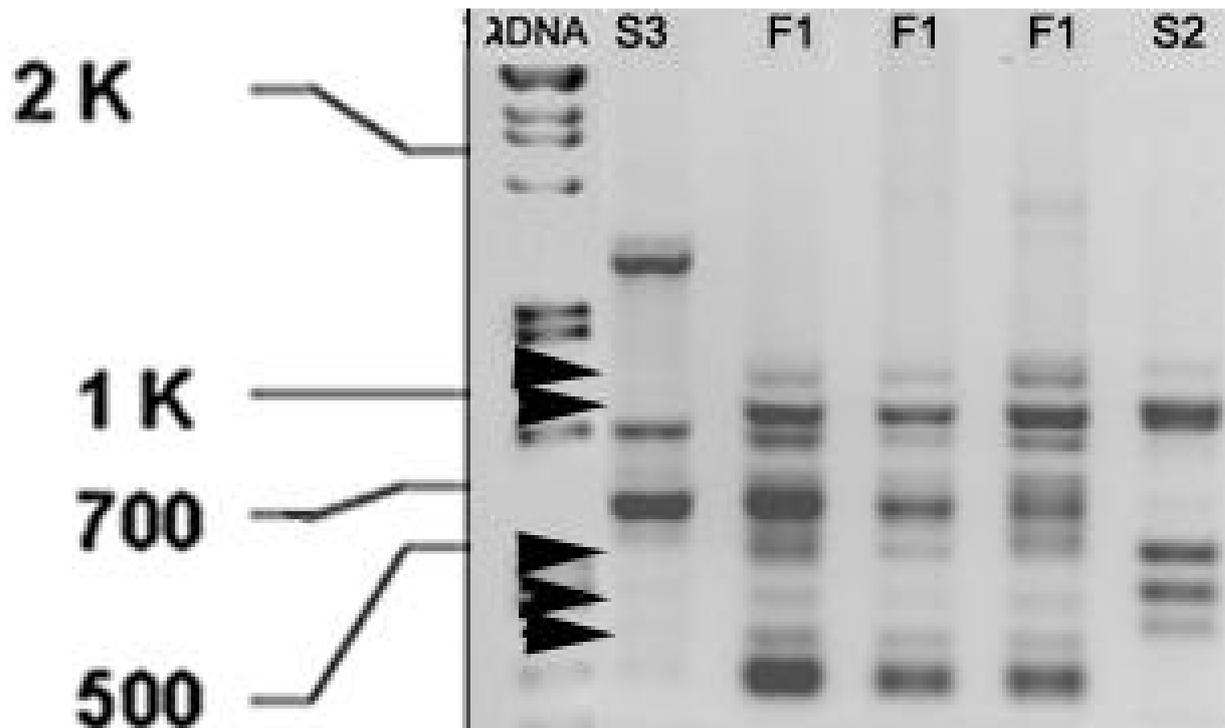
Bei den F1-Pflanzen aus S3 x S2 wurden ähnliche Phänomene wie bei S1 x S2 beobachtet. Im Gegensatz zu S3 (*S. caulescens*) zeigten die Hybriden kurze Internodien, manchmal graugrüne Blätter und einen kompakten Wuchstyp; Eigenschaften, die typisch für S2 waren. Die Hybriden bildeten wie S3 zahlreiche Blüten.

Folgende Abbildung (Abb. 2.27) stellt zwei ausgesuchte Hybriden aus dieser Kreuzung dar:



**Abbildung 2.27:** Zwei Hybriden aus S3 (*S. caulescens*) und S2 (*S. saxorum*)

Die Überprüfung der Kreuzungsprodukte zwischen S3 (*S. caulescens*) und S2 (*S. saxorum*) erfolgte durch den Primer A08 (Abb. 2.28). Der Primer bildete bei 900 bp, 480 bp und 450 bp starke und bei 1100 bp schwache Banden von S2, die von S3 nicht geliefert wurden. Bei S3 bildete der Primer zwei starke Banden bei ca. 800 bp und 700 bp. Alle diese Banden wurden bei den Kreuzungsprodukten amplifiziert und bestätigen die erfolgreiche Kreuzung zwischen S3 und S2. Es wurde eine starke Bande bei ca. 1400 bp von S3 und eine schwache Bande bei ca. 400 bp von S2 durch den Primer ausgeprägt, die sich bei den Hybriden nicht zeigte. Eine starke Bande bei ca. 300 bp, die sich bei den Hybriden zeigte, wurde von keinem Kreuzungspartner geliefert.



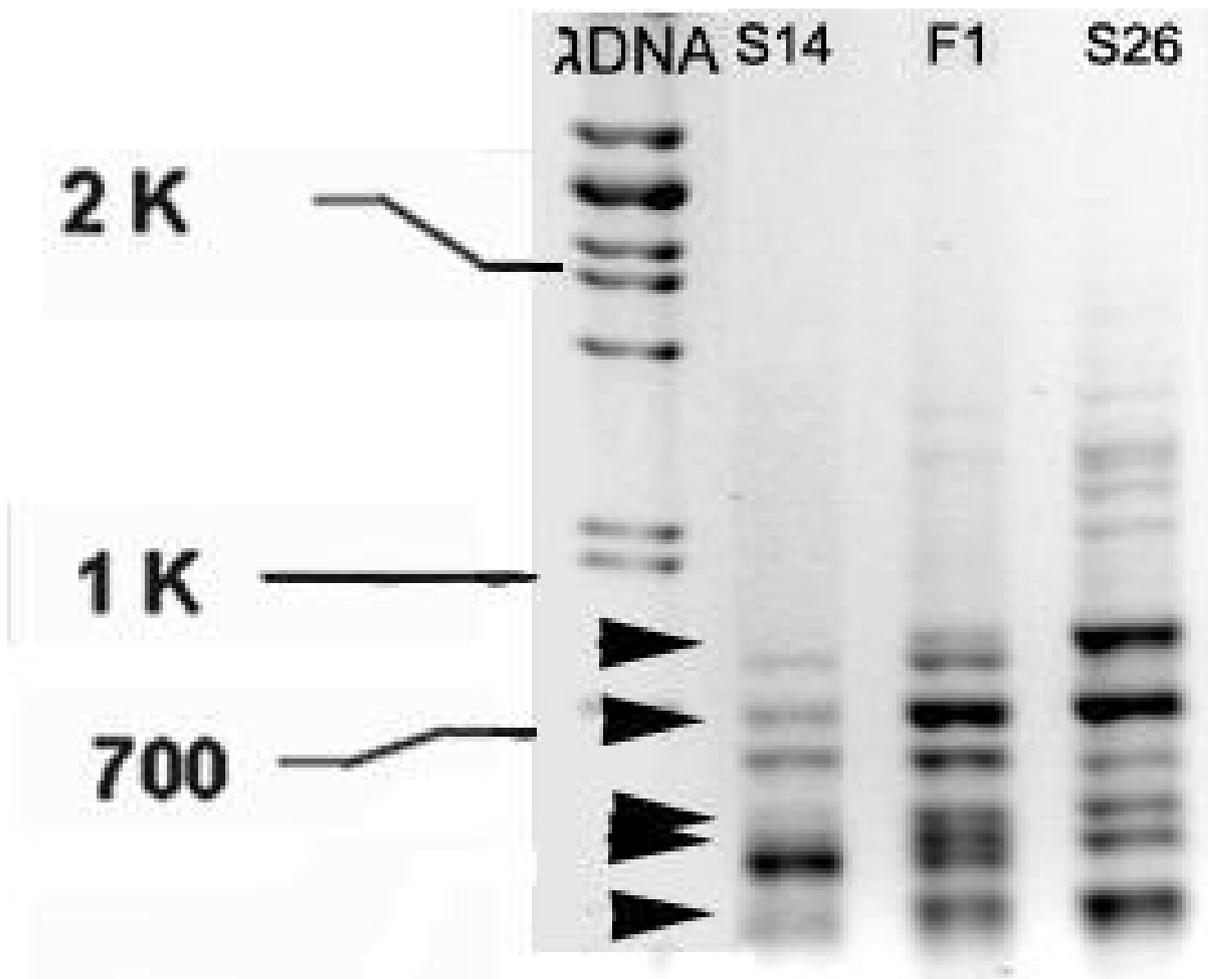
**Abbildung 2.28:** Vergleich der RAPD-Marker von Hybriden (F1) aus S3 (*S. caulescens*) und S2 (*S. saxorum*) anhand der Amplifikation des Primers A08

Die Hybriden aus S14 x S26 zeigten starkes Wachstum und viele violette Blüten. Die Sprossachsen wiesen lange Internodien auf und waren teilweise hängend. Die Blätter waren bis zu 5 cm lang und schmal. S14 (*Streptocarpus* 'Blue Moon') ist eine Art mit geringer Anzahl violetter Blüten und einer Blattlänge bis zu 3 cm. Der Partner S26 (*S. kirkii*) besitzt viele kleine, blasser Blüten. Obwohl die Epidermen von S14 und S26 farblos waren, hatten manche Sprossachsen aus S14 x S26 eine dunkelviolette Epidermis (Abb. 2.29).



**Abbildung 2.29:** Zwei Hybriden aus S14 (*Streptocarpus* 'Blue Moon') und S26 (*S. kirkii*). Links eine Hybride mit grünen und rechts eine Hybride mit violetten Stängeln

Der Primer A13 (Abb. 2.30) zeigte bei 900 bp, 800 bp, 700 bp und 400 bp starke Banden von S26 und S14 x S26, dennoch waren diese Banden bei S14 schwach ausgeprägt. Zwei starke Banden bei ca. 600 bp und 500 bp bei S26 und eine starke Bande bei ca. 450 bp, die nur bei S14 ausgeprägt wurden, konnten als Marker betrachtet werden. Diese drei Banden wurden zusammen bei der F1-Pflanze ausgeprägt und bestätigten den Hybridcharakter.



**Abbildung 2.30:** Vergleich der RAPD-Marker von S14 (*Streptocarpus* spec Sorte ‘Blue Moon’), S26 (*Streptocarpus kirkii*) und einer F1 aus der Kreuzung zwischen S14 und S26 anhand der Amplifikate des Primers A13

Andere interessante Gruppen von Hybriden waren die Pflanzen, die aus der Kreuzung zwischen S25 und S12 stammten. S25 (*S. caulescens* v. *pallens*) zeigte gestreckte, fleischige, verdickte Sprossachsen. Die Blätter waren schmal, dunkelgrün und gezahnt. Die Blüten von S25 waren klein und weiß mit einer kurzen Lebensdauer. Die positive Eigenschaft von S25 lag in der hohen Anzahl der Blüten, die über einen langen Zeitraum immer wieder gebildet wurden.

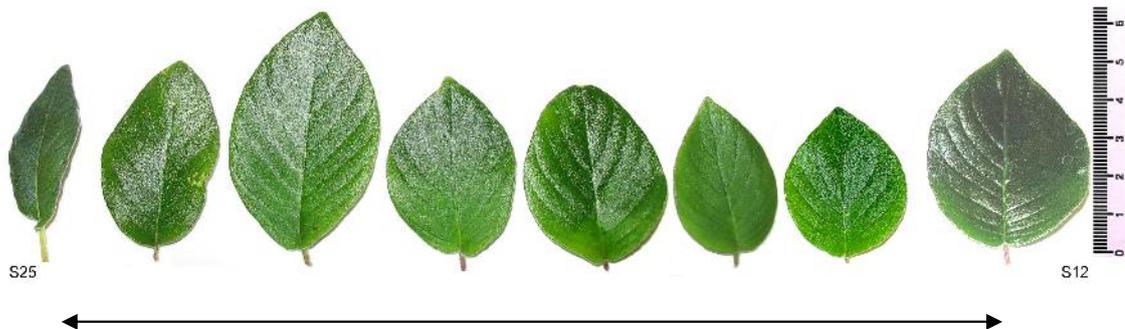
S12 (*S. glandulosissimus*) wies gestreckte Sprossachsen mit dunkelvioletter Epidermis auf. Die Blätter waren herzförmig, lederartig, mit glattem Rand, und ihre Oberfläche war glänzend. Die Internodien von S12 waren sehr lang. Wegen des starken Wachstums mussten die Sprossachsen ständig gestutzt werden. Die Blüten von S12 waren violett und ca. 3 cm lang.

Einige Hybriden aus S25 x S12 hatten dicke, fleischige Sprossachsen und stellen einen kompakten Wuchstyp dar. Die Blüten waren dunkelviolett und kleiner als die Blüten von S12, jedoch größer als jene von S25 und mit einer langen Lebensdauer wie bei S12. Die Anzahl der Blüten war viel höher als bei S12, aber deutlich geringer als bei S25. Die Epidermis der Sprossachsen besaß eine dunkelviolette Farbe und damit einen hohen Zierwert. Folgende Abbildung (2.31) stellt zwei Hybriden aus diesen Artkreuzungen dar:



**Abbildung 2.31:** Zwei Hybriden aus der Kreuzung zwischen S25 (*S. caulescens* v. *pallens*) und S12 (*S. glandulosissimus*)

Diese Hybriden stellten in vielfacher Hinsicht eine Kombination aus den beiden Kreuzungspartnern dar. Beispielsweise waren die Blätter in Form und Farbe unterschiedlich und zeigten ein intermediäres Spektrum der beiden Arten auf (Abb. 2.32).



**Abbildung 2.32:** Blätter von Hybriden aus der Kreuzung S25 x S12 mit verschiedenen Formen  
Aus der Kreuzung zwischen S14 (*Streptocarpus* 'Blue Moon') und S8 (*Streptocarpus*

‘Boysenberry Delight’) wurden Hybriden gewonnen. S14 zeigte einen kräftigen Habitus mit gestreckten Sprossachsen. Die Blätter waren schmal, dunkelgrün und schwach gezähnt. Die selten auftauchenden Blüten von S14 waren groß und dunkelviolett mit einer langen Lebensdauer.

S8 wies ebenfalls gestreckte Sprossachsen auf. Die Blätter waren bis zu 6 cm lang und relativ hellgrün. Diese Art produzierte zahlreiche hellviolette Blüten mit kurzer Lebensdauer.

Die aus dieser Kreuzung entstandenen Hybriden hatten mehr Ähnlichkeit mit S14, aber unter ihnen tauchte eine Chlorophyllchimäre auf, die während der Subkultur eine Unstabilität zeigte. Diese Pflanze wies schwache, gestreckte Sprossachsen mit dunkelgrünen, schmalen Blättern und dunkelvioletten Blüten auf. Abbildung 2.33 stellt zwei Hybriden aus dieser Kreuzung dar:



**Abbildung 2.33:** Zwei Hybriden aus der Artkreuzung zwischen S14 (*Streptocarpus* ‘Blue Moon’) und S8 (*Streptocarpus* ‘Boysenberry Delight’)

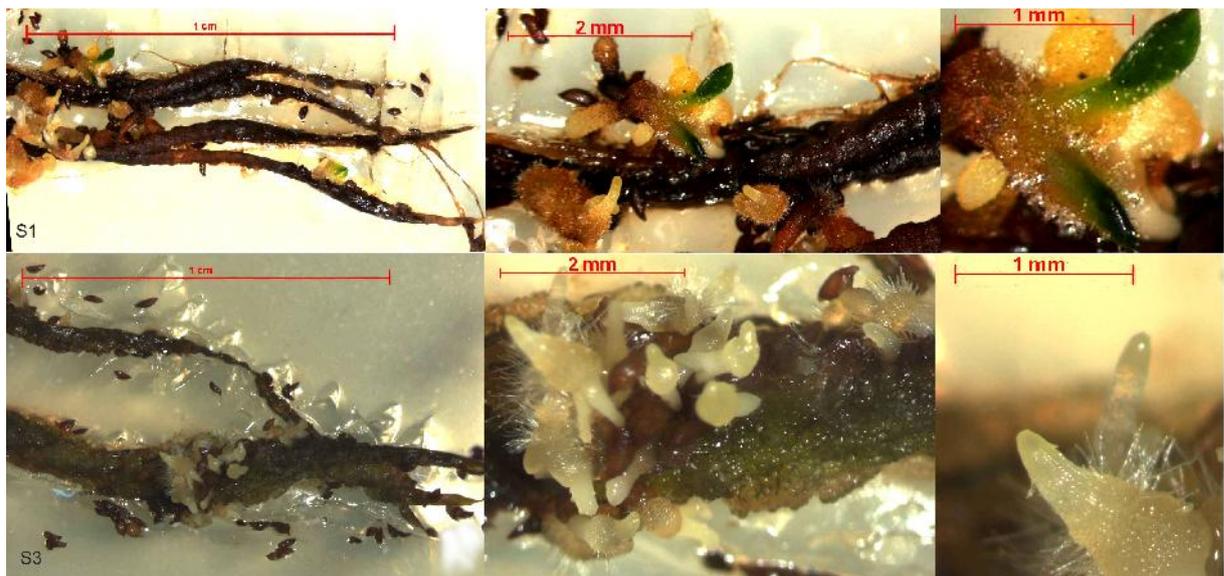
Die nachkommenden Pflanzen aus der Kreuzung S8 x S2 wiesen, trotz ähnlicher Sprossachsen und Blätter wie S8, größere Blüten mit einer längeren Lebensdauer als S8 auf. Die Pflanzen aus der Kreuzung S1 x S14 waren wegen der ähnlichen Habitus von S1 und S14 schwer zu identifizieren und erforderten weitere Untersuchungen (Abb. 2.34).



**Abbildung 2.34:** Rechts: eine Hybride aus der Kreuzung zwischen S8 (*Streptocarpus* ‘Boysenberry Delight’) und S2 (*S. saxorum*) und links: eine Hybride aus der Artkreuzung zwischen S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*) und S14 (*Streptocarpus* ‘Blue Moon’)

### 2.3.7 „embryo rescue“-Versuche

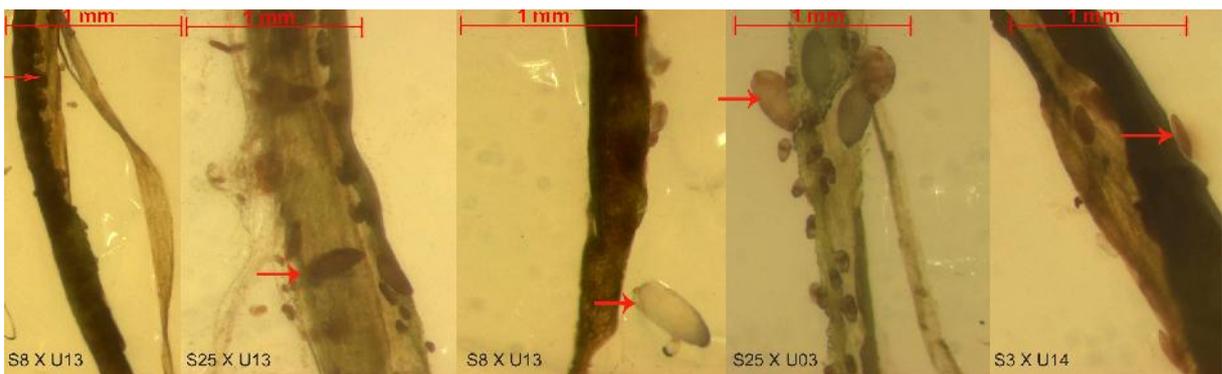
Um ein geeignetes Medium für die „embryo rescue“-Kultur zu finden, wurden in einem Vorversuch wöchentlich Fruchtknoten (Samenanlagen) aus Kreuzungen und Selbstungen (s. 2.2.13) auf zwei Medien (s. 2.2.12) kultiviert. Bei Samenanlagen, die drei Wochen nach dem Bestäuben auf das Medium aufgelegt wurden, konnte auf beiden Medien eine Keimung herbeigeführt werden. Diese nahm auf dem Medium mit 60 g / l Saccharose weitere sechs Wochen in Anspruch, bis die ersten Keimlinge, die aus Selbstungen von S1 und S3 entstanden waren, wuchsen (Abb. 2. 35).



**Abbildung 2.35:** Keimung der Embryonen aus Selbstungen von zwei *Streptocarpus*-Pflanzen (S1 und S3) auf dem „embryo rescue“-Medium mit 60 g Saccharose nach sechs Wochen

Die Embryonen aus Selbstungen, die auf das Medium mit 40 g / l Saccharose aufgelegt wurden, entwickelten sich erst nach 14 Wochen. Daraus lässt sich ableiten, dass das Medium mit 60 g / l Saccharose für *Streptocarpus*-Arten passender war. Im weiteren Versuchsablauf wurden jeweils zwei, drei und vier Wochen nach der Bestäubung die Samenanlagen aus den Kreuzungen (s. Tabelle 2.3, grauer Teil) auf dem Medium mit 60 g / l Saccharosegehalt kultiviert.

Die Fruchtknoten aus den Kreuzungen ließen sich eine, zwei und drei Woche nach der Bestäubung leicht präparieren und schneiden. Sie hatten weiße Samenanlagen. Die vier Wochen alten Fruchtknoten waren relativ hart und hatten teilweise braune Samenanlagen. Aus diesen Samenanlagen entwickelten sich keine Embryonen weiter, aber bei einigen Varianten, die drei Wochen nach den Bestäubungen kultiviert worden waren, vergrößerten sich einzelne Samenanlagen (Abb. 2.36). Sie wurden aber im Lauf der Zeit braun und starben ab.



**Abbildung 2.36:** Auf das „embryo rescue“-Medium aufgelegte Plazenten mit Samenanlagen aus Kreuzungen zwischen verschiedenen *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen, die drei Wochen nach den Bestäubungen präpariert wurden, nach zwei Monaten Kultur

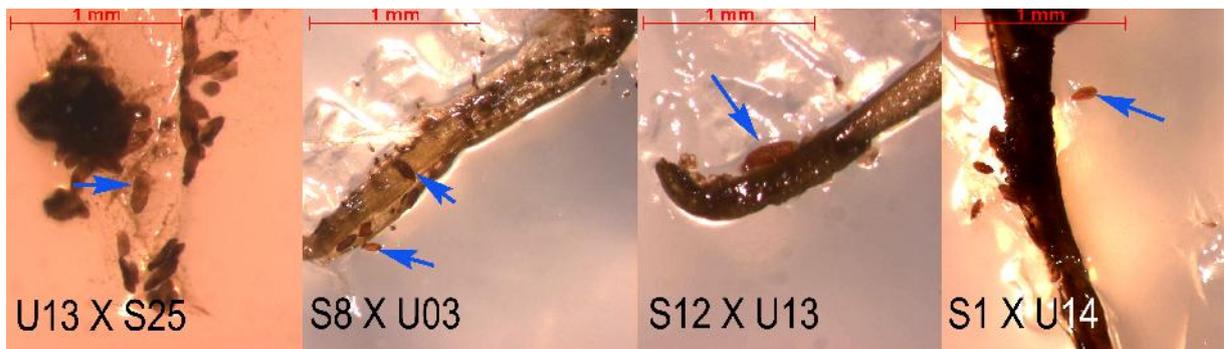
### 2.3.8 In-vitro-Bestäubungen

Ähnliche Ergebnisse wie bei den „embryo rescue“-Versuchen wurden beim Bestäuben in vitro beobachtet. Abb. 2.37 stellt die Plazenten und Samenanlagen von zwei *Saintpaulia*-Genotypen und einer *Streptocarpus*-Art eine Woche nach dem Bestäuben in vitro dar. Die Samenanlagen waren in diesen Stadien klein und zeigten keine Anzeichen von weiterer Entwicklung



**Abbildung 2.37:** Plazenten und Samenanlagen von zwei *Saintpaulia*-Genotypen und einigen *Streptocarpus*-Arten, die auf dem Medium bestäubt worden waren, nach einer Woche Kultur

Die Beobachtungen nach sechs Wochen zeigten, dass einige Samenanlagen von *Streptocarpus*-Arten und auch *Saintpaulia*-Genotypen sich von den anderen unterschieden, indem sie voluminöser wurden und aufschwemmten (Abb. 2.38).



**Abbildung 2.38:** Vergrößerung von einigen Samenanlagen sechs Wochen nach In-vitro-Bestäubung bei einigen Kreuzungen von verschiedenen *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen

## 2.4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigten, dass die Staubbeutel von den beiden Gattungen *Streptocarpus* und *Saintpaulia* vor den Fruchtblättern reiften. Während die Pollen aus Blüten in früheren Stadien teilweise keimfähig waren (Abbildungen 2.6, 2.15), waren die Narben bis zur Blütenöffnung unreif (Abb. 2.14). Diese Eigenschaft wird allgemein „Protandrie“ genannt. Bei *Streptocarpus* förderte zusätzlich die Position der Fruchtknoten beim Reifen die Bestäubung, weil die Fruchtknoten kurz vor der Blütenöffnung gerade bis unter die Staubblätter herauswuchsen (Abb. 2.14). Gleichzeitig wurden bei der Blütenöffnung die Staubbeutel, die durch ein kurzes Filament an das Blütenblatt gebunden waren, aufgerissen und die Pollen entlassen (Abb. 2.12).

Laut Literaturangaben wurden in mehreren unabhängigen Untersuchungen die Morphologie

der Blüten, die Pollenstruktur (SMITH 1996; WEIGEND UND EDWARDS 1996; HARRISON ET AL. 1999) und die Bestäubungssysteme (FAEGRI UND VAN DER PIJL 1996; HARRISON ET AL. 1999; MÖLLER UND CRONK 2001a,b; HUGHES ET AL. 2006; HASTON UND DE CRAENE 2007) bei den Gattungen *Streptocarpus* und *Saintpaulia* untersucht. Aber diese Untersuchungen wurden vor allem in Hinsicht auf Evolution, Entwicklung und Verwandtschaft innerhalb der *Gesneriaceae* durchgeführt und die Phänogramme teilweise mit anhand von molekularen Markern ermittelten Stammbäumen verglichen. Aufgrund dieser Ausrichtung sind deren Ergebnisse mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt vergleichbar. Jedoch sind diese Autoren, z.B. MÖLLER (1984), überzeugt, dass die Blüten für Kreuzungen frühzeitig kastriert werden sollten. MÖLLER (1984) berichtet, dass bei *Streptocarpus*-Hybriden die Pollen und die Narbe im Knospenstadium reif und befruchtungsfähig sind. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde kein Anhaften der Pollen auf den Narben während des Knospenstadiums festgestellt, aber die Pollen waren während des Knospenstadiums befruchtungsfähig (Abb. 2.13).

Bei protandrischen Pflanzen wie *Eucalyptus grandis* (VAN WYK 1977), *Pentagonia macrophylla* (MCDADE, L. 1986) *Gentiana* (WEBB UND PEARSON 1993) und *Hydrophyllum appendiculatum* (WOLFE UND SHORE 1992) wird dadurch meistens eine Selbstbestäubung ausgeschlossen. Da Protandrie jedoch auch häufig bei selbststerilen Blüten auftritt, wird auch in Betracht gezogen, dass dadurch eine Blockierung der Narbe durch eigene Pollen ausgeschlossen wird und so die erforderliche Bestäubung durch andere Individuen verstärkt ermöglicht wird.

Bei Untersuchungen an *Gesneriaceae* wurden bei *Sinningia*-Arten (SAN MARTIN-GAJARDO UND SAZIMA 2004) und bei *Moussonia deppeana* (VELÁZQUEZ UND JUAN FRANCISCO 2010) protandrische Eigenschaften festgestellt. Bei den untersuchten *Streptocarpus*-Arten fand aber aufgrund der Blütenstruktur Selbstbestäubung statt (Abb. 2.12 c). Auch wenn die Narbe während des Kontaktes mit den Pollenkörnern nicht ausgereift war, konnte Selbstung vorkommen, da die Pollen mehrere Tage funktionsfähig blieben.

Die Untersuchungen zeigten, dass frische Pollen von *Streptocarpus*-Arten und *Sainpaulia ionantha* die höchste Keimfähigkeit besaßen, und dass diese Fähigkeit im Laufe der Zeit abnahm. Die Lagerung im Kühlschrank war nicht geeignet, aber die Lagerung im Gefrierschrank konnte die Reduzierung der Keimfähigkeit erheblich verzögern. Besonders wenn es sich um wenige Monate handelte, konnten so gelagerte Pollen für die Bestäubung verwendet werden (Abb. 2.13).

Diese Ergebnisse entsprechen auch anderen Untersuchungen. In einer Studie wurden Pollenkeimung und Pollenlagerung von *Phytolacca dodecandra* L. untersucht (DEMKE UND HUGHES 1991). Die Pollenkeimung von *Phytolacca dodecandra* war nach zwei Wochen Lagerung bei Raumtemperatur um 25,2 % reduziert, und nach vier Wochen wurde keine Keimung mehr beobachtet.

Die Vitalität der Pollen wurde anhand von FDA und MTT eingeschätzt (s. 2.3.1). Die Anfärbung durch FDA hängt von der Aktivität von Estrase in den Pollen ab (HESLOP-HARRISON UND HESLOP-HARRISON 1970), und MTT legt die Aktivität von Dehydrogenase in den Pollen offen (NORTON 1966). Abbildung 2.6 zeigt, dass insgesamt mehr Pollen durch FDA als lebensfähig eingeschätzt wurden als durch MTT.

Obwohl Regressionsverhältnisse zwischen der In-vitro-Pollenkeimung und der eingeschätzten Vitalität durch beide Chemikalkien (MTT und FDA) bestehen, zeigt der Vergleich zwischen den Regressionslinien (Abbildungen 2.10 und 2.11), dass der Zusammenhang zwischen Pollenkeimung und Vitalität durch MTT realistischer ist. Die Streuung der Werte um die Regressionslinie bei Abbildung 2.11 ist sehr gering. Der Vergleich zwischen den Bestimmtheitsmaßen von beiden Regressionsanalysen (0,86 und 0,99) zeigt auch deutlich die Genauigkeit der MTT-Behandlung für die Einschätzung der Pollenkeimung. Ein Vergleich zwischen den beiden Regressionsgleichungen (FDA: Keimung =  $-26,7861 + 1,1810 \cdot \text{Vitalität}$  und MTT: Keimung =  $-2,1711 + 0,9870 \cdot \text{Vitalität}$ ) verdeutlicht die Genauigkeit der Vitalitätseinschätzung durch MTT, da bei MTT der geschätzte Betrag des Intercept-Parameters im Vergleich zu FDA bedeutend kleiner und die Abhängigkeit der Regressionsgleichung vom Vitalitätskoeffizient höher ist.

Die Korrelationsanalyse nach Pearson bestätigte die Ergebnisse der Regressionsanalyse. Bei der Vitalitätseinschätzung mit MTT betrug der Korrelationskoeffizient 0,99748. Für FDA war dieser Koeffizient deutlich schwächer (0,92708).

Diese Ergebnisse finden in der Literatur Bestätigung. NORTON (1966) führte einen Versuch von neun Pflaumen-Sorten an, in dem die Pollen mit 12 verschiedenen Tetrazoliumsalzen angefärbt wurden und der Anteil gefärbter Pollen mit der In-vitro-Pollenkeimung verglichen wurde. Die Korrelationsanalyse des Anteils gefärbter Pollen durch MTT und des Anteils von in vitro gekeimten Pollen zeigten den mit 0,99 signifikantesten Korrelationskoeffizienten.

RODRIGUEZ-RIANO UND DAFNI (1999) untersuchten die Pollenvitalität von acht verschiedenen Arten mit vier Methoden (MTT, Baker's procedure, X-Gal-Test und p-Phenylendiamine) und kamen zu dem Ergebnis, dass im Bezug zur In-vitro-Pollenkeimung nur MTT und p-Phenylendiamine geeignet waren. Die Autoren berichteten, dass die Anteile der durch MTT

und p-Phenylendiamine gefärbten Pollen starke Korrelationen mit der Pollenkeimung in vitro aufzeigten.

WATKINS UND CURTIS (2005) beschrieben ihre Untersuchungen zur Einschätzung der Pollenvitalität bei Weizen. Sie verwendeten verschiedene Methoden und Chemikalien (MTT, TTC). Die Autoren bestimmten die Färbung mit MTT als das sicherste und exakteste Verfahren zur Einschätzung der Pollenvitalität ( $R = 0,99$ ). Sie bestätigen damit auch ähnliche Ergebnisse von HECKER (1963), der die Pollenvitalität von Zuckerrüben untersuchte.

VIŽINTIN UND BOHANEK (2004) hatten in einem Vergleichstest Pollen und Mikrosporen von Gurken (*Cucumis sativus* L.) in Hinsicht auf die Vitalität untersucht. Die Autoren hatten frische und durch Ethanol geschädigte Pollen sowie Mikrosporen mit FDA und MTT angefärbt und die Einschätzungswerte mit dem Anteil in vitro gekeimter Pollen verglichen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass FDA im Gegensatz zu MTT die Unterschiede zwischen vitalen und unvitalen Pollen und Mikrosporen nicht zuverlässig zeigen konnte.

In jedem Fall, sowohl laut der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit als auch der Literaturangaben, ist festzustellen, dass durch die Färbung der Pollen von *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen mit MTT eine schnelle Einschätzung von Vitalität und Pollenkeimung möglich ist. Die Verwendung von MTT ist zu empfehlen, weil die Färbung der Pollen mit MTT im Vergleich zu FDA zuverlässigere Schlüsse auf die Pollenvitalität zulässt. Außerdem können die Proben bei MTT mit einem normalen Lichtmikroskop und ohne besondere Filter und UV-Licht (im Gegensatz zu der Anfärbung mit FDA) untersucht werden.

Die Anwendung des Mediums PM1 führte zu besserer In-vitro-Pollenkeimung. Bei elf Genotypen wurden signifikante Unterschiede zum Medium PM2 festgestellt (Abb. 2.7). Bei weiteren sechs Genotypen, die keine signifikanten Unterschiede bei der In-vitro-Pollenkeimung auf den Medien PM1 und PM2 zeigten, wie U03, U08, U09 oder S3, könnte die insgesamt schwächere Keimfähigkeit der Pollen als Ursache angesehen werden. Im Gegensatz dazu könnte bei einigen Genotypen wie S20 die sehr hohe Keimfähigkeit Ursache der fehlenden Signifikanz sein, weil bei einigen Arten aus der Untergattung *Streptocarpus*, besonders bei S20, teilweise Pollenkeimung beobachtet wurde, wenn lediglich Luftfeuchtigkeit vorhanden war.

Bei den Pollen einiger Arten der Untergattung *Streptocarpus* (S11, S19 und S20) keimten manche Pollenkörner nach einem Tag Lagerung im Kühlschrank ohne Medium. Ähnliche

Beobachtungen wurden von MÖLLER (1984) festgehalten. Er vermutete, dass dies eine Folge der hohen Luftfeuchtigkeit in den Verpackungen war. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es vorstellbar, dass die Unterschiede der Pollenkeimung auf den Medien PM1 und PM2 auf den relativ geringen Anteil von Verfestigungsmitteln (1 g / l Gelrite bei PM1 und 10 g / l Agar bei PM2) im Medium PM1 zurückzuführen ist. Andererseits wurde keine Pollenkeimung ohne Medium bei der Untergattung *Streptocarpella* und der Gattung *Saintpaulia* beobachtet.

Für die Gattungskreuzungen wurden acht *Streptocarpella*-Arten mit den Pollen von vier *Saintpaulia*-Genotypen gekreuzt (Tab. 2.5). Die Anzahl der Kreuzungen betrug bei den verschiedenen Varianten in Abhängigkeit von den vorhandenen Blüten zwischen 15 und 400. Auf Kreuzungen von *Saintpaulia* mit den Pollen von *Streptocarpus* wurde verzichtet, weil die Pollenschlauchbildung auf den Narben dieser Gattung meist gering oder unmöglich war (s. 2.3.5, Abb. 2.17).

Obwohl durch diese Kreuzungen bei mehreren Varianten Kapseln gebildet wurden, waren die Kapseln klein und fielen meistens zu früh ab, und die verbliebenen Kapseln waren leer. Bei zwei Varianten wurden einige Samen gewonnen, die nach der Aussaat im Gewächshaus jedoch nicht keimten (s. 2.3.6, Tab. 2.5). MÖLLER (1984) hatte mehrere Arten dieser Gattungen miteinander gekreuzt und berichtete ebenfalls, dass die Kreuzungen erfolglos waren.

Bei Artkreuzungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella* wurden acht Arten miteinander gekreuzt. Dabei wurden für jede Variante je nach vorhandenen Blüten zwischen fünf und 30 Kreuzungen durchgeführt. Bei allen Varianten wurden Kapseln gebildet, bei 14 von ihnen konnten Samen geerntet werden. Von 11 Varianten, deren Samen keimten, wurden bei sieben Varianten erfolgreiche Hybridisierungen festgestellt, bei den anderen Varianten konnten die erwarteten Eigenschaften, wie zum Beispiel intermediäre Internodien, durch morphologische Beobachtungen nicht nachgewiesen werden (s. 2.3.6, Tab. 2.6).

Auch während der Vorversuche der Diplomarbeit (AFKHAMI-SARVESTANI 2002) wurden einige Kreuzungen zwischen der Untergattung *Streptocarpella* und der Untergattung *Streptocarpus* und auch zwischen einigen Arten der Untergattung *Streptocarpella* durchgeführt. Die Pollen der Untergattung *Streptocarpella* konnten die Fruchtblätter der Untergattung *Streptocarpus* zur Kapselbildung führen, aber es wurden keine Samen gebildet. Auch andere Wissenschaftler kamen zu ähnlichen Ergebnissen (MÖLLER 1984). Aber bei den Kreuzungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella* wurden aus S8 x S2 und S8 x S4 Samen gewonnen.

Tabelle 2.6 zeigt auch, dass bei den meisten Kombinationen die Kreuzung nur in einer

Richtung möglich war. Beispielsweise wurden bei Kreuzungen zwischen S8 x S12 oder S25 x S12 nur dann Samen gewonnen, wenn S12 Pollenanbieter war. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von MÖLLER (1984) überein, der *Streptocarpus saxorum* mit *Streptocarpus stomandrus* kreuzte. Er berichtete, dass die Kreuzung der stammbildenden Arten *S. saxorum* und *S. stomandrus* nur mit *S. stomandrus* als Mutter gelang.

Die Erfolge der Kreuzungen wurden vor allem durch Beobachtung der morphologischen Eigenschaften sowie teilweise auch durch Anwendung von RAPD-Markern untersucht.

Bei einigen Eigenschaften wie Wuchstyp, Länge des Internodiums, Größe und Form der Blätter sowie Größe und Anzahl der Blüten zeigten die Hybriden intermediäre Charaktere mit weiten Spektren; beispielsweise hatten Hybriden aus S1 x S2, S3 x S2 oder S25 x S12 kompakte Wuchstypen mit zahlreichen Blüten (s. 2.3.6., Abb. 2.25, 2.27 und 2.31). Im Gegensatz zu S14, die wenige Blüten produzierte, zeigten die Hybriden aus S14 x S26 (Abb. 2.29) starkes Wachstum und viele violette Blüten.

Die Sprossachsen der Hybriden zwischen *S. caulescens* v. *pallens* x *S. glandulosissimus* zeigten eine dunkelviolette Farbe. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass dieses Phänomen durch ein dominantes Gen gesteuert wird. Aber einige F1-Pflanzen, die aus der Kreuzung zwischen *Streptocarpus* ('Blue Moon') x *Streptocarpus kirkii* (S14 x S26) hervorgingen, besaßen ähnliche Eigenschaften, obwohl die Sprossachsen beider Eltern eine grüne Epidermis hatten. Wahrscheinlich handelte es sich bei dieser Eigenschaft um zwei komplementäre Gene, die zusammen eine dunkelviolette Farbe erzeugten.

Ein anderes Phänomen trat bei der Kreuzung S25 x S12 auf. Die Blätter der Nachkommen hatten wie S12 glatte Ränder. Daraus folgt, dass Blätter mit glattem Rand gegenüber gezähnten Blättern dominant sind.

Ein Problem der *Streptocarpus*-Arten als Zierpflanzen sind die Früchte, die reif und braun werden und keinen schönen Anblick bieten. Sie müssen fortlaufend manuell entfernt werden. Die Hybriden, die oben beschrieben wurden, bildeten keine Früchte. Diese Eigenschaft kann theoretisch auch zu höherer Blütenbildung führen.

Artkreuzungen der Gattung *Streptocarpus* wurden von mehreren Wissenschaftlern beschrieben. Besonders LAWENCE (1940), OEHLERS (1964), MÖLLER (1984) und HUGHES ET AL. (2006) beschäftigten sich mit dieser Gattung, aber es handelte sich hauptsächlich um die Untergattung *Streptocarpus*. OEHLERS (1964) untersuchte einige F1-Pflanzen, die durch Kreuzung zwischen *S. rexii* und *S. wendlandii* entstanden, und beobachtete, dass die Blüten dieser Pflanzen keine Pollensäcke besaßen. Er schrieb, dass diese Eigenschaft im

Zusammenhang mit den plasmatischen Unterschieden der beiden Arten stand. Im Plasma ist ein Gen vorhanden, das mit einem Kerngen die Geschlechtsausbildung kontrolliert. Diese stehen in einem Gleichgewicht zueinander. Wenn die zwei Arten verschiedene plasmatische Erbinformationen besitzen, taucht bei einigen Kreuzungen der Arten eine Störung des Gleichgewichtes auf, und die Nachkommen zeigen eine stärkere Ausprägung eines Geschlechtes (MÖLLER 1984).

F1-Pflanzen, die durch Kreuzungen aus zwei Genotypen mit großer genetischer Distanz entstehen, sind steril. In den meisten Fällen wird die Sterilität als Konsequenz einer Störung während der Meiose und Mikrosporenbildung angesehen. Diese Störung bringt die Chromosomenverteilung während der Meiose aus dem Gleichgewicht und führt zur Sterilität der Pflanze (VAN TUYL UND KI-BYUNG 2004). In solchen Fällen kann durch eine Verdopplung des Chromosomensatzes mit Hilfe von Chemikalien (Colchizin) die Fertilität wiederhergestellt werden (Mitotic Polyploidisation).

F1-Pflanzen aus Kreuzungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella* (s. 2.3.6) bildeten zumindest unter den Kulturbedingungen dieser Studie zwar Pollensäcke und weibliche Fortpflanzungsorgane, waren jedoch trotzdem steril und bildeten keine Früchte.

Bei einigen F1-Pflanzen aus Kreuzungsvarianten wurde festgestellt, dass sie durch Selbstung entstanden waren. Ähnliche Fälle wurden von MÖLLER (1984) bei *Streptocarpus*-Hybriden berichtet. Er kam zu dem Ergebnis, dass die Narben und Pollen vor der Öffnung der Blüten reif und die Blüten schon im Knospenstadium befruchtungsfähig waren. Daher konnte die Selbstung in den Knospenstadien stattfinden.

Die eigenen Beobachtungen bei den untersuchten *Streptocarpella*-Arten zeigten, dass die Narbe im Gegensatz zu den Pollen im Knospenstadium nicht befruchtungsfähig war und nicht erwünschte Selbstungen daher wahrscheinlich durch Fehler während der Kastration stattfanden. Wenn die Kastration nicht vollständig durchgeführt wird und ein Teil des Pollensacks in der Blütenröhre bleibt, kann Selbstung stattfinden. Auch während des Gießens im Gewächshaus können Pollenstäube durch den Kontakt des Wasserschlauchs mit den Pflanzen oder durch die Bewegungen der Tische aus geöffneten Blüten frei werden und zu ungewünschtem Bestäuben oder Selbstung führen. Außerdem könnten die Aktivitäten von Thripsen trotz Maßnahmen zur Kontrolle von Thripsen im Gewächshaus zu ungewünschten Bestäubungen führen.

Wegen Zeitmangels wurden nur einige Hybriden aus drei Kreuzungen mit molekularen Markern weiter untersucht. In der Regel gelang der Nachweis durch das Auffinden väterlicher Banden.

In manchen Fällen wurden einige Bandenmuster der Eltern in den Hybriden nicht ausgeprägt, bei manchen Hybriden wurden wiederum neue Muster gebildet, die bei den Eltern nicht vorhanden waren (Abb. 2.28). Diese Phänomene könnten auf Rekombinationen von Genomen zurückzuführen sein.

RAPD-Marker wurden von mehreren Autoren beispielsweise für *Gossypium hirsutum* L. (LAN ET AL. 1992), *Ribes* (WIEJACHA ET AL. 2001), *Mentha* (SHASANY ET AL. 2005), *Litchee chinensis* (CHUNDET ET AL. 2002) und *Sorghum* (AKHARE ET AL. 2008) zur Identifizierung von Hybriden verwendet; dies wird später ausführlich diskutiert.

Bei Artkreuzungen muss meistens eine prä- bzw. postzygotische Barriere berücksichtigt werden. Präzygotische Barrieren können in Form von versagender Pollenkeimung oder langsamem Pollenschlauchwachstum in den Griffeln auftreten. Sie können durch mehrere Techniken überwunden werden. Bei Lilien beispielsweise wurden „cut-style“, „grafted style“ oder In-vitro-Befruchtungen erfolgreich für Artkreuzungen eingesetzt (VAN TUYL ET AL. 1991).

Bei Pappeln wurden durch Vorbestäubung mit nicht keimfähigem arteigenem Pollen (STETTLER 1968) die Hemmsubstanzen von den Narben abgebaut. Auch die Bepflügelung der Narbe mit verschiedenen Chemikalien wie  $\epsilon$ -Aminokapronsäure (JO ET AL. 1977), 2,4-D (KRUSE 1974) oder Pollenkeimungsmedium (AHLOOWALLA 1973) wurde bei Getreide erfolgreich zur Überwindung der präzygotischen Barriere eingesetzt. PANDA UND RAO (1970) konnten durch die Behandlung der Narbe mit UV-Licht die Inkompatibilität bei *Guizotia abyssinica* beseitigen.

Bei einigen Sorten von *Saintpaulia ionantha* wurde eine Inkompatibilität beobachtet, so dass auf ihren Narben weder eigene Pollen noch die Pollen von *Streptocarpus*-Arten keimen konnten (s. 2.3.5, Abb. 2.17). Der Einsatz einiger der oben genannten Methoden wie die Verletzung der Narbe oder das Abschneiden der Narbe („cut style“) oder des Griffels brachte keine Pollenkeimung hervor. Die Pollen von *Saintpaulia ionantha* konnten jedoch auf den Narben von *Streptocarpus*-Arten keimen, und bei Kreuzungen innerhalb von *Streptocarpus*-Arten wurden außer bei S12 (*Streptocarpus glandulosissimus*) keine präzygotischen Barrieren beobachtet. Bei S12 konnten präzygotische Barrieren mit *Saintpaulia*-Genotypen und *Streptocarpus*-Arten (*S. saxorum*, *S. caulescens* und *S. caulescens* v. *pallens*) durch Verletzung der Narbe überwunden werden (s. 2.3.5, Abb. 2.18).

Bestäuben in vitro wurden erstmals von KANTA ET AL. (1962) erfolgreich zur Befruchtung von *Papaver somniferum* eingesetzt. Bei *Papaver somniferum* ist der Griffel zu kurz, und der

Abstand zwischen Narbe und Samenanlage reicht für ein optimales Pollenschlauchwachstum nicht aus. Durch Bestäuben *in vitro* konnte der Pollenschlauch jedoch das optimale Wachstum erreichen und die Eizelle befruchten (KANTA ET AL. 1962). Danach testeten die Autoren diese Methode bei mehreren weiteren Pflanzen: *Argemone mexicana* (KANTA UND MAHESHWARI 1963) und *Eschscholzia californica* (MAHESHWARI UND KANTA 1964). Später wurde diese Technik von anderen Autoren ergänzt und für Pflanzen, deren Befruchtung durch die präzygotische Barriere Schwierigkeiten bereitete, eingesetzt. RANGASWAMY UND SHIVANNA (1967, 1971) konnten die Selbstinkompatibilität bei *Petunia axillaris* durch Bestäuben *in vitro* überwinden. Bestäuben *in vitro* wurde auch für Artkreuzungen bei Lilienarten (CHI 2000) sowie für Gattungskreuzungen bei *Melandrium album* x *Viscaria vulgaris*, *M. album* x *Datura stramonium* und *M. album* x *Silene schafta* *M. album* x *Lychnis coronaria* (ZENKTELER 1969, 1970, 1999; ZADWORNA UND ZENKTERLER 2005) oder bei *Bromeliaceae* (VERVAEKE ET AL. 2002) erfolgreich eingesetzt.

Beim Bestäuben *in vitro* können isolierte Eizellen, einzelne Samenanlagen, Samenanlagen mit Plazenta oder ganze Fruchtknoten verwendet werden. Bei *Saintpaulia*-Genotypen und *Streptocarpella*-Arten wurden vor allem Samenanlagen mit Plazenta und einige einzelne Samenanlagen auf den Medien kultiviert und mit den Pollenkörnern der Kreuzungspartner bestäubt.

RANGASWAMY (1977) stellte bei der Befruchtung von *Petunia axillaris* durch Bestäuben *in vitro* fest, dass das Bestäuben von Samenanlagen mit Plazenta im Vergleich zum Bestäuben von isolierten Eizellen vorteilhaft war, weil durch das Bestäuben der Plazenta die Pollenschläuche auf natürlichem Wege die Eizellen erreichen und Störungen und Schäden, die durch den unnatürlichen Eintritt mehrerer Pollenschläuche in die Samenanlagen entstehen könnten, verhindert wurden.

ZENKTELER ET AL. (2005) hatten bei Artkreuzungen Eizellen von *Melandrium album* aus nicht geöffneten Blüten entnommen und sie nach der Trennung von der Plazenta mit Pollen von *Lychnis coronaria* *in vitro* bestäubt. Die Autoren berichteten, dass das Eindringen der Pollenschläuche in die Mikropyle nach 18 Stunden unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte. Die histologischen Untersuchungen bestätigten, dass oft mehrere Pollenschläuche durch Mikropyle in die Eizellen eindringen.

ZENKTELER (1967) bestäubte die Eizellen von *Melandrium album* mit Pollen von einigen Arten aus der Familie *Caryophyllaceae*. Bei manchen Kombinationen beobachtete er nach zwei Tagen eine Vergrößerung der Samenanlagen. Diese hatten sich nach weiterer Kultur bis zu vitalen Samen entwickelt. Er war davon überzeugt, dass die Vergrößerung der

Samenanlagen ein Zeichen für eine erfolgreiche Befruchtung war. Aber bei der Artkreuzung zwischen *Melandrium album* mit *Lychnis coronaria* in vitro (ZENKTELER ET AL. 2005) verfolgten sie fortlaufend die histologische Entwicklung der Embryonen nach der Befruchtung. Die Autoren berichteten, dass trotz voluminöser Vergrößerung und Aufschwemmung, was als Zeichen einer erfolgreichen Befruchtung gedeutet wurde, manche aufgeschwemmte Eizellen keinen Embryo enthielten. Wenn 25 Tage nach der Bestäubung die Embryonen auf ein auxinhaltiges MS-Medium transportiert wurden, starben die meisten Embryonen kurz nach dem Transport ab, und nur einige (ca. 15 %) konnten sich zu ganzen Pflanzen entwickeln (ZENKTELER ET AL. 2005).

Aus dem Bestäuben in vitro wurden bei *Saintpaulia* und *Streptocarpus* keine Pflanzen gewonnen (s. 2.3.8). Aber die Vergrößerung und Aufschwemmung einiger Samenanlagen wurde auch bei den Bestäubungen in vitro bei *Saintpaulia* und *Streptocarpella* beobachtet (s. 2.3.8, Abb. 2.37).

Aus Kreuzungen zwischen *Streptocarpus*-Arten mit *Saintpaulia*-Genotypen wurden keine Samen gewonnen, aber bei den meisten Varianten kam es zu Kapselbildungen. Obwohl die Kapseln keine Samen enthielten, verblieben sie an den Pflanzen und wurden geerntet (s. 2.3.6.2, Tab. 2.6). Bei den Kreuzungen innerhalb von *Streptocarpella*-Arten wurden ähnliche Phänomene beobachtet. Bei allen erfolglosen Kreuzungen kam es, wie bei erfolgreichen Kreuzungen, zu Kapselbildungen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von MÖLLER (1984) überein, der über Kreuzungen mit *Saintpaulia* berichtete. Er gelangte zu der Auffassung, dass *Saintpaulia* die Eigenschaft aufwies, dass deren Fruchtknoten zum Teil auch ohne Bestäubung verstärkt wuchsen, was mit einer Befruchtung verwechselt werden konnte.

Die postzygotische Barriere kann manchmal durch „embryo rescue“ überwunden werden. Diese Technik wird angewendet, wenn der Embryo nach der Befruchtung aufgrund einiger Störungen während der Befruchtung abgestoßen wird. Dies kann durch anomale Entwicklung des Embryos oder des Endosperms geschehen (RAGHAVAN 1977). Bei Kreuzungen zwischen manchen *Pinus*-Arten degenerierten die Embryonen trotz erfolgreicher Befruchtung und Embryonenbildung im Archegonium (HAGMAN UND MIKKOLA 1963; KRIEBEL 1972).

Die Anwendung von „embryo rescue“ geht möglicherweise auf das 18. Jahrhundert zurück, als CAHRLES BONNET die Embryonen von *Phasaeolus* und *Fagopyrum* herausschnitt und in Erde einpflanzte (SCHOPFER, 1943). Aber der systematische Schritt zu „embryo rescue“ erfolgte im Jahr 1904 durch HANNING, als er unter sterilen Bedingungen die Embryonen von

*Raphanus spp.* und *Chochleria damica* auf einem Medium, das Zucker und Mineralien enthielt, kultivierte.

Der Abbruch der Entwicklung von Embryonen kann auch durch Degeneration des Endosperms verursacht werden, weil der Embryo für die Ernährung bzw. für das Überleben und die weitere Entwicklung vom Endosperm abhängig ist. RENNER (1914) beobachtete, dass bei einigen Kreuzungen zwischen *Oenothera*-Arten das Endosperm nach der Befruchtung sofort degenerierte. Von ähnlichen Phänomenen wurde bei Kreuzungen zwischen diploiden und tetraploiden Hybriden von *Zantedeschia* berichtet (YAO UND COHEN 1996). Diese triploide Hybriden konnten sich durch die „embryo rescue“-Technik zu normalen Pflanzen entwickeln.

Die Anwendung von „embryo rescue“ ist bei Artkreuzungen sinnvoll, weil die Embryonen aus solchen Kreuzungen wegen des Zusammenbruchs des Embryos bzw. der Degeneration des Endosperms früh absterben und sich durch „embryo rescue“ zu ganzen Pflanzen entwickeln können (LAIBACH 1925). Diese Auffassung wurde später von mehreren Autoren bestätigt. SHARMA ET AL. (1996) listeten zahlreiche erfolgreiche Artkreuzungen von Getreide, Gemüse, Obstbäumen und Zierpflanzen auf, bei denen durch „embryo rescue“ die Erzeugung von neuen Hybriden erreicht wurde. Artkreuzungen durch diese Methode wurden z.B. bei *Lilium* (ASANO UND MYODO 1977; ASANO, 1978, VAN TUYL ET AL. 1986, 1987, 1989, 1991; CHI 2000, 2002), bei *Allium* (BINO ET AL. 1989), bei *Tulipa* (CUSTERS ET AL. 1995), bei *Cyclamen* (ISHIZAKA 1996, EWALD 1996), bei *Cicer* (CLARKE ET AL. 2006), bei *Rhododendron* (EECKHAUT ET AL. 2007), bei *Buddleja* (VAN LAERE ET AL. 2009) und bei *Oryza* (GUO ET AL. 2009 und ABDULLAH ET AL. 2009) erfolgreich durchgeführt. Auch bei Gattungskreuzungen wie *Melandrium album* x *Viscaria vulgaris* und *Melandrium album* x *Silene schafta* (ZENKTELER ET AL. 1969, 2005) wurde „embryo rescue“ erfolgreich angewendet.

CHI (2002) testete vier „embryo rescue“-Methoden: OSC (Ovary slice culture), OPC (Ovule with Plazenta culture), YOC (Young single ovule culture) und ESR (embryo sac rescue) für Artkreuzungen zwischen verschiedenen *Lilium*-Arten und stellte fest, dass die letzte Methode (ESR) bei mehreren Kombinationen zur mehr Erfolg führte und im Vergleich zu anderen Methoden effektiver war. Gleichzeitig berichtete er, dass durch OPC bei einigen Kombinationen die höchste Anzahl von Entwicklungen der Embryonen stattfand (bis zu 0,8 %).

Aus Kreuzungen zwischen *Streptocapella*-Arten und *Saintpaulia ionantha*-Soten wurden jeweils eine, zwei und drei Wochen nach der Kreuzung Kapseln für die „embryo rescue“-Kultur verwendet (s. 2.2.12, 2.2.13). Das Herausschneiden des Embryos aus der Samenanlage

ist manchmal wegen technischer Schwierigkeiten nicht möglich. In solchen Fällen wird die Samenanlage mit der Plazenta oder der ganze Fruchtknoten auf dem „embryo rescue“-Medium kultiviert (SHARMA ET AL. 1996). Bei *Streptocarpus* und *Saintpaulia* waren auch die Samenanlagen zu klein. Deswegen wurden die Samenanlagen sowohl einzeln als auch mit der Plazenta auf dem „embryo rescue“-Medium kultiviert.

Obwohl sich die Embryonen aus Selbstungen auf den Medien zu ganzen Pflanzen entwickelten (s. 2.3.7, Abb. 2.36), wurden von den kultivierten Samenanlagen aus Kreuzungen keine Pflanzen erhalten, und Keimlinge wurden nur aus den Samenanlagen beobachtet, die mit der Plazenta auf den „embryo rescue“-Medien kultiviert worden waren (s. 2.3.7, Abb. 2.35). Unter den Artkreuzungen bei der vorliegenden Arbeit waren aber auch Varianten, die Samen enthielten, nach der Aussaat jedoch nicht keimten (s. 2.3.6.2, Tab. 2.6). Im Übrigen wurden bei den „embryo rescue“-Versuchen an *Streptocarpella*-Arten, die von Pollenkörnern von *Saintpaulia*-Genotypen bestäubt worden waren, einige Samenanlagen beobachtet, die sich auf dem Medium vergrößerten (s. 2.3.7, Abb. 2.35). Dies stimmt mit den Befunden einiger Autoren überein, die bei Artkreuzungen anhand ähnlicher Beobachtungen Befruchtungen feststellten und durch „embryo rescue“ neue Hybriden herstellten. LAIBACH (1925) führte eine Artkreuzung zwischen *Linum perenne* und *L. astracum* durch und beobachtete, dass die aus der Artkreuzung erzeugten Samen trotz Kapselbildung im Vergleich zu normalen Samen geschrumpft und leichter waren. Diese Samen konnten nicht in Erde keimen; erst als er die Embryonen aus den Samen herausschnitt und auf Baumwolle in einer Saccharoselösung kultivierte, keimten sie.

Bei einigen Kreuzungen wie *Oenothera biennis* x *O. muricata* und *Oenothera biennis* x *O. lamarkiana* (RENNER 1914), *Datura*-Arten (RIETSEMA UND SATINA 1959), *Hibiscus costanus* x *H. aculentus* und *Hibiscus costanus* x *H. furcellantus* (ASHLEY 1972), deren Embryonenentwicklungen sehr langsam waren und deren befruchtete Eizellen sich meist nur bis zur Bildung einiger Zellen entwickeln konnten, war in Einzelfällen die Bildung von geschrumpften Samen zu beobachten.

Aus der Kreuzung zwischen *Lycopersicon esculentum* und *Lycopersicon peruvianum* wurden anomale Samen gewonnen, die nach der Kultur in Erde nicht keimten, aber durch die „embryo rescue“-Methode auf dem Medium normale Pflanzen bildeten (SMITH 1944; CHOUDHURY 1955a, 1955b; ALEXANDER 1965; LAI ET AL. 1990).

Es stellt sich die Frage, ob diese voluminösen Vergrößerungen und Aufschwemmungen von Samenanlagen von *Saintpaulia* und *Streptocarpus*, die bei Kreuzungen, „embryo rescue“-

Kulturen oder beim Bestäuben in vitro beobachtet wurden, auf die Befruchtung von Eizellen oder auf eine einfache Aufnahme von Wasser und Nährstoffen aus dem Medium zurückzuführen waren. Wahrscheinlich waren diese Beobachtungen jedoch ein Beweis für die Befruchtung von Eizellen, weil besonders bei der „embryo rescue“-Kultur und beim Bestäuben in vitro von *Streptocarpus* nur einige Samenanlagen voluminöse Vergrößerungen zeigten. Dies sollte in Zukunft durch eine weitere histologische Untersuchung festgestellt werden. Bei einigen Arten wurden Befruchtungen der Eizellen nach Bestäubung in vivo oder in vitro durch solche Untersuchungen bestätigt: *Melandrium album* Mill. x *Datura stramonium* L (ZENKTLER 1970), Reis (AKIKO ET AL. 2009), *Hemerocallis* (LI ET AL. 2009), *Hylocereus* (CISNEROS ET AL. 2010), *Brachiaria decumbens* (DIVA ET AL. 2010).

Laut den Literaturangaben spielt Zucker bei „embryo rescue“-Medien eine große Rolle: *Asparagus* (HONJO ET AL. 2009), *Lilium* (WANG ET AL. 2009), *Hylocereus* (IKEDA ET AL. 2000). Einerseits ist Zucker die Quelle für Kohlenstoff, andererseits stabilisiert er den osmotischen Druck des Mediums (SHARMA ET AL. 1996) und wirkt als Signalmolekül für die weitere Entwicklung des Embryos. Im Vergleich zu reifen Embryonen benötigen nicht reife Embryonen einen höheren osmotischen Druck bzw. mehr Zucker im Medium (TUKEY 1933, 1938; LAMMERTS 1942; KENT UND BRINK 1947; ZIEBUR 1951). Als der Zuckergehalt des Mediums um ein Drittel reduziert wurde, verzögerte sich die Keimung der Embryonen von sechs auf 14 Wochen (s. 2.3.7). Das ist auch ein Beweis dafür, dass die Embryonen drei Wochen nach dem Bestäuben noch in frühen Stadien und unreif waren. Der Erfolg von „embryo rescue“ hängt vor allem vom Reifestadium der Embryonen und den Komponenten des Mediums ab. Je unreifer die Embryonen sind, desto komplexere Medien werden benötigt (SHARMA ET AL. 1996). Daher ist es vorstellbar, dass das „embryo rescue“-Medium für *Streptocarpus*-Arten weiterer Optimierung bedarf. Aus den Samenanlagen, die direkt mit dem Medium im Kontakt waren, gingen keine Keimlinge hervor (Abb. 2.34). Auch dies kann auf die Notwendigkeit einer Optimierung des Mediums hinweisen.

### 3 Protoplastenkultur bei *Saintpaulia ionantha*-Sorten

#### 3.1 Einleitung

Unter Polyploidisierung versteht man eine Vermehrung der Chromosomenzahl des Genoms. Bei der Polyploidisierung ist generell die Vervielfachung des eigenen Genoms (Autopolyploidie) von der Vervielfachung der Chromosomen in der Folge von Kreuzungen verschiedener Arten (Allopolyploidie) zu unterscheiden (GRAU 2006). Allopolyploidie ist eine wichtige Quelle für die Erweiterung der genetischen Variabilität, die bei Zierpflanzen eine besonders große Rolle spielt. Dabei bietet die somatische Hybridisierung durch Protoplastenfusion die Möglichkeit, neue Pflanzen herzustellen.

Eine Voraussetzung für die Erstellung von somatischen Hybriden ist, dass sich aus Protoplasten von mindestens einem der beiden Fusionspartner Pflanzen regenerieren lassen.

Die Isolation der Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* wurde zunächst durch enzymatische Behandlungen an Blättern und Blattstielen aus In-vitro-Kultur geprüft (HUGHES 1977). BILKEY UND COOKING (1982) isolierten die Protoplasten mechanisch aus Kallussen aus In-vitro-Kultur, aufgrund der geringen Anzahl der gewonnenen Protoplasten erfolgte jedoch keine Regeneration der Pflanzen. Die erste erfolgreiche Isolation und Regeneration von Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* wurde 1992 von WINKELMANN UND GRUNEWALDT veröffentlicht. Bei ihrem Protokoll wurden als Ausgangsmaterial junge regenerierte Sprosse, die in Dunkelheit herangezogen worden waren, verwendet und die isolierten Protoplasten in Alginatfilme eingebettet und kultiviert.

Kurz darauf wurde ein weiterer Bericht über die Isolierung und Regeneration von *Saintpaulia ionantha* aus Protoplasten veröffentlicht (HOSHINO ET AL. 1995). Die Autoren hatten als Ausgangsmaterial Zellen aus Suspensionskultur verwendet. Die isolierten Protoplasten wurden auf festem Medium kultiviert.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde zur Protoplastenkultur und -regeneration bei *Saintpaulia ionantha* das erste Protokoll (WINKELMANN 1994) verwendet.

#### 3.2 Material und Methoden

##### 3.2.1 Pflanzenmaterial

Die verwendeten Sorten waren U01 ('Rokoko Rose') mit rosa gefüllter Blüte, U03 ('De Eeuwige Lente') mit dunkelblauer Blüte, U08 ('Claudia') mit einfacher weißer Blüte und U10 ('Heidrun') mit einfacher rosa Blüte (Tab. 2.1, Kapitel 2).

### **3.2.2 Zusammensetzung und Herstellung des Regenerationsmediums (9.1) für *Saintpaulia ionantha*-Blattexplantate (in vitro)**

Einem Liter Grundmedium wurden 30 g Saccharose, 0,2 mg Thiamin-HCl, 20 mg myo-Inositol und 8 g Serva-Agar (Nr. 11396) zugesetzt. Die Konzentration an Makro- und Mikroelementen entsprach mit Ausnahme des auf 2 mM reduzierten Gehalts an  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (GRUNEWALDT 1977) den Angaben von MURASHIGE UND SKOOG (1962). Das Regenerationsmedium für *Saintpaulia* enthielt pro Liter 0,8 mg IAA und 0,4 mg BAP (GRUNEWALDT 1977; WINKELMANN 1994). Der pH-Wert des Mediums wurde mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf 5,7 bis 5,8 eingestellt.

Danach wurde das Medium bei 1,1 kg / cm<sup>2</sup> Dampfdruck in einem Autoklaven für 20 min. erhitzt, wodurch eine Temperatur von 121 °C entstand. Anschließend wurden je 10 ml in 6 cm-Plastikpetrischalen gegossen.

### **3.2.3 Zusammensetzung und Herstellung des Sprosserhaltungsmediums für *Saintpaulia ionantha***

Das Sprosserhaltungsmedium (9.0) wurde wie das Regenerationsmedium (9.1), jedoch ohne Phytohormone, hergestellt.

### **3.2.4 Zusammensetzung und Herstellung der Präplasmolyse**

Für einen Liter Präplasmolyse wurden 0,3 M Sorbitol, 0,1 M Glycin und 0,05 M  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf einen Liter aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf 5,6 eingestellt und bei 1,1 kg / cm<sup>2</sup> Dampfdruck für 20 min. in einem Autoklaven bei 121 °C erhitzt.

### **3.2.5 Zusammensetzung und Herstellung der Enzymlösung**

Um eine Enzymlösung mit Endkonzentrationen von 2,0 % Cellulase und 0,5 % Macerozyme herzustellen, wurden 2000 mg Cellulase „Onozuka R-10“ (Yakult Honsha 201059) und 500 mg Macerozyme R-10 (Yakult Honsha 202024) in 5 ml A. bidest. gelöst und für mehrere Stunden mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Danach wurde die Lösung auf vier 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und für 30 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert und sedimentiert. Danach wurde der Überstand mit 95 ml Grundmedium BNE 9 (s. Tabelle 3.1) gemischt. Anschließend wurde der pH-Wert des Mediums mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf 5,6 eingestellt und die Lösung filtersterilisiert und im Kühlschrank gelagert.

### **3.2.6 Zusammensetzung und Herstellung der Pufferlösung 1**

Für einen Liter Pufferlösung wurden 18,8 g KCl, 23,0 g Saccharose, 160 mg  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und

136 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf einen Liter aufgefüllt. Danach wurden 15 ml 0,3 M  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf 5,6 und der osmotische Wert auf 550-560 mOsmol / kg  $\text{H}_2\text{O}$  eingestellt. Anschließend wurde die Pufferlösung filtersterilisiert.

### 3.2.7 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für Protoplasten

Insgesamt wurden sechs Medien zur Protoplastenisolierung, Protoplastenkultur und Regeneration bei *Saintpaulia ionantha* verwendet:

BNE 9	Grundmedium für die Enzymlyösung
8pm7	Startmedium für die Protoplastenkultur
KF1	Kallusinduktionsmedium
KF2	Kalluswachstumsmedium
KR10	Sprossregenerationsmedium

Die Konzentrationen an Makro- und Mikroelementen, Eisen, Vitaminen und Zucker aller Medien in mg / Liter wird in der Tabelle 9.6 im Anhang dargestellt.

**Tabelle 3.1:** Zusammensetzung der Medien für die Protoplastenkultur

Medium	Makro- elemente	Mikro- elemente, Vitamine	Org. Säuren, Zucker	Sacch. [g / l]	Osmola- rität [mOsmol / kg $\text{H}_2\text{O}$ ]	NAA [mg / l]	IAA [mg / l]	BAP [mg / l]
BNE 9	KM8p <sup>1)</sup>	B5 <sup>2)</sup>	KM8p	120	535	0	0	0
8pm7	KM8p	B5	KM8p	125	560	1,0	0	1,0
KF1	mod KM <sup>3)</sup>	B5	KM8p	90	400	0,5	0	0,5
KF2	mod KM	B5	KM8p	65	300	0,5	0	0,5
KR10	mod KM	B5	KM8p	50	250	0	0,2	2,0

<sup>1)</sup> KAO UND MICHAYLUK (1975)

<sup>2)</sup> GAMBORG ET AL. (1968)

<sup>3)</sup> Verändert nach KAO UND MICHAYLUK (1975): 0,3 g / l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und 0,9 g / l  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Der pH-Wert der Medien wurde mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf 5,6 bis 5,7 eingestellt.

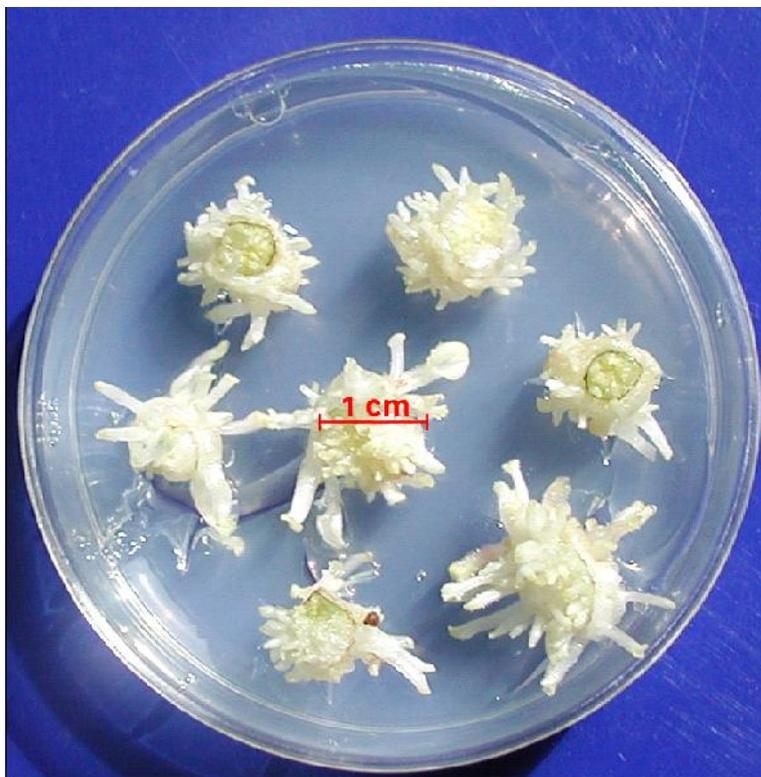
Um die Karamellisierung der Zucker in den Medien zu verhindern, wurden die Medien nicht autoklaviert, sondern an der Werkbank filtersterilisiert. Zur Verfestigung der Medien KF2 und KR10 wurde zuerst 3 %ige autoklaviierte Agarose (Biozym LE Agarose, Nr. 840004) im Wasserbad bei 70 °C verflüssigt. Danach wurden 2,5 VT des Mediums mit 1 VT Agarose gemischt. Anschließend wurden jeweils 3,5 ml unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen mit 3,5 cm Durchmesser gefüllt.

### 3.2.8 Kultur des pflanzlichen Ausgangsmaterials

Es wurden junge, noch nicht vollkommen entfaltete und unverletzte Blätter der vier

*Saintpaulia ionantha*-Genotypen (s. 3.2.1) aus der In-vitro-Sprosskultur verwendet, die vorher (AFKHAMI 2002) im Labor der Abteilung Zierpflanzenbau nach WINKELMANN UND GRUNEWALDT (1992) etabliert wurde.

Zur Präparation der Explantate wurden die Blattränder unter sterilen Bedingungen an der Werkbank abgetrennt und die Blattspreite in Rechtecke von 2 bis 3 mm Kantenlänge zerschnitten. Diese Explantate wurden mit der unteren Epidermis auf das in einer Petrischale befindliche Regenerationsmedium (9.1) gelegt (s. 3.2.2). In jede Petrischale wurden 6-7 Explantate eingesetzt. Die Kultur erfolgte nach WINKELMANN (1994) bei 24 °C in Dunkelheit für sechs Wochen.



**Abbildung 3.1:** Regenerierte Sprosse an Blattexplantaten des Genotyps U08 nach sechs Wochen Kultur in Dunkelheit bei 24 °C

### 3.2.9 Isolierung und Reinigung der Protoplasten

Unter sterilen Bedingungen wurden an der Werkbank 0,4-0,5 g junge Sprosse, die an Blattexplantaten regeneriert worden waren (Abb. 3.1), abgetrennt und in eine Petrischale eingewogen. Danach wurde dieses Pflanzenmaterial unter Zusatz von 0,5 ml Präplasmolyselösung mit einer sterilen Rasierklinge, die mit einem speziellen Halter festgehalten wurde, gehackt und klein geschnitten. Nur die Sprosse und Sprossansätze wurden verwendet, nicht jedoch die undifferenzierten harten Strukturen, aus denen sie entstanden. Danach wurden 5 ml Präplasmolyselösung zugegeben. Nach einer Stunde wurde die Lösung abgesaugt und durch 5 ml Enzymlyselösung ersetzt. Anschließend wurden alle Ansätze mit

Parafilm verschlossen und bei 26 °C in Dunkelheit für 15 Stunden inkubiert. Danach wurden die Proben für eine Stunde auf einen Kreisschüttler (GFL) bei ca. 30 rpm gestellt.

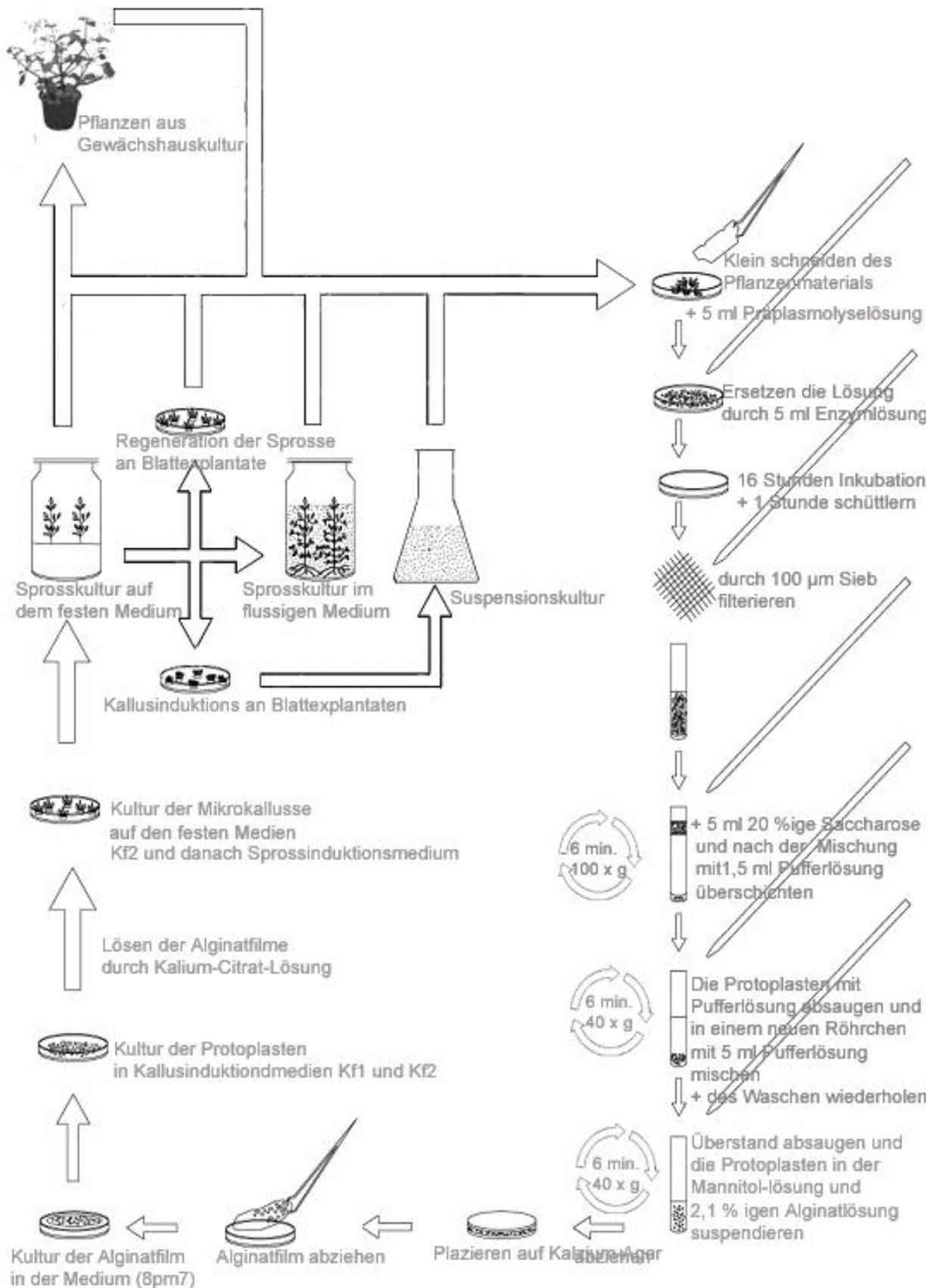
Für die Isolierung der Protoplasten wurden zuerst die Inhalte jeder Petrischale durch Polyestersiebgewebe von 100 µm in ein Glas-Zentrifugenröhrchen (98 x 16 mm, Schütt) filtriert. Dasselbe Volumen (hier 5 ml) an autoklavierter 20 %iger Saccharoselösung wurde ebenfalls durch das Siebgewebe dazugegeben. Danach wurden die Röhrchen leicht geschwenkt, damit die beiden Phasen gut miteinander vermischt wurden. Anschließend wurden die Mischungen jedes Röhrchens mit jeweils 1,5 ml Pufferlösung 1 (verändert nach GIRMEN ET AL. 1991) überschichtet. Danach wurden die Röhrchen für 6 min. bei 100 x g im Ausschwingrotor einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die intakten Protoplasten sammelten sich in der Interphase zwischen dem Enzym-Saccharose-Gemisch und der Pufferlösung 1. Diese Bande aus Protoplasten mit Pufferlösung wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pipette mit weiter (großer) Öffnung abgesaugt und in ein neues steriles Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Pufferlösung 1 aufgefüllt und mit leichtem Schwenken gemischt.

Die neuen Zentrifugenröhrchen wurden unter denselben Bedingungen, jedoch bei 40 x g (500 rpm) zentrifugiert, damit die Protoplasten pelletiert wurden. Die Überstände wurden abgesaugt. Das Pellet wurde für die Bestimmung des Titers und die Abschätzung der Vitalität in 1 ml Pufferlösung suspendiert.

Die Dichte der Protoplasten wurde mit der Hilfe einer Bürker-Türk-Zählkammer (0,04 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm, W. Schreck Optik, Hofheim) bestimmt. Von jedem Ansatz wurden ca. 0,1 ml der suspendierten Protoplasten entnommen, in die Bürker-Türk-Zählkammer gegeben und daraus die Dichte der Protoplasten in 1 ml berechnet.

Danach wurden zur jeder Protoplastensuspension 3 ml Pufferlösung 1 gegeben und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Nach dem Absaugen der Überstände wurden die Protoplasten kultiviert.

Der schematische Ablauf der Isolierung und Kultur der Protoplasten wird in der folgenden Abbildung (3.2) dargestellt:



**Abbildung 3.2:** Schematischer Ablauf der Isolierung und Kultur von Protoplasten aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien aus dem Gewächshaus und aus In-vitro-Kultur

### 3.2.10 Kultur der Protoplasten in Alginatfilm

Eine 2,1 %ige Na-Alginatlösung (Fluka, in 0,44 M Mannitol autoklaviert), 0,5 M Mannitol-Lösung und CaCl<sub>2</sub>-Agar wurden vorbereitet. Einem Liter CaCl<sub>2</sub>-Agar wurden 0,02 M CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O und 0,48 M Mannitol zugesetzt. Als Verfestigungsmittel wurden 15 g / l Agar (Serva-Agar Nr. 11396) verwendet. Nach dem Autoklavieren wurden jeweils 5 ml unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen mit 3,5 cm Durchmesser gefüllt.

Die Protoplasten wurden in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml wie folgt kultiviert:

Die sedimentierten Protoplasten wurden in einer autoklavierten Mannitol-Lösung in einer Dichte von  $3,0 \times 10^5$  / ml suspendiert und mit dem selben Volumen einer 2,1 %igen Na-Alginatlösung vorsichtig durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach wurden je 0,5 ml dieser Mischung auf CaCl<sub>2</sub>-Agar plattiert. Nach einer Stunde war das Alginat polymerisiert, so dass ein klarer Film entstand, der die Protoplasten in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml enthielt.

Der Film wurde mit Hilfe einer Pinzette vom CaCl<sub>2</sub>-Agar abgezogen und in eine 3,5 cm-Plastikpetrischale überführt, die mit 2,5 ml 8pm7-Medium gefüllt war. Danach wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei 26 °C in Dunkelheit inkubiert.

Nach fünf Tagen wurde das Medium 8pm7 gewechselt, und nach weiteren neun Tagen wurde das Medium 8pm7 durch das Kallusinduktionsmedium KF1 ersetzt. Dieses wurde wiederum nach fünf Tagen durch frisches Medium KF1 ausgetauscht und nach weiteren fünf Tagen durch das Kalluswachstumsmedium KF2 ersetzt. Danach wurde das Medium KF2 wöchentlich erneuert.

Als sich die ersten Mikrokallusse zu einer Größe von 1 mm entwickelten, wurde der Alginatfilm in eine sterile Petrischale, die 5 ml 0,2 M Kalium-Citrat-Lösung (autoklaviert) enthielt, gegeben und ca. 15 min. geschüttelt, damit der Alginatfilm durch Kalium-Citrat gelöst und die Kallusse freigesetzt wurden und absanken. Danach wurden die größeren Mikrokallusse mit Hilfe einer Pinzette auf das mit Agarose verfestigte KF2-Medium übertragen und die darüber stehende Kalium-Citrat-Alginat-Mischung abgesaugt. Die in der Petrischale verbliebenen Mikrokallusse wurden auf das gleiche Medium plattiert. Danach wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei 26 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach zwei Wochen wurden die ersten plattierten Mikrokallusse subkultiviert.

### 3.2.11 Kalluskultur

Bei jeder Subkultur wurden je 25 Kallusse in einer 3,5 cm-Plastikpetrischale auf festes KF2-Medium gelegt und bei 26 °C in Dunkelheit abgestellt. Diese wurden nach zwei Wochen auf frisches festes KF2-Medium übertragen. Als die Kallusse eine Größe zwischen 3 und 5 mm

entwickelt hatten und für die Induktion von Sprossregeneration geeignet waren, wurden sie auf das Sprossregenerationsmedium KR10 überführt. Je neun Kallusse wurden in einer Plastikpetrischale mit 3,5 cm Durchmesser auf das KR10-Medium gelegt und bei 26 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach zwei Wochen wurden die Kallusse auf frisches KR10-Medium umgesetzt. Dies wurde ein- bis zweimal wiederholt, bis bei einigen Kallussen Sprossregeneration erkennbar war.

### **3.2.12 Sprossregeneration**

Kallusse mit Sprossen wurden in 6 cm-Plastikpetrischalen auf das Regenerationsmedium (3.2.2) übertragen und bei ca.  $25\text{-}54 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  im 16-Stunden-Tag gestellt. In der ersten Woche wurden die Petrischalen durch mehrere Schichten Papiertücher bedeckt, um die Lichtintensität zu reduzieren. Diese wurden nach der ersten Woche entfernt. Nach weiteren drei Wochen, als einige regenerierte Sprosse eine Größe von 0,5 cm erreicht hatten, wurden sie von den Kallussen abgetrennt und auf hormonfreiem Sprosserhaltungsmedium 9.0 (s. 3.2.3) in 150 ml-Gläsern kultiviert und bewurzelt. Die Kallusse mit kleineren Sprossen wurden als Ganzes auf hormonfreies Medium übertragen. Die aus diesen Kallussen entstandenen Sprosse wurden nach weiteren vier Wochen vereinzelt und kultiviert.

### **3.2.13 Versuche zur Isolation und Kultur der Protoplasten von vier *Saintpaulia ionantha*-Sorten**

Aus regenerierten Sprossen (s. 3.2.8) von vier *Saintpaulia ionantha*-Sorten (s. 3.2.1) wurden wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben Protoplasten isoliert. Für jede Sorte wurden sechs Ansätze eingesetzt, und der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt. Nach der Isolierung wurden von jedem Ansatz die Proben für die Bestimmung der Anzahl der Protoplasten, der Durchmesser der Protoplasten und der Vitalität entnommen und die Werte berechnet. Danach wurden die Protoplasten in Alginatfilme (s. 3.2.10) eingebettet und im Medium 8pm7 kultiviert.

### **3.2.14 Bonituren und Auswertungen**

Die Anzahl der Protoplasten wurde mit Hilfe der Bürker-Türk-Zählkammer (0,04 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm, W. Schreck Optik, Hofheim) bestimmt. Von jedem Ansatz wurden ca. 0,1 ml der suspendierten Protoplasten genommen. Die Anzahl der Protoplasten wurde durch Mittlung der vier Werte pro Kammer berechnet.

Die Vitalität der gereinigten Protoplasten wurde wie in Kapitel 2.2.8.1 beschrieben anhand der Färbung mit Fluoreszeindiacetat (FDA, Sigma) nach WIDHOLM (1972) abgeschätzt.

$$[\%] \text{ vitale Protoplasten} = \frac{\text{Anzahl fluoreszierender Protoplasten}}{\text{gesamte Protoplastenanzahl}} \times 100$$

Zur Einschätzung der Vitalität der Protoplasten wurden die Protoplasten in fünf Gesichtsfeldern betrachtet und jeweils mindestens 100 Protoplasten bewertet, indem die Anzahl fluoreszierender Protoplasten auf die Gesamtzahl bezogen wurde.

Teilungsfrequenzen von Protoplasten wurden zweimal, 14 und 24 Tage nach der Isolierung der Protoplasten, folgendermaßen bestimmt: Unter einem Zeiss-Invers-Mikroskop IM35 bei 100facher Vergrößerung wurden bei jeder Petrischale alle eingebetteten und geteilten Protoplasten gezählt. Danach wurden durch folgende Formel die Prozentsätze der Teilung berechnet:

$$[\%] \text{ Teilungsfrequenz} = \frac{\text{Anzahl geteilter Protoplasten}}{\text{Anzahl aller Protoplasten in diesem Gesichtsfeld}} \times 100$$

Die Bonitur der aus den Kallussen regenerierten Sprosse oder Wurzeln erfolgte drei Monate nach der Protoplastenisolierung und wurde durch folgende Formel berechnet:

$$[\%] \text{ Regenerationsrate} = \frac{\text{Anzahl Kallusse mit Spross bzw. Wurzel}}{\text{Gesamte Anzahl Kallusse}} \times 100$$

Für die folgenden Versuche in den Kapiteln 3, 4 und 5 wurde ein Ansatz wie folgt definiert: Ein Ansatz bestand aus zwei bis drei Petrischalen mit verdauten Pflanzenmaterialien in Enzymlösungen, deren Protoplasten während der Isolierung nach der ersten Zentrifugierung in einem Glassröhrchen gemischt und weiter bearbeitet wurden.

Die Schwankungen der erzielten Ergebnisse zwischen den Versuchen, aber auch innerhalb eines Versuchs und innerhalb eines Isolierungsansatzes, waren so groß, dass auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde.

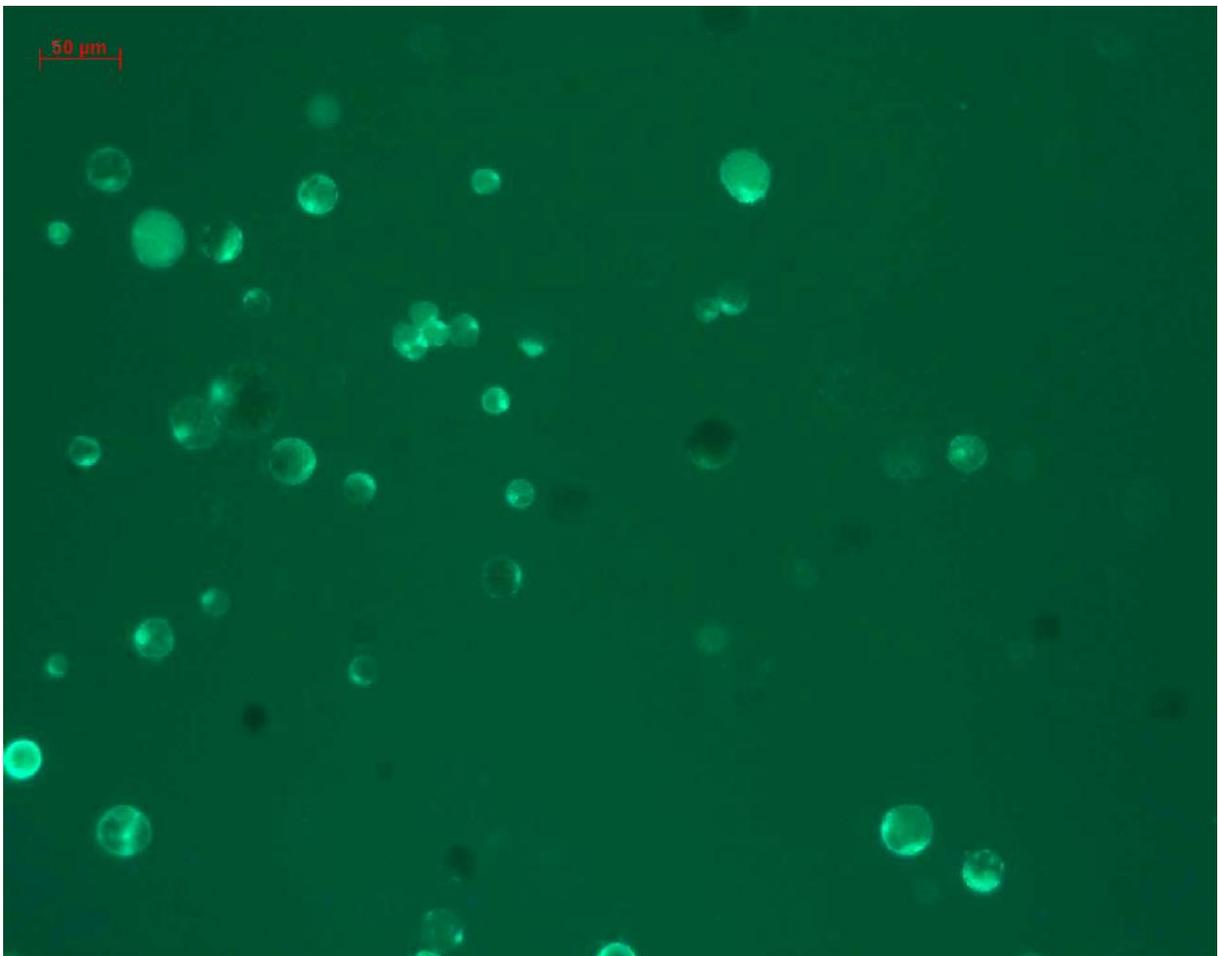
### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Isolierung der Protoplasten aus vier *Saintpaulia ionantha*-Sorten

Die regenerierten Sprosse an Blattexplantaten nach sechs Wochen Kultur in Dunkelheit (Abb. 3.1) stellten geeignetes Ausgangsmaterial dar.

Aus dem verdauten Pflanzenmaterial wurde eine Suspension von chlorophyllfreien Protoplasten gelöst, die verschiedene Durchmesser zwischen 9 und 50  $\mu\text{m}$  hatten.

Die Einschätzung der Vitalität erfolgte mittels FDA nach Reinigung der Suspensionen durch Sieben und Zentrifugieren. Die ermittelten Werte schwankten zwischen 75 und 90 % bei verschiedenen Ansätzen. Abbildung 3.3 stellt die gefärbten Protoplasten durch FDA bei der Sorte U08 dar:



**Abbildung 3.3:** Einschätzung der Vitalität von Protoplasten bei U08 (Sorte 'Claudia') mittels FDA direkt nach der Isolierung

Die Anzahl der Protoplasten pro g FG, die Vitalität und die Mittelwerte der Durchmesser der Protoplasten werden in folgender Tabelle (Tab. 3.2) dargestellt. Bei den Daten handelt es sich

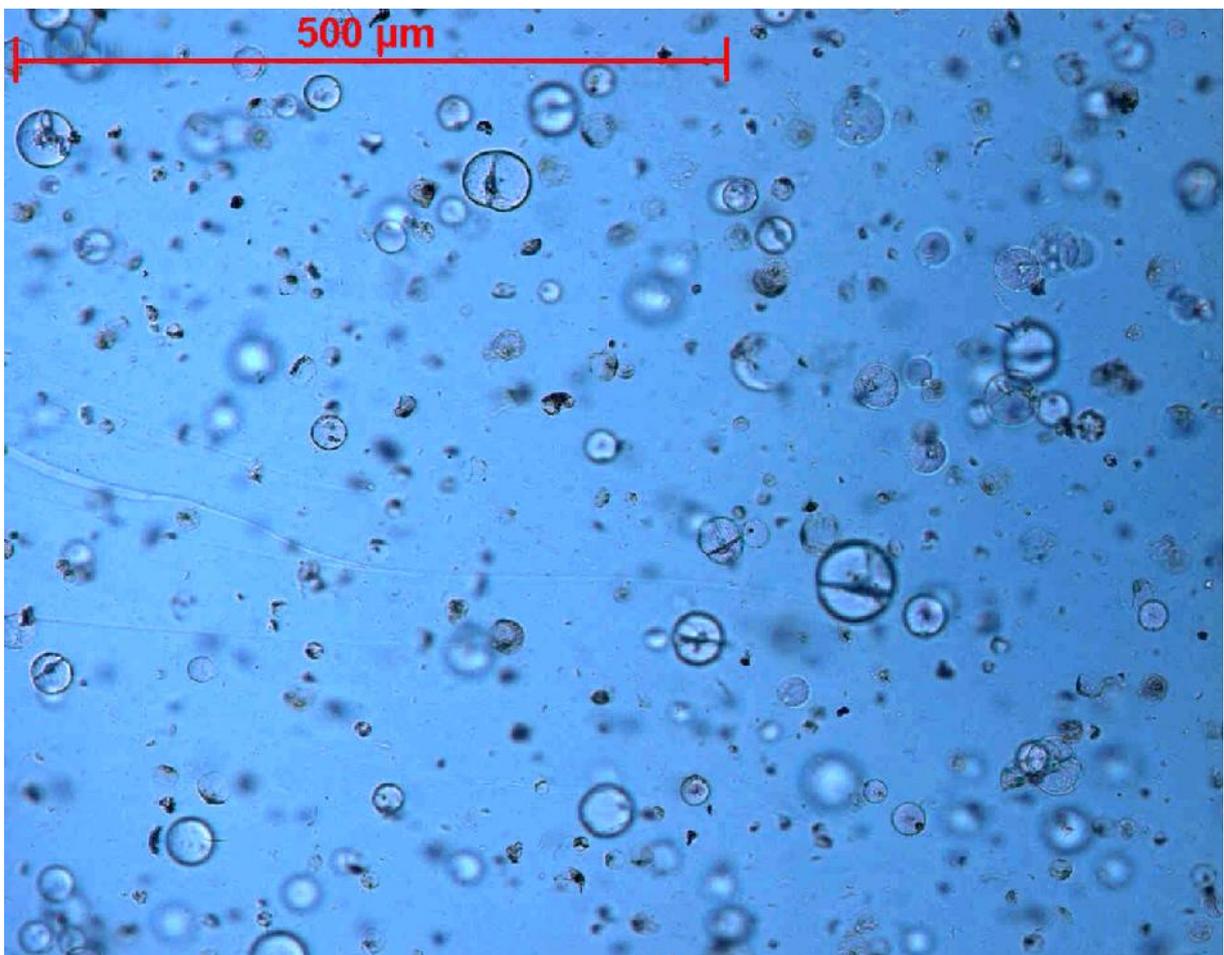
um Mittelwerte aus jeweils 12 Ansätzen aus zwei Wiederholungen.

**Tabelle 3.2:** Ergebnisse der Isolierung der Protoplasten von vier *Saintpaulia ionantha*-Sorten

Sorte	Anzahl Pps x 105 / g FG	% Vitalität	Durchmesser aus 12 Ansätze	St.Abw.
U01	5,9	83	33 µm	13,8
U03	7,6	81	34 µm	15,1
U08	10	84	32 µm	9,2
U10	5,9	83	30 µm	12,2

### 3.3.2 Kultur der Protoplasten aus vier *Saintpaulia ionantha*-Sorten

Nach neun bis zehn Tagen wurden Vergrößerung und Teilung bei in Alginat eingebetteten Protoplasten beobachtet. Dabei wurden in den Protoplasten Plasmastränge erkennbar. Die Teilung trat meistens symmetrisch auf (Abb. 3.4). Die weitere Entwicklung führte dann zu einer Gruppe von kleinen Zellen.



**Abbildung 3.4:** Teilung der Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* (U03) nach 14 Tagen

Folgende Tabelle (Tab. 3.3) stellt die Teilungsfrequenzen bei den verschiedenen *Saintpaulia ionantha*-Sorten nach 14 und 24 Tagen dar. Die Zellteilung wurde nur bei Ansätzen berechnet, in denen eine Teilung stattgefunden hatte.

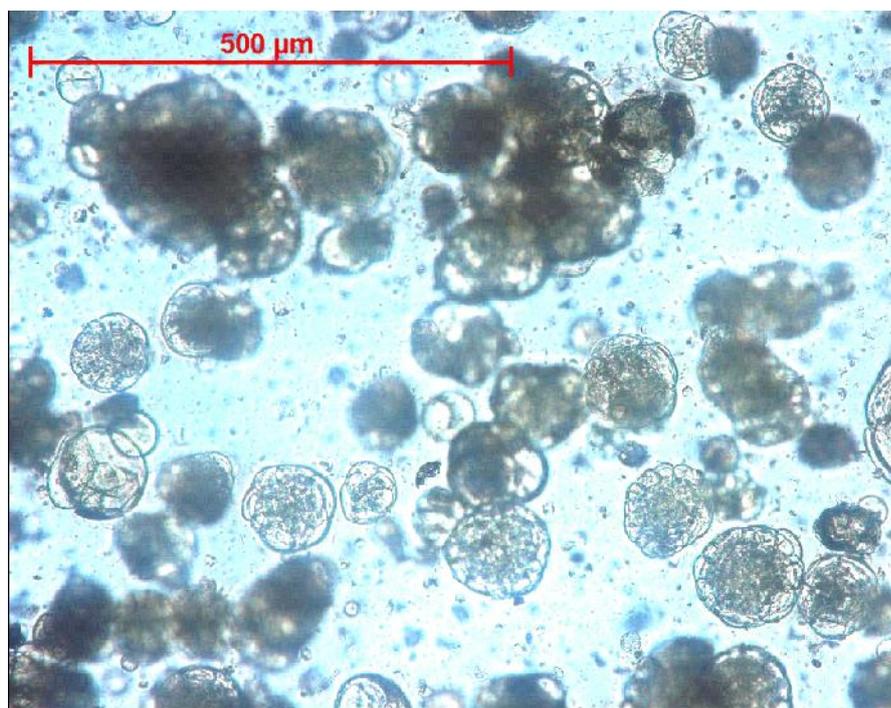
**Tabelle 3.3:** Teilungsfrequenzen der Protoplasten von vier *Saintpaulia ionantha*-Sorten zu zwei Zeitpunkten

Sorte	n	Teilungsfrequenz nach 14 Tagen	St. Abw.	Teilungsfrequenz nach 14 Tagen	St. Abw.
U01	3	3,8 %	1,7	3,2 %	1,11
U03	8	3,3 %	1,7	6,5 %	1,5
U08	5	4,8 %	2,2	5 %	1,52
U10	6	3,7 %	2	4 %	2,95

n: Anzahl der Ansätze mit Teilungen

Die Dichte der Protoplasten spielte bei der Zellteilung eine wesentliche Rolle. Besonders bei ungleichmäßiger Verteilung der Protoplasten im Alginate wurden dort, wo die Dichte niedriger war, weniger oder keine Zellteilungen beobachtet. Bei zu hoher Dichte verbräunten die Protoplasten allerdings in ihrer weiteren Entwicklung und starben ab.

Die weitere Teilung der Zellen führte zur Bildung von Mikrokallussen, die nach drei Wochen deutlich erkennbar waren. Dieser Prozess wurde durch die Absenkung der Osmolarität und die Reduzierung von Wachstumsregulatoren durch das Ersetzen des Kulturmediums 8pm7 durch das Medium KF1 nach 14 Tagen und durch das Medium KF2 nach weiteren zehn Tagen gefördert. Nach vier Wochen waren Mikrokalluse visuell in den Alginatefilmen erkennbar. Abbildung 3.5 zeigt die Mikrokalluse von U03 (Sorte 'De Eewige Lente') nach vier Wochen:



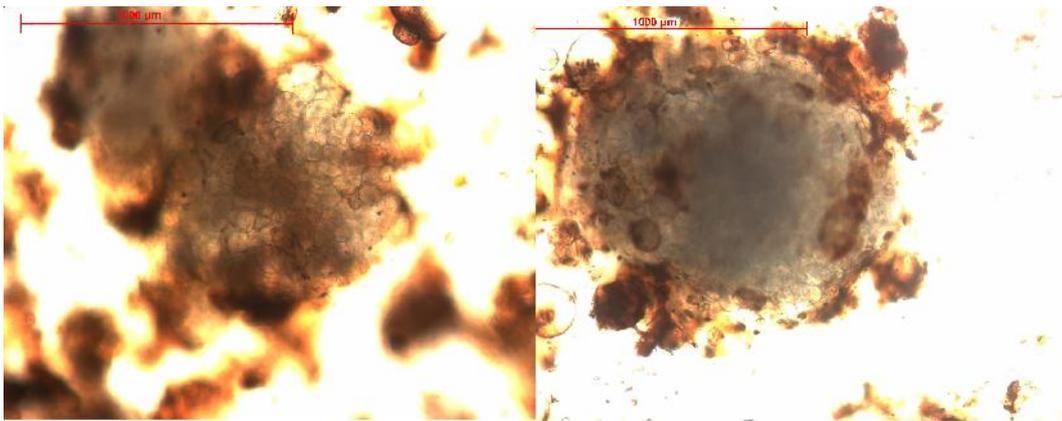
**Abbildung 3.5:** Mikrokallusbildung der Protoplasten bei U03 einen Monat nach der Protoplastenisolierung

### 3.3.3 Kalluskultur

Die Mikrokallusbildung und die Entwicklung von Zellgruppen waren bei verschiedenen Untersuchungen und Ansätzen und auch innerhalb der Ansätze und Petrischalen nicht einheitlich. Aus diesem Grund konnte nicht leicht ein geeigneter Zeitpunkt für das Auflösen der Alginatfilme in Kalium-Citrat-Lösung ermittelt werden.

Als einige Kallusse einen Durchmesser von ca. 1 mm erreicht hatten (Abb. 3.6, rechts), wurden sie mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Alginatfilm herausgelöst und auf das feste Kalluswachstumsmedium KF2 übertragen. Die Kallusse waren in diesem Stadium kugelförmig, kompakt, widerstandsfähig und schneeweiß. Die restlichen Kallusse im Alginatfilm wurden für ca. zwei weitere Wochen in frischem flüssigem Medium KF2 belassen.

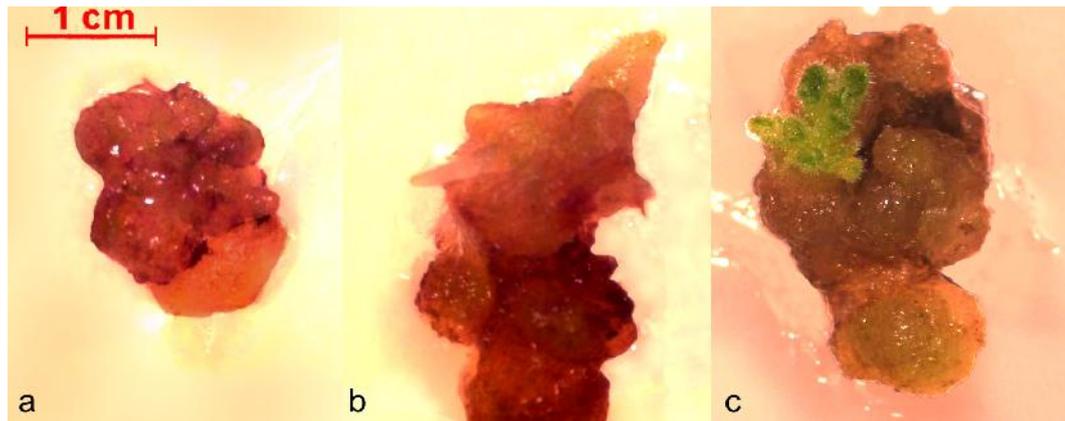
Ungefähr acht Wochen nach der Protoplastenisolierung wurden die Alginatfilme in Kalium-Citrat-Lösung aufgelöst, und von jeder Sorte wurden 25 Mikrokallusse nach dem Auswaschen mit flüssigem Medium KF2 auf festem KF2 kultiviert.



**Abbildung 3.6:** Zwei Mikrokallusse von U03 nach sechs Wochen (links) und ein Mikrokallus von U08 nach 2 Monaten Kultur (rechts) in Alginatfilm

Danach wurden die Kallusse nach je zwei Wochen auf frisches Medium KF2 umgesetzt. Dies wurde ein- bis zweimal wiederholt, bis die Kallusse eine Größe von 3-5 mm erreicht hatten. Während der Subkultur der Kallusse auf dem Kalluswachstumsmedium KF2 wurden unterschiedlich viele Wurzeln gebildet.

Anschließend wurden die Kallusse auf das Regenerationsmedium KR10 umgesetzt. Nach ein- bis zweimaligem Umsetzen auf frisches Medium wurden Sprosse auf den Kallussen erkennbar (Abb 3.7, links). Danach wurden die Kallusse auf das Sprossregenerationsmedium umgesetzt und in Schwachlichtbedingung überführt. Die Sprosse ergrünten innerhalb weniger Tage.



**Abbildung 3.7:** Ein Kallus von U03 nach zehnwöchiger Kultur auf Medium KR10 (a) und nach 12 und 15 Wochen auf Medium 9.1 (b und c)

Nach ca. vier Wochen wurden die Sprosse, die auf eine Länge zwischen 0,5 bis 1 cm herangewachsen waren, von den Kallussen abgeschnitten und zur Bewurzelung auf hormonfreiem Sprosserhaltungsmedium (9.0) kultiviert (Abb.3.8).



**Abbildung 3.8:** Aus Protoplasten regenerierte Sprosse von U08 auf hormonfreiem Sprosserhaltungsmedium 9.0

## 4 Protoplastenkultur bei *Streptocarpus*-Arten der Untergattung *Streptocarpella*

### 4.1 Einleitung

Im folgenden Kapitel werden die Versuche beschrieben, die für die Isolierung und Regeneration von Protoplasten bei *Streptocarpus*-Arten der Untergattung *Streptocarpella* durchgeführt wurden. Obwohl für eine erfolgreiche somatische Hybridisierung, die Entwicklung von Fusionsprodukten und die Erstellung einer neuen Pflanze aus zwei Fusionspartnern prinzipiell die Regeneration von einem Partner ausreicht, wurde aus den folgenden Gründen zusätzlich die Regeneration von Protoplasten bei *Streptocarpus* untersucht.

1. Wenn sich aus Protoplasten von beiden Fusionspartnern Pflanzen regenerieren lassen, sind Selektionsmaßnahmen für die Identifizierung der Heterofusionsprodukte notwendig. Diese können durch die Behandlung von Protoplasten mit Chemikalien vor der Fusion oder durch Ausnutzung bestimmter Eigenschaften der einzelnen Fusionspartner in Kallus- oder weiteren Entwicklungsstadien erreicht werden.
2. Weil *Streptocarpus* bzw. *Streptocarpella* aus zahlreichen Arten bestehen, könnten die Untersuchungen der Regeneration von Protoplasten aus dieser Gattung bzw. Untergattung darüber hinaus für die Fusion zwischen *Streptocarpus*-Arten verwendet werden, aus der neue interessante Hybriden hervorgehen könnten.

In diesem Kapitel werden Isolierung und Kultur von Protoplasten aus verschiedenem Pflanzenmaterial bei einigen ausgesuchten *Streptocarpus*-Arten beschrieben. Dabei wurde versucht, unter Optimierung der Methoden für die Isolierung und Regeneration von *Saintpaulia* ein System zu entwickeln, um zunächst Pflanzen aus Protoplasten zu regenerieren und dann die Kultur der Fusionsprodukte aus *Saintpaulia* und *Streptocarpus*-Arten zu ermöglichen.

### 4.2 Material und Methoden

#### 4.2.1 Pflanzenmaterial

Für diese Versuche wurden fünf Genotypen von *Streptocarpus*, S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*), S2 (*S. saxorum*) S3 (*S. caulescens*), S12 (*S. glandulosissimus*) und S25 (*S. caulescens* v. *pallens*) (Tab. 2.2), verwendet. Die Arten wurden, abgesehen von den gärtnerisch bzw. züchterisch interessanten Eigenschaften wie z.B. der Anzahl der Blüten, Wachstumstyp usw., auf Basis ihrer genetischen Distanz zu *Saintpaulia ionantha* ausgesucht.

Die Verwandtschaft zwischen diesen Arten mit *Saintpaulia ionantha* wurde im Phänogramm (Abb. 1.2) dargestellt.

#### **4.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Medien für die Kultur des Ausgangsmaterials**

Der pH-Wert der folgenden Medien für die Kultur des Ausgangsmaterials wurde mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf 5,7 bis 5,8 eingestellt. Anschließend wurden die Medien bei 1,1 kg / cm<sup>2</sup> Dampfdruck in einem Autoklaven bei 121 °C erhitzt

##### **4.2.2.1 Zusammensetzung und Herstellung der Regenerationsmedien für *Streptocarpus***

Das Regenerationsmedium für die *Streptocarpus*-Arten entsprach in seiner Grundzusammensetzung dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Regenerationsmedium für *Saintpaulia ionantha*, dem vor dem Autoklavieren 1 mg / l IAA und 1 mg / l BAP zugegeben wurden. Anschließend wurden jeweils 10 ml des Mediums unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser gefüllt.

##### **4.2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Sprosserhaltungsmedien für *Streptocarpus***

Das Sprosserhaltungsmedium (9.2) für *Streptocarpus* wurde wie das Medium (9.0) für *Saintpaulia ionantha* (s. 3.2.3) vorbereitet, enthielt aber zusätzlich 2 mg / l BAP und wurde einmal ohne Verfestigungsmittel und einmal mit Agar (8 g Serva-Agar) vorbereitet. Die festen Medien wurden zu je 25 ml in 250 ml-Gläser gegossen. Das flüssige Medium wurde nach dem Autoklavieren im Kühlschrank gelagert.

##### **4.2.2.3 Zusammensetzung und Herstellung des Kallusinduktionsmediums**

Das Kallusinduktionsmedium wurde nach HOSHINO ET AL. (1995) zubereitet. Einem Liter Grundmedium B5 (GAMBORG ET AL. 1968) wurden 20 g Saccharose, 0,2 g Caseinhydrolysat und 2 g / l Gelrite (Duchefa, Cat: DUC-G1101.1000) zugegeben. Zusätzlich wurde die Konzentration an Wachstumsregulatoren variiert und das Medium einmal mit 0,1 und einmal mit 0,2 mg / l 2,4-D angesetzt. Danach wurden jeweils 10 ml des Mediums unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser gefüllt.

##### **4.2.2.4 Zusammensetzung und Herstellung des Suspensionskulturmediums**

Das Suspensionsmedium wurde wie das Kallusinduktionsmedium, jedoch ohne Verfestigungsmittel und Caseinhydrolysat vorbereitet (HOSHINO ET AL. 1995).

### 4.2.3 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für Protoplasten

Zur Protoplastenkultur von *Streptocarpus*-Arten wurden zuerst die Kulturmedien von *Saintpaulia ionantha* verwendet (s. 3.2.6). Danach wurden Versuche zur Optimierung durchgeführt und anschließend weitere Kulturmedien getestet.

Für die Regeneration aus Protoplasten wurde außer den Medien, die in Kapitel 3.2.6 beschrieben wurden, noch ein Sprossregenerationsmedium hergestellt. Diese Medien wurden nur für die Protoplasten und Zellen, die aus dem Suspensionskulturmedium entstanden waren, verwendet.

Dem Medium B5 wurde 1 g / l Gelrite (Duchefa, Cat: DUC-G1101.1000) zugesetzt. Danach wurden pro Liter 0,001 mg NAA und 0,5 mg BAP zugegeben (HOSHINO ET AL. 1995). Nach Einstellung des pH-Wertes und Autoklavieren (s. 4.2.2) wurden jeweils 10 ml des Mediums in Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser gefüllt.

### 4.2.4 Kultur des pflanzlichen Ausgangsmaterials

Zur Isolation der Protoplasten von verschiedenen *Streptocarpus*-Arten wurde das Pflanzenmaterial bei einigen Versuchen zunächst wie folgt vorkultiviert:

#### 4.2.4.1 Versuche zur Sprossinduktion an In-vitro-Explantaten

Junge, unverletzte Blätter von *Streptocarpus*-Arten (s. 4.2.1) aus In-vitro-Sprosskulturen wurden wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben präpariert. Diese Explantate wurden mit der unteren Epidermis auf das in einer Petrischale befindliche Regenerationsmedium für *Streptocarpus* (s. 4.2.2) gelegt (s. 3.2.2). Für jeden der fünf Genotypen wurden 20 (2 x 10) Petrischalen mit jeweils 6-7 Explantaten eingesetzt. Die Kultur erfolgte für sechs Wochen bei 24 °C unter zwei verschiedenen Lichtbedingungen. Die Hälfte der Petrischalen wurde im 16-Stunden-Tag bei  $28 \mu \text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Variante 1), die andere Hälfte in Dunkelheit kultiviert (Variante 2). Der Versuch wurde zweimal wiederholt.

#### 4.2.4.2 In-vitro-Sprosskultur auf festem Medium

Sprosse aller fünf Genotypen mit mindestens zwei deutlich entwickelten Blättern, die an Blattexplantaten regeneriert waren (s. 4.2.1), wurden abgeschnitten und jeweils fünf von ihnen auf festen Sprosserhaltungsmedien (4.2.2.1) kultiviert. Die Kultur erfolgte bei 24 °C unter drei verschiedenen Lichtbedingungen. Ein Drittel der Gläser wurde im 16-Stunden-Tag bei  $26-28 \mu \text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Variante 1), ein Drittel bei  $7-8 \mu \text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Variante 2), der Rest in Dunkelheit kultiviert (Variante 3).

#### **4.2.4.3 In-vitro-Sprosskultur in flüssigem Medium**

Junge, unverletzte, 1-2 cm große Sprosse von fünf *Streptocarpus*-Arten (s. 4.2.1) wurden von In-vitro-Sprosskulturen abgeschnitten. Jeweils 3-4 regenerierte Sprosse wurden in 250 ml-Gläser gelegt. Danach wurden in jedes Glas 10-25 ml flüssiges Medium 9.2 (s. 4.2.2.1) zugegeben, so dass die Spitzen der Sprosse nicht in das Medium eintauchten. Die Kultur erfolgte bei 24 °C auf einem Kreisschüttler bei 40 rpm in Dunkelheit. Die Gläser wurden wöchentlich entsprechend des Wachstums der Sprosse mit frischem Medium aufgefüllt.

#### **4.2.4.4 Untersuchungen zur Suspensionskultur**

Beim ersten Versuch (A) wurden junge, unverletzte Blätter von fünf *Streptocarpus*-Arten (s. 4.2.1) aus In-vitro-Sprosskulturen wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben präpariert. Die Explantate wurden mit der unteren Epidermis auf das in einer Petrischale befindliche Kallusinduktionsmedium (s. 4.2.2.2) gelegt. Für jeden der fünf Genotypen wurden 10 Petrischalen mit jeweils 6 Explantaten eingesetzt. Die Kultur erfolgte bei 24 °C in Dunkelheit. Bei zweitem Versuch (B) wurde dieselben Behandlungen mit einem Medium mit der doppelten Konzentration des Wachstumsregulators (0,2 mg / l 2,4-D) durchgeführt. Nach acht Wochen wurden die an den Blattexplantaten regenerierten weichen Kallusse von einigen Genotypen (S1, S3 und S12) abgenommen und jeweils 1 g in mehrere 100 ml-Erlenmeyerkolben, die 40 ml Suspensionsmedium enthielten, eingewogen (4.2.2.3). Die Erlenmeyerkolben wurden mit steriler Alufolie geschlossen und in Dunkelheit auf einen Kreisschüttler bei 100 rpm und 24 °C gestellt. Während der Kultur wurden die Kallusse aus den Erlenmeyerkolben alle 10 Tage gewogen und geteilt (HOSHINO ET AL. 1995). Je ein Gramm von jedem im Erlenmeyerkolben gewonnenen Kallus wurde in frischem Medium weiter subkultiviert.

Weiterhin wurden Teile der Kallusse von jedem Genotyp in fünf Petrischalen, die festes Sprossinduktionsmedium enthielten (s. 4.2.3.1), gelegt und in Dunkelheit inkubiert. Der Versuch wurde zweimal wiederholt.

#### **4.2.4.5 Untersuchungen zur Meristemkultur**

Während der Protoplastenkultur von *S. glandulosissimus* (S12) zeigte sich, dass die isolierten Protoplasten ständig durch Bildung von braunen Bakterienkolonien kontaminiert wurden. Es wurde festgestellt, dass ein Organismus, der keine Symptome an den Pflanzen im Gewächshaus oder In-vitro-Sprosskulturen zeigte, bei Kultur im Protoplastenkulturmedium zur Kontamination der Protoplasten führte. Daher wurden die Versuche zur Meristemkultur

wie folgt durchgeführt:

Junge, unverletzte, ca. 3 cm lange Triebspitzen von S12 aus dem Gewächshaus wurden wie unter 2.2.13.1 beschrieben oberflächensterilisiert. Danach wurden sie an der Werkbank unter sterilen Bedingungen mit einem Zeiss-Stereomikroskop-Stemi-DV4 präpariert, ihre Blätter entnommen und mehrere Schichten von den Blattprimordien mit einem Skalpell abgeschnitten, und die verbliebene Sprossspitze mit einem Durchmesser von ca. 0,5 mm auf das Regenerationsmedium für *Streptocarpus* (mit auf 0,1 mg / l IAA und 0,1 mg / l BAP reduzierten Phytohormonen) aufgelegt. In den fünf Petrischalen wurden jeweils drei Explantate ausgelegt. Anschließend wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei 24 °C im 16-Stunden-Tag bei ca. 25-54  $\mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  kultiviert.

Während der Präparation wurden die Bestecke regelmäßig gewechselt, um die Verbreitung der Kontamination zu verhindern.

Ein ähnlicher Versuch wurde mit den Pflanzen aus In-vitro-Sprosskulturen durchgeführt. Vom ersten Versuch unterschied er sich darin, dass auf die Oberflächensterilisation verzichtet wurde.

Nach zwei Monaten wurden Sprosse, die sich aus den Explantaten entwickelt hatten, auf zehn Petrischalen mit dem hormonfreien Sprossregenerationsmedium umgesetzt und verklont. Nach weiteren zwei Monaten wurden in einem Versuch mit zwei Wiederholungen von jedem Klon zwei Proben für die Protoplastenisolation entnommen. Danach wurden die Protoplasten aus der Sprossachse der Pflanzen wie in den Kapiteln 3.2.8 und 3.2.9 beschrieben isoliert und in Alginatfilmen kultiviert. Zwei Wochen nach der Isolierung der Protoplasten wurden die Petrischalen auf Kontaminationen überprüft.

#### 4.2.5 Untersuchung zur Optimierung der Enzymlösung

Zur Optimierung der Enzymlösung wurden drei Kombinationen von Cellulase und Macerozyme an unterschiedlichen Pflanzenorganen verschiedener Genotypen getestet.

Die Konzentrationen der Bestandteile der Enzymlösungen werden in der folgenden Tabelle (Tab. 4.1) dargestellt:

**Tabelle 4.1:** Kombination von Cellulase und Macerozyme in den untersuchten Enzymlösungen

	% Cellulase	% Macerozyme
<b>EI</b>	2,0	0,5
<b>EII</b>	2,0	1,0
<b>EIII</b>	3,0	1,0

In diesem Versuch wurden verschiedene Pflanzenorgane wie Blätter, Stängel und Sprosse (unter Licht und in Dunkelheit herangezogen) aus fünf Genotypen (*Streptocarpus* S1, S2, S3,

S12 und S25) mit drei Enzymlösungen behandelt, wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben isoliert und die Ausbeute der gewonnenen Protoplasten verglichen. Nur bei S12 und S25 wurde die Isolierung aus Sprossen, die in Dunkelheit kultiviert worden waren, nicht durchgeführt, da kein geeignetes Pflanzenmaterial vorhanden war. Der Versuch wurde in vier Wiederholungen durchgeführt.

#### **4.2.6 Untersuchung zur Isolierung von Protoplasten aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien**

Bei allen folgenden Versuchen wurde die Enzymlösung EII (2 % Cellulase und 1 % Macerozyme) verwendet.

##### **4.2.6.1 Isolierung der Protoplasten aus Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus**

Hier wurden zwei Versuche mit jeweils zwei Wiederholungen und zwei Ansätzen bei jeder Wiederholung durchgeführt. Beim ersten Versuch wurden 0,5 g junge, unverletzte Blätter, Stängel und Blüten von drei *Streptocarpus*-Arten (S1, S2 und S12) aus dem Gewächshaus entnommen und wie unter 2.2.12.1 beschrieben oberflächensterilisiert. Danach wurde die untere Epidermis der Blätter mit einem Skalpell verletzt und mit Hilfe einer Pinzette abgezogen (BHOJWANI UND RAZDAN 1996). Danach wurde das Pflanzenmaterial in Präplasmolyselösung klein geschnitten und nach einer Stunde mit Enzymlösung verdaut. Anschließend wurden die Protoplasten wie unter Kapitel 3.2.9 beschrieben isoliert. Bei jeder Variante wurden zwei Ansätze verwendet.

Beim zweiten Versuch wurde die Epidermis der Blätter ebenfalls nach der Oberflächensterilisation entfernt. Danach wurde sie ohne Präplasmolysebehandlung in Enzymlösung getaucht und klein geschnitten. Anschließend wurde sie für 5-8 min. unter Vakuum gestellt, bis keine Luftblasen mehr aus den Blättern aufstiegen. Danach wurden die Protoplasten wie im ersten Versuch isoliert.

##### **4.2.6.2 Isolierung der Protoplasten aus In-vitro-Sprosskulturen**

Für die Isolierung der Protoplasten aus In-vitro-Sprosskulturen wurden fünf Versuche mit jeweils zwei Wiederholungen und zwei Ansätzen bei jeder Wiederholung durchgeführt.

Beim ersten Versuch wurden 0,5 g junge, nicht verletzte Blätter und Stängel von fünf *Streptocarpus*-Arten (s. 4.2.1) aus In-vitro-Sprosskulturen, die bei  $26-28 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und auf festem Medium kultiviert worden waren (s. 4.2.4.2), in eine Petrischale eingewogen und die Protoplasten wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben isoliert.

Beim zweiten Versuch wurden die Blätter ohne Präplasmolysebehandlung in Enzymlösung getaucht, klein geschnitten und wie in Kapitel 4.2.6.1 beschrieben für 5-8 min. unter Vakuum gestellt und weiter bearbeitet.

Beim dritten und vierten Versuch wurde die Isolation der Protoplasten wie im ersten Versuch durchgeführt, aber als Pflanzenmaterial wurden die Pflanzen verwendet, die bei  $8 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und in Dunkelheit kultiviert worden waren (s. 4.2.4.2). Beim fünften Versuch wurden dicke, weiß-gelbe (nicht dunkelgrüne) Blätter und Stängel von *Streptocarpus*-Arten aus dem flüssigen Medium entnommen und bei jedem Ansatz 1 g Blattmaterial oder 0,5 g Stängelmateriale verwendet.

Beim zweiten Versuch wurde nur eine Variante (Blätter) angesetzt, bei den anderen Versuchen wurden zwei Varianten (Blätter und Stängel) in jeweils zwei Ansätzen angewendet. Die Inkubation der Proben und die Isolierung der Protoplasten wurden wie unter Kapitel 3.2.8 beschrieben durchgeführt.

#### **4.2.6.3 Isolierung der Protoplasten aus regenerierten, jungen Sprossen**

In diesem Versuch wurden junge Sprosse von *Streptocarpus*-Arten (s. 4.2.1), die an Blattexplantaten in Dunkelheit und unter Licht regeneriert worden waren, verwendet. Alle weiteren Abläufe zur Isolierung der Protoplasten erfolgten wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben.

#### **4.2.6.4 Isolierung der Protoplasten aus Suspensionskultur**

Vier Tage nach der Subkultur wurden die Suspensionen von S3 und S12 durch Siebe mit 800  $\mu\text{m}$  gegeben und jeweils 0,5 g der Zellen in Petrischalen mit 6 cm Durchmesser eingewogen. Danach wurden jeder Petrischale 5 ml Enzymlösung zugegeben. Anschließend wurden die Petrischalen für vier Stunden auf einem Kreisschüttler (GFL) bei 30 rpm in Dunkelheit inkubiert. Alle weiteren Abläufe zur Isolierung der Protoplasten erfolgten wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben.

#### **4.2.7 Untersuchung zur Kultur der Protoplasten**

Für die Kultur der Protoplasten wurden folgende Versuche durchgeführt:

##### **4.2.7.1 Untersuchung zur Optimierung des Kulturmediums**

Während der ersten Versuche wurden Teilungen bei den Protoplastenkulturen aus regenerierten Sprossen auf Blattexplantaten von S1 und S3 beobachtet. Jedoch waren die Teilungsfrequenzen sehr niedrig, so dass sich die geteilten Zellen nicht bis zur Bildung von Kallussen entwickeln konnten. Dies zeigt, dass das unter 3.2.6 beschriebene Kulturmedium

für *Saintpaulia ionantha* für *Streptocarpus*-Arten wahrscheinlich nicht geeignet war. Deswegen wurden zur Optimierung des Mediums 8pm7 (s. Tab. 4.2) folgende Chemikalien im Kulturmedium variiert:

**Tabelle 4.2:** Das variierte Kulturmedium

<b>8pm7-a</b>	Verdoppelung der Auxinkonzentration (2 mg / l NAA)
<b>8pm7-b</b>	Ersetzung von $\text{NH}_4\text{NO}_3$ durch $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O})$ *
<b>8pm7-ac</b>	Verdopplung der Auxinkonzentration (2 mg NAA) und Verdopplung von $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (1200 mg / l) **

\* nach GROSSER UND GMITTER 1990

\*\* nach BHOJWANI UND RAZDAN 1996

In zwei Versuchen mit jeweils zwei Wiederholungen wurden die Protoplasten von *Streptocarpus* aus Stängeln (S25 und S12) und Sprossen (S1 und S3) isoliert und wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben in 3,5 cm-Plastikpetrischalen, die jeweils 2,5 ml des variierten Mediums (Tab. 4.2) enthielten, kultiviert. Beim ersten Versuch wurden das Medium mit Verdopplung der NAA-Konzentration (8pm7-a) und das Medium mit Ersetzung von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  durch  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)$  (8pm7-b) überprüft und mit 8pm7 verglichen. Beim zweiten Versuch wurde das Medium mit Verdopplung von  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (8pm7-ac) getestet und das Medium 8pm7-a als Kontrolle verwendet.

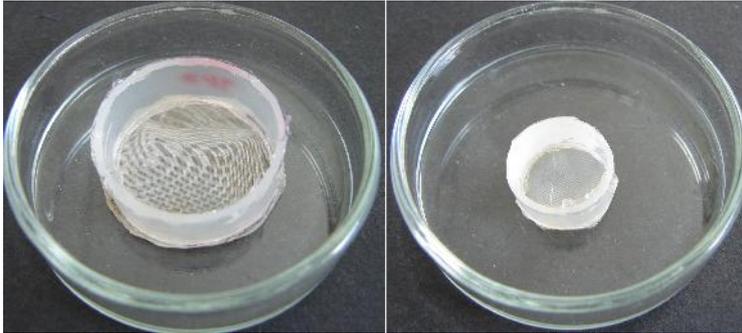
Danach wurden die Petrischalen wie in 3.2.10 beschrieben kultiviert.

#### 4.2.7.2 Untersuchung zur Kultur der Protoplasten im flüssigen Medium und Optimierung der Osmolarität

Weil bei der Kultur der Protoplasten in flüssigem Medium besonders für die Zellteilung ein optimaler osmotischer Druck des Mediums wichtig ist (BHOJWANI UND RAZDAN 1996), wurde die Wirkung der Osmolarität auf die Protoplasten in zwei Versuchen überprüft.

Beim ersten Versuch wurden sedimentierte Protoplasten von drei *Streptocarpus*-Arten (S3, S12 und S25) nach Isolierung und Reinigung im Medium 8pm7 mit verschiedenen Osmolaritäten zwischen 400, 450, 500, 550, 600 und 650 mOsmol / kg  $\text{H}_2\text{O}$  kultiviert. Die Variationen der Osmolarität in den Medien wurden durch die Zugabe von Saccharose gesteuert. Danach wurden täglich die Durchmesser der Protoplasten beobachtet.

Um eine Dichte der Protoplasten von  $1,5 \times 10^5$  / ml im Medium zu erreichen und das Wechseln des Mediums zu ermöglichen, wurden die Protoplasten in Gefäßen mit Durchmessern von 1 oder 2 cm, deren Böden aus 5  $\mu\text{m}$  Siebegewebe bestanden, kultiviert. Diese Gefäße wurden in Petrischalen mit 3,5 cm Durchmesser gelegt (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1:** Die Gefäße für die Kultur der Protoplasten im flüssigen Medium.

#### 4.2.7.3 Kultur der Protoplasten in Alginatfilmen

Außer den Protoplasten aus den Versuchen 4.2.6.4 (Isolierung der Protoplasten aus Suspensionskultur) und 4.2.7.2 (Untersuchung zur Kultur der Protoplasten im flüssigen Medium und Optimierung der Osmolarität) wurden die isolierten Protoplasten von *Streptocarpus*-Arten aus verschiedenen Versuchen wie in 3.2.9 beschrieben in Alginatfilmen kultiviert.

#### 4.2.7.4 Untersuchungen zu „feeder cell layer“

Zuerst wurden die Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Nicotiana tabacum* (Blätter) wie in Kapitel 3.2.8 und 3.2.9 beschrieben isoliert und in Alginatfilmen kultiviert.

Die Teilung der Protoplasten von *Nicotiana tabacum* und *Saintpaulia ionantha* wurde nach vier bis fünf bzw. nach 13 bis 14 Tagen beobachtet. Danach wurden die Protoplasten von vier *Streptocarpus*-Genotypen mit denselben Methoden isoliert und jeweils mit zwei verschiedenen Dichten ( $100 / \text{ml}$  und  $1,5 \times 10^5 / \text{ml}$ ) in Alginatfilme eingebettet. Dabei wurden die von S12 und S25 auf dem festen Medium bei  $26\text{-}28 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  angezogenen Stängel und die von S1 und S2 auf Blattexplantaten in Dunkelheit regenerierten Sprosse als Ausgangsmaterial verwendet. Die Alginatfilme mit *Streptocarpus*-Protoplasten wurden in Petrischalen, die sich teilende Protoplastenkulturen von *Saintpaulia ionantha* und *Nicotiana tabacum* enthielten, überführt. Die Protoplasten von *Streptocarpus* wurden in zwei Varianten jeweils auf oder unter die aktiven Protoplasten von *Saintpaulia* und Tabak gelegt. Für jede Variante wurden zwei Petrischalen angesetzt. Die Versuche wurden in zwei Wiederholungen durchgeführt.

#### 4.2.8 Kalluskultur

Nach der Entwicklung der Mikrokallose wurden die Alginatfilme wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben durch  $0,2 \text{ M}$  Kalium-Citrat-Lösung gelöst und die Mikrokallose auf das mit Agarose verfestigte KF2-Medium übertragen. Bei der Subkultur wurden je 14 Kallose in

eine Plastikpetrischale mit 3,5 cm Durchmesser auf das feste KF2-Medium gelegt. Die weitere Kultur der Kallusse erfolgte wie im vorherigen Kapitel (3.2.10) beschrieben.

**4.2.9 Untersuchungen zur Optimierung des Sprossregenerationsmediums**

Beim ersten Versuch wurde das Medium BNE9 (mit Reduzierung von NH<sub>4</sub>OH auf 0,3 g / l und Saccharose auf 50 g / l) mit verschiedenen Zusätzen wie in folgender Tabelle dargestellt (Tab. 4.3) hergestellt:

**Tabelle 4.3:** Die Zusätze [mg / l] zum Sprossregenerationsmedium für Kallusse aus Protoplasten von *Streptocarpus*-Arten

Variante	IAA	NAA	BAP	2ip	TDZ	Zeatin	Kin.	MT	AS	AgNO <sub>3</sub>
A	0,5		4							
B		0,05			1					
C	0,5			4				2		
D	0,5			4						
E		0,5		2					7	
F <sub>1</sub>		5	5							3
F <sub>2</sub>			3			1				
G	1					4				
H	1						4			
I <sub>1</sub>		0,5	0,5							
I <sub>2</sub>		0,01	5							

Die pH-Werte der Medien wurden mit 0,1 M KOH bzw. HCl auf 5,8 eingestellt.

Um die Karamellisierung der Zucker in den Medien zu verhindern, wurden sie nicht autoklaviert, sondern nach Vorbereitung der Medien unter sterilen Bedingungen an der Werkbank filtersterilisiert. Als Verfestigungsmittel wurde zuerst 3 %ige autoklavierte Agarose im Wasserbad bei 70 °C verflüssigt. Danach wurden 2,5 VT des Mediums mit 1 VT Agarose gemischt. Anschließend wurden jeweils 10 ml unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser gefüllt.

Beim zweiten Versuch wurde das Medium B5 mit verschiedenen Zutaten wie in Tabelle dargestellt (Tab. 4.3) vorbereitet. Der pH-Wert der Medien wurde nach Zugabe von 30 g / l Saccharose und 8 g / l Plant-Agar auf 5,8 eingestellt. Anschließend wurden die Medien für 20 min. in einem Autoklaven bei 121 °C erhitzt und jeweils 10 ml unter sterilen Bedingungen in Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser gefüllt.

Zur Durchführung der Versuche wurden die Kallusse von S1 und S3 auf das in Petrischalen befindliche Sprossregenerationsmedium gelegt. Für jede Variante A, B, C, D, E, F<sub>1</sub>, G, H und I<sub>1</sub> wurden fünf Petrischalen mit jeweils sechs Kallussen angesetzt. Die Kultur erfolgte bei 24 °C in Dunkelheit.

Bei der Variante F wurden die Kallusse der Variante F<sub>1</sub> nach AKASAKA-AKENNEDY ET AL. (2005) nach einer Woche auf das Medium F<sub>2</sub> überführt, bei Variante I wurden die Kallusse nach zwei Wochen vom Medium I<sub>1</sub> auf das Medium I<sub>2</sub> transportiert. Die Kallusse von allen Varianten wurden nach sechs Wochen auf frische Medien derselben Zusammensetzung subkultiviert.

Beide Versuche wurden in zwei Wiederholungen durchgeführt.

#### **4.2.10 Bestimmung der Vitalität der Protoplasten**

Die Vitalität der Protoplasten wurde wie in Kapitel 2.2.8.1 beschrieben mit Hilfe der Färbung mit Fluoreszeindiacetat abgeschätzt. Dabei wurden je Probe zu 0,1 ml gereinigter Protoplastensuspension 5-10 µl einer 0,25igen FDA-Lösung in DMSO (Serva) (WIDHOLM 1972) zugegeben. Die Lebensfähigkeit wurde in fünf Gesichtsfeldern an jeweils ca. 100 Protoplasten ermittelt, indem die Anzahl fluoreszierender Protoplasten auf die Gesamtzahl bezogen wurde.

#### **4.2.11 Bonituren und Auswertungen**

Die Regenerationsrate wurde aus der Anzahl der Explantate mit Sprossen mal 100 geteilt durch die Anzahl der sterilen Explantate errechnet.

$$\% \text{ Regenerationsrate} = \frac{\text{Anzahl Explantate mit Sprossen}}{\text{Anzahl steriler Explantate}} \times 100$$

Die mittlere Anzahl der regenerierten Sprosse wurde aus der Summe aller Sprosse dividiert durch die Anzahl der Explantate mit Sprossen errechnet.

$$\text{mittl. Anzahl Sprosse je reg. Explantat} = \frac{\Sigma \text{ aller Sprosse}}{\text{Anzahl Explantate mit Sprossen}}$$

Um die Sprossbildung der Explantate zu untersuchen, wurde eine Kombination der Regenerationsraten und der mittleren Anzahl regenerierter Sprosse je Explantat (Regenerationsintensität) errechnet, damit die beiden Messwerte kombiniert betrachtet werden konnten.

$$\text{Regenerationsintensität} = \frac{\text{Regenerationsrate} \times \text{mittl. Anzahl Sprosse je Explantat}}{100}$$

Die Berechnungen der Anzahl der Protoplasten, der Teilungsfrequenzen und der Vitalität der Protoplasten wurden wie in Kapitel 3.2.14 beschrieben durchgeführt.

Die Bonitur der an den Explantaten regenerierten Kallusse erfolgte nach zwei Monaten. Zur Auswertung wurde die Anzahl von Explantaten mit regenerierten Kallussen durch die Gesamtzahl der Explantate geteilt und mit 100 multipliziert.

$$[\%]Kallusbildung = \frac{\text{Anzahl Explantate mit Kallussen}}{\text{Gesamte Explantate}} \times 100$$

#### 4.2.12 Statistische Auswertungen

Die Daten von beiden Wiederholungen des Versuchs zu den Explantaten wurden anhand einer zweifaktoriellen Anlage analysiert. Dabei wurden die Lichtbedingungen als erster Faktor in zwei Stufen (Licht und Dunkelheit) und die *Streptocarpus*-Arten als zweiter Faktor in fünf Stufen (S1, S2, S3, S12 und S25) angenommen. Danach wurde ein Globaltest durchgeführt, und anschließend wurden die Varianten mit Hilfe eines Tukey-Tests verglichen.

Bei den anderen Versuchen wurde wegen der großen Schwankungen der erzielten Ergebnisse zwischen den Versuchen, innerhalb der Versuche und sogar innerhalb eines Ansatzes auf statistische Auswertungen verzichtet

### 4.3 Ergebnisse

#### 4.3.1 Kultur des Ausgangsmaterials für die Protoplastenisolierung

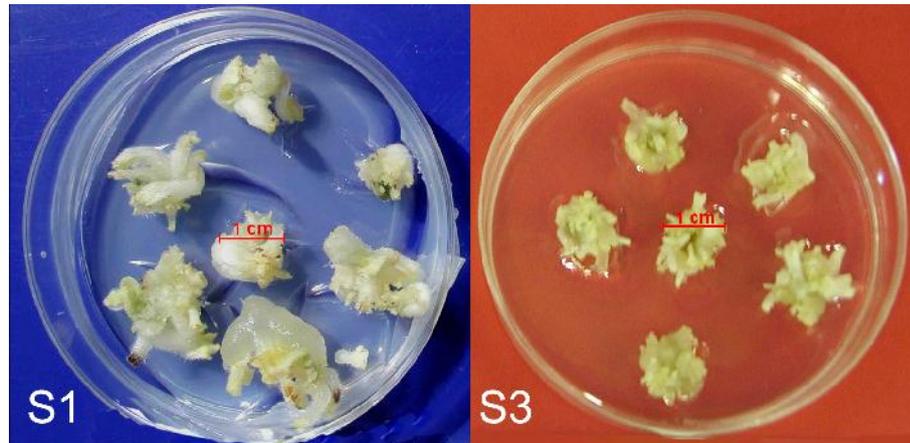
##### 4.3.1.1 Versuche zur Gewinnung von In-vitro-Explantaten

Die an Blattexplantaten nach sechs Wochen Kultur regenerierten Sprosse (Abb. 4.2) zeigten, dass bei Kultur im Licht (Variante 1) alle fünf *Streptocarpus*-Arten zahlreiche Sprosse bilden konnten.



**Abbildung 4.2:** Sprossregeneration an Blattexplantaten von S1 (links) und S3 (rechts) unter Licht nach 6 Wochen

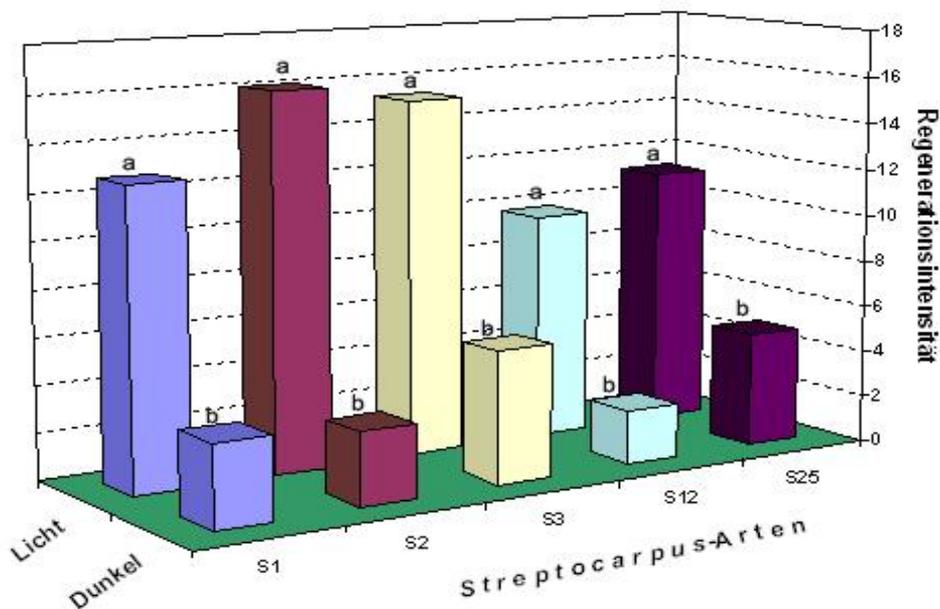
Im Vergleich dazu bildeten die Explantate von der Versuchsvariante in der Dunkelheit (Variante 2) schwach wachsende Sprosse in geringer Qualität und Anzahl (Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3:** Sprossregeneration an Blattexplantaten von S3 (links) und S1 (rechts) in Dunkelheit nach 6 Wochen (in 5,5 cm Petrischalen)

S12 und S25 wiesen starke Verbräunungen auf. Bei S1, S2 und S3 waren die regenerierten Sprosse zu 80 % hyperhydriert und durchscheinend. Daher waren sie zumeist nicht für die Protoplastenisolation geeignet.

Die zweifaktorielle Analyse ergab mit einem p-Wert von 0,0001 einen signifikanten Unterschied bezüglich der Lichtbehandlung bei allen Genotypen. Folgende Abbildung stellt einen Vergleich der Regenerationsintensität von fünf *Streptocarpus*-Arten unter Licht und in Dunkelheit dar (Abb. 4.4):



**Abbildung 4.4:** Vergleich der Regenerationsintensität von fünf *Streptocarpus*-Arten bei Kultur unter Licht und in Dunkelheit. Bei allen Arten wurden signifikante Unterschiede bei Kultur unter Licht und in Dunkelheit nachgewiesen.

#### 4.3.1.2 In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium

Die in Dunkelheit kultivierten Pflanzen waren nach sechs Wochen stark verbräunt und konnten meist nicht als Ausgangsmaterial verwendet werden. Die unter niedrigerer Lichtintensität (500 Lux) kultivierten Pflanzen waren jedoch in einem besseren Zustand. Obwohl kleine braune Flecken auf den Blättern festgestellt wurden, waren die Gewebe im Vergleich zu den unter hoher Lichtintensität kultivierten Pflanzen weicher. Die Internodien dieser Pflanzen waren länger und boten mehr Frischmasse als Ausgangsmaterial für die Protoplastenisolation.

#### 4.3.1.3 In-vitro-Sprosskultur im flüssigen Medium

Die Pflanzen von allen fünf Genotypen zeigten schnelles Wachstum im flüssigen Medium, so dass sie nach zwei oder drei Wochen für die Protoplastenisolierung verwendet werden konnten. Die Internodien der Pflanzen waren lang, die Blätter und Blattstiele groß, verdickt und hellgrün (Abb. 4.5). Dagegen zeigten die Stängel harte Strukturen, während die Stängel von auf festem Medium kultivierten Pflanzen, besonders die unter niedriger Lichtintensität oder in Dunkelheit kultivierten, relativ weiche Gewebestrukturen aufgewiesen hatten.

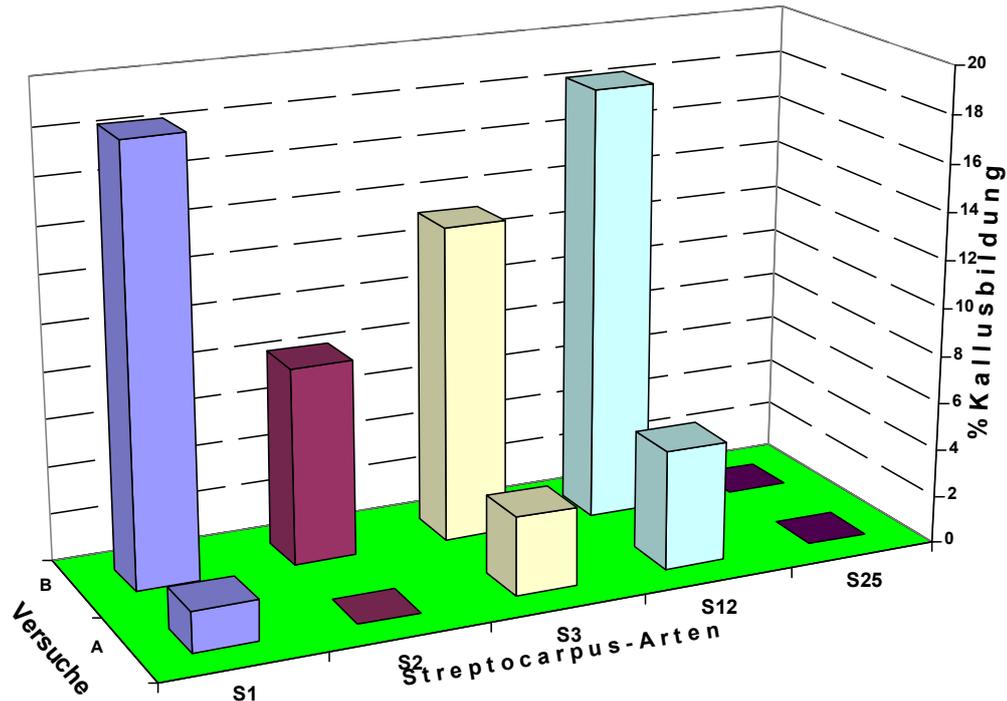


**Abbildung 4.5:** Erscheinungsbild von Sprossen bei Kultur im flüssigen Medium von drei *Streptocarpus*-Arten, die in Dunkelheit kultiviert wurden.

Die Erhaltung von Sprossen im flüssigen Medium für längere Zeit (z.B. mehr als vier Wochen) führte zu Verbräunungen und hyperhydrierten und somit nicht für Protoplastenisolierungen geeigneten Blättern. Daher musste die Kultur alle drei Wochen erneut mit Sprossen von Festmedien aufgebaut werden.

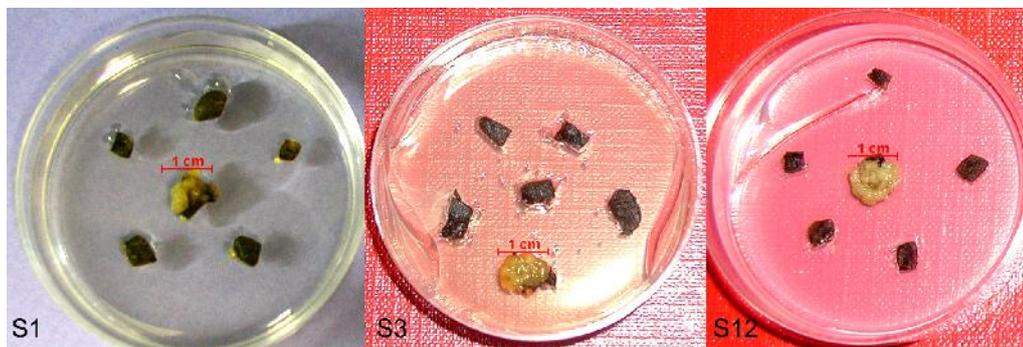
#### 4.3.1.4 Untersuchungen zur Kallusinduktion für die Suspensionskultur

Die Kallusbildung an Blattexplantaten von verschiedenen Genotypen auf den Explantaten aus zwei Versuchen in jeweils zwei Wiederholungen wird in folgender Grafik (Abb. 4.6) dargestellt:



**Abbildung 4.6:** Kallusbildung an Explantaten von fünf *Streptocarpus*-Arten auf dem Kallusinduktionsmedium B5 mit zwei 2,4-D-Konzentrationen: A: 0,1 mg / l und B: 0,2 mg / l

Laut der in Abb. 4.6 gezeigten Ergebnisse wurden an Explantaten von S25 keine Kallusse gebildet. Bei anderen Genotypen wurde deutlich, dass das Medium mit 0,2 mg / l 2,4-D-Konzentration (Var. B) eine bessere Kallusbildung zur Folge hatte, besonders bei S2, da von diesem Genotyp nur an Explantaten auf dem Medium B Kallusse zu sehen waren (Abb. 4.6). Hinsichtlich Qualität und Menge der Kallusse (an einzelnen Blattexplantaten) wurden keine Unterschiede zwischen den Varianten A und B nachgewiesen; Qualität und Ausbeute wechselten sich bei verschiedenen Explantaten aus beiden Versuchen ab. Bei den Genotypen S1 und S2 waren die Kallusse auf allen Explantaten leicht bis deutlich verbräunt.



**Abbildung 4.7:** Kallusbildung auf Explantaten von zwei *Streptocarpus*-Arten auf dem Kallusinduktionsmedium mit 0,2 mg / l 2,4-D (Variante B)

Nach Überführung der Kallusse in das flüssige Medium wurde festgestellt, dass nur die weißen Kallusse für weitere Versuche geeignet waren (Abb.4.7: S3 und S12) und dunklere Kallusse im flüssigen Medium kein weiteres Wachstum erkennen ließen (Abb. 4.7: S1). Nach zehn Tagen Kultur im flüssigen Medium stieg die Frischmasse der Zellen von 1 g auf 4,2 g (S12) und 3,5 g (S3) an.

#### **4.3.1.5 Untersuchungen zur Meristemkultur**

Nach der Meristemkultur stand neues In-vitro-Material als Ausgangsmaterial zur Verfügung, das überwiegend zu sterilen Protoplastenkulturen führte.

Die visuelle Betrachtung der isolierten Protoplasten unter dem Mikroskop zeigte, dass alle Proben, die aus In-vitro-Sprosskulturen stammten, kontaminiert waren. Nach zwei Wochen konnte die Bildung brauner Bakterienkolonien in den Petrischalen beobachtet werden. Jedoch wiesen die Protoplasten, die aus Gewächshausmaterial stammten, zu 80 % keine Kontamination auf.

#### **4.3.2 Untersuchung zur Optimierung der Enzymlösung bei verschiedenen Pflanzenmaterialien**

Um einen Vergleich zwischen den drei Enzymlösungen aussagekräftig darstellen zu können, wurde die Anzahl der gewonnenen Protoplasten pro Gramm pflanzlicher Frischmasse berechnet (Tab. 4.4). In der Tabelle ist deutlich zu erkennen, dass die Ausbeute bei allen Genotypen bezüglich der verschiedenen Enzymlösungen und Pflanzenorgane sehr unterschiedlich war.

Insgesamt war bei allen Arten und Pflanzengewebe die niedrigste Anzahl der Protoplasten nach Inkubation in EI (1 % Cellulase und 0,5 % Macerozyme) zu verzeichnen. Jedoch war die Ausbeute bei EII (2 % Cellulase und 1 % Macerozyme) und EIII (3 % Cellulase und 1 % Macerozyme) für die verschiedenen Pflanzengewebe und die einzelnen *Streptocarpus*-Arten unterschiedlich. Einige Genotypen erbrachten beispielsweise bei Blättern (S3 und S25), Stängeln (S2, S12, und S25) und Sprossen (S1, S2 und S25) durch EII eine höhere Protoplastenanzahl als durch EIII, dagegen war die Ausbeute aus Blättern bei S1, S2 und S12 oder aus Sprossen bei S3 und S25 bei EIII höher als bei EII.

Um eine für alle fünf *Streptocarpus*-Arten relativ gut geeignete Konzentration von Cellulase und Macerozyme in der Enzymlösung auszuwählen, wurden die Mittelwerte der Anzahlen gewonnener Protoplasten aus den fünf Genotypen bei jedem Pflanzenmaterial berechnet und in Abbildung 4.8 zusammengefasst.

**Tabelle 4.4:** Ausbeute von Protoplasten aus verschiedenen Pflanzenmaterialien von fünf *Streptocarpus*-Arten durch drei verschiedene Enzymlösungen

Art	EI								EII								EIII							
	Blätter		Stängel		Sprosse (L)		Sprosse (D)		Blätter		Stängel		Sprosse (L)		Sprosse (D)		Blätter		Stängel		Sprosse (L)		Sprosse (D)	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
<b>S1</b>	0,05 x 10 <sup>5</sup>	0,04 x 10 <sup>5</sup>	0,61 x 10 <sup>5</sup>	0,35 x 10 <sup>5</sup>	1,21 x 10 <sup>5</sup>	0,70 x 10 <sup>5</sup>	1,35 x 10 <sup>5</sup>	0,75 x 10 <sup>5</sup>	0,09 x 10 <sup>5</sup>	0,17 x 10 <sup>5</sup>	1,40 x 10 <sup>5</sup>	0,45 x 10 <sup>5</sup>	1,48 x 10 <sup>5</sup>	1,00 x 10 <sup>5</sup>	3,70 x 10 <sup>5</sup>	2,20 x 10 <sup>5</sup>	0,01 x 10 <sup>5</sup>	0,16 x 10 <sup>5</sup>	1,50 x 10 <sup>5</sup>	0,78 x 10 <sup>5</sup>	1,55 x 10 <sup>5</sup>	0,83 x 10 <sup>5</sup>	2,81 x 10 <sup>5</sup>	1,12 x 10 <sup>5</sup>
<b>S2</b>	0,00 x 10 <sup>5</sup>	0,00 x 10 <sup>5</sup>	0,07 x 10 <sup>5</sup>	0,12 x 10 <sup>5</sup>	0,21 x 10 <sup>5</sup>	0,17 x 10 <sup>5</sup>	0,22 x 10 <sup>5</sup>	0,09 x 10 <sup>5</sup>	0,08 x 10 <sup>5</sup>	0,11 x 10 <sup>5</sup>	1,50 x 10 <sup>5</sup>	0,50 x 10 <sup>5</sup>	1,11 x 10 <sup>5</sup>	0,95 x 10 <sup>5</sup>	1,63 x 10 <sup>5</sup>	0,95 x 10 <sup>5</sup>	0,08 x 10 <sup>5</sup>	0,06 x 10 <sup>5</sup>	1,45 x 10 <sup>5</sup>	0,64 x 10 <sup>5</sup>	1,20 x 10 <sup>5</sup>	0,17 x 10 <sup>5</sup>	0,75 x 10 <sup>5</sup>	0,50 x 10 <sup>5</sup>
<b>S3</b>	0,06 x 10 <sup>5</sup>	0,12 x 10 <sup>5</sup>	0,79 x 10 <sup>5</sup>	0,51 x 10 <sup>5</sup>	0,18 x 10 <sup>5</sup>	0,11 x 10 <sup>5</sup>	0,25 x 10 <sup>5</sup>	0,15 x 10 <sup>5</sup>	0,83 x 10 <sup>5</sup>	0,22 x 10 <sup>5</sup>	1,80 x 10 <sup>5</sup>	0,85 x 10 <sup>5</sup>	1,44 x 10 <sup>5</sup>	0,73 x 10 <sup>5</sup>	1,85 x 10 <sup>5</sup>	1,75 x 10 <sup>5</sup>	0,73 x 10 <sup>5</sup>	0,21 x 10 <sup>5</sup>	1,69 x 10 <sup>5</sup>	0,94 x 10 <sup>5</sup>	1,92 x 10 <sup>5</sup>	0,87 x 10 <sup>5</sup>	2,30 x 10 <sup>5</sup>	1,60 x 10 <sup>5</sup>
<b>S12</b>	0,16 x 10 <sup>5</sup>	0,12 x 10 <sup>5</sup>	1,80 x 10 <sup>5</sup>	0,82 x 10 <sup>5</sup>	0,45 x 10 <sup>5</sup>	0,30 x 10 <sup>5</sup>			0,86 x 10 <sup>5</sup>	0,45 x 10 <sup>5</sup>	3,92 x 10 <sup>5</sup>	2,10 x 10 <sup>5</sup>	0,80 x 10 <sup>5</sup>	0,25 x 10 <sup>5</sup>			0,93 x 10 <sup>5</sup>	0,75 x 10 <sup>5</sup>	3,81 x 10 <sup>5</sup>	0,88 x 10 <sup>5</sup>	0,95 x 10 <sup>5</sup>	0,62 x 10 <sup>5</sup>		
<b>S25</b>	0,75 x 10 <sup>5</sup>	0,35 x 10 <sup>5</sup>	3,05 x 10 <sup>5</sup>	1,80 x 10 <sup>5</sup>	0,92 x 10 <sup>5</sup>	0,52 x 10 <sup>5</sup>			1,02 x 10 <sup>5</sup>	0,76 x 10 <sup>5</sup>	3,65 x 10 <sup>5</sup>	1,45 x 10 <sup>5</sup>	2,52 x 10 <sup>5</sup>	1,40 x 10 <sup>5</sup>			1,15 x 10 <sup>5</sup>	0,61 x 10 <sup>5</sup>	3,44 x 10 <sup>5</sup>	0,93 x 10 <sup>5</sup>	2,00 x 10 <sup>5</sup>	0,62 x 10 <sup>5</sup>		

EI: 2 % Cellulase, 0,5 % Macerozyme

EII: 2 % Cellulase, 1 % Macerozyme

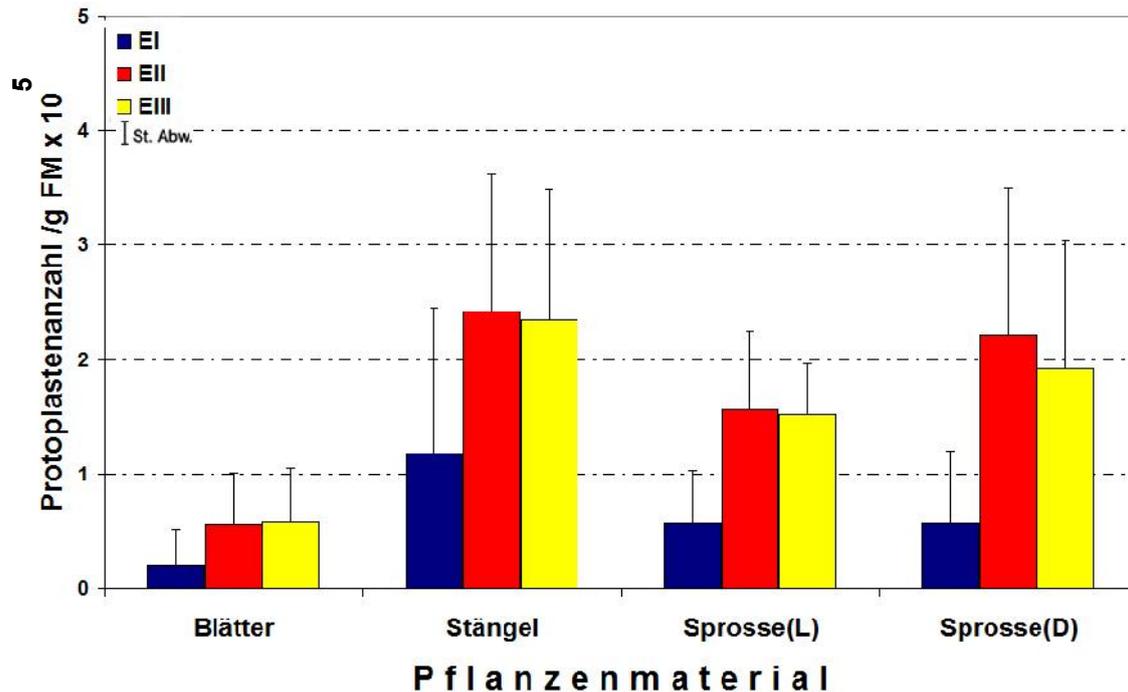
EIII: 3 % Cellulase, 1 % Macerozyme

X: Mittelwert

S: Standardabweichung

Sprosse (L): an Blattexplantaten bei 26-28  $\mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  frisch regenerierte Sprosse

Sprosse (D): an Blattexplantaten in Dunkelheit frisch regenerierte Sprosse



**Abbildung 4.8:** Ausbeute an Protoplasten durch drei verschiedene Enzymlösungen aus verschiedenen Pflanzenorganen von fünf *Streptocarpus*-Arten

Abbildung 4.8 zeigt, dass die Freisetzung von Protoplasten bei *Streptocarpus*-Arten durch EII (1 % Cellulase und 1 % Macerozyme) insgesamt am höchsten war. Damit ließen sich je nach Ausgangsmaterial zwischen  $0,6-2,2 \times 10^5$  Ppl. / g FM gewinnen. Diese Kombination wurde für die weiteren Versuche verwendet.

#### 4.3.3 Untersuchungen zum für Protoplastenisolationen geeigneten Pflanzenmaterial

Um geeignetes Pflanzenmaterial, das zahlreiche Protoplasten von *Streptocarpus*-Arten zur Verfügung stellen konnte, zu finden, wurden verschiedene Pflanzenorgane aus dem Gewächshaus und aus In-vitro-Kultur untersucht.

Die Isolation der Protoplasten aus Blütenblättern zeigte, dass sich die Farbe der Blütenblätter von *Streptocarpus*-Arten nach einer Stunde in der Präplasmolyse von dunkel-violett zu braun änderte, und auch die Protoplasten nach der Isolierung verbräunten.

Tabelle 4.5 stellt die mittlere Anzahl der Protoplasten je Gramm Frischmasse von Blättern, die aus dem Gewächshaus stammten, dar. Bei Genotyp S2 ließen sich aus Blättern keine Protoplasten isolieren. Bei den anderen Arten konnte Vakuum-Behandlung die Anzahl der Protoplasten leicht erhöhen. Beim Genotyp S1 wurde die Anzahl der Protoplasten durch Vakuum verdoppelt ( $0,1 \times 10^5$  / g FM), die Ausbeute bei S3 stieg durch Vakuum von  $0,03 \times$

$10^5$  / g FM auf  $0,15 \times 10^5$  / g FM. Auch bei zwei weiteren Arten S12 und S25 wurde die Protoplastenanzahl durch Vakuum von  $0,19 \times 10^5$  / g FM auf  $0,25 \times 10^5$  / g FM und  $0,35 \times 10^5$  / g FM erhöht.

Die höchste Anzahl an Protoplasten wurde aus Blattmesophyllgewebe von S25 ( $0,35 \times 10^5$  / g FM) mit Vakuum-Behandlung freigesetzt.

**Tabelle 4.5:** Ausbeute an Protoplasten aus Blättern von fünf *Streptocarpus*-Arten, die aus dem Gewächshaus entnommen wurden

Art	Anzahl der Ansätze	mit Vakuum		ohne Vakuum	
		X $\times 10^5$	S $\times 10^5$	X $\times 10^5$	S $\times 10^5$
S1	8	0,10	0,10	0,05	0,02
S2	8	0,00	0,00	0,00	0,00
S3	8	0,15	0,10	0,09	0,04
S12	8	0,25	0,09	0,19	0,06
S25	8	0,35	0,19	0,19	0,08

Die Anzahl der Protoplasten aus Stängeln von im Gewächshaus kultivierten Pflanzen wird in Tabelle 4.6 dargestellt:

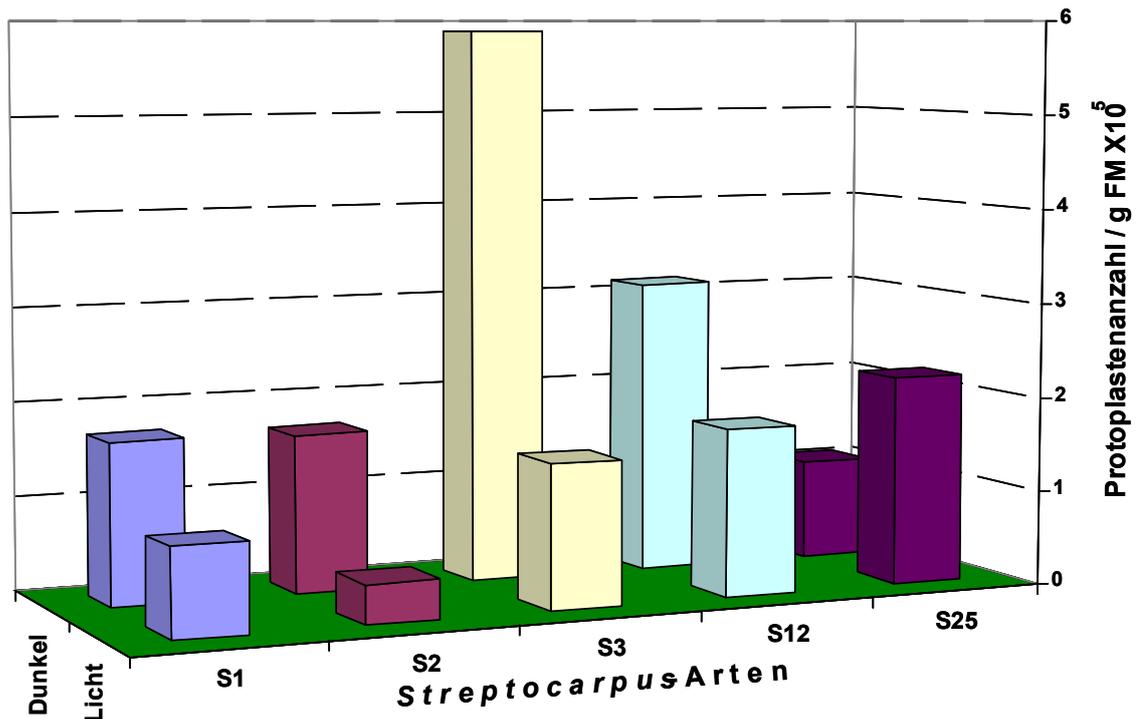
**Tabelle 4.6:** Ausbeute an Protoplasten aus Stängeln von drei *Streptocarpus*-Arten, die aus dem Gewächshaus entnommen wurden

Arte	Anzahl der Ansätze	X $\times 10^5$	S $\times 10^5$
S1	8	0,14	0,13
S2	8	0,14	0,10
S3	8	1,77	1,10

Tabelle 4.6 zeigt, dass aus dem Genotyp S3 die höchste Anzahl von Protoplasten ( $1,8 \times 10^5$  / g FM) freigesetzt wurde, während die Ausbeute aus den Stängeln bei zwei weiteren Genotypen niedriger und fast einheitlich war ( $0,14 \times 10^5$  / g FM). Die Ergebnisse aus den Tabellen 4.5 und 4.6 zeigen, dass die Freisetzung von Protoplasten aus den Pflanzenmaterialien vom Gewächshaus sehr niedrig und für eine Protoplastenkultur nicht ausreichend war.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Freisetzung von Protoplasten aus Pflanzenmaterial aus In-vitro-Kultur im Vergleich zu Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus höher war.

Abbildung 4.9 und Tabelle 9.7 stellen die Anzahl der Protoplasten, die aus Sprossen von fünf *Streptocarpus*-Genotypen gewonnen wurden, dar.

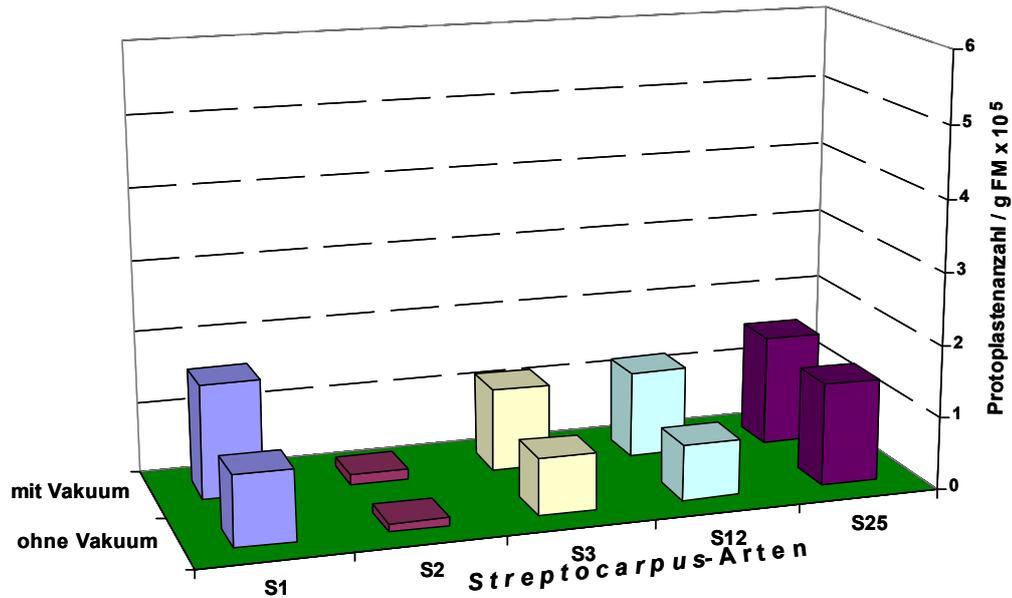


**Abbildung 4.9:** Vergleich der Ausbeute von Protoplasten aus regenerierten Sprossen bei fünf *Streptocarpus*-Arten nach sechswöchiger Kultur unter Licht oder in Dunkelheit.

In Abbildung 4.9 ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Protoplasten von vier Genotypen aus in Dunkelheit regenerierten Sprossen höher war als bei den unter Licht regenerierten Sprossen. Die Ausbeute von Protoplasten aus den in Dunkelheit regenerierten Sprossen war bei S3 mit  $5,9 \times 10^5 / \text{g FM}$  am höchsten, gefolgt von S12 mit  $3,1 \times 10^5 / \text{g FM}$  und S1 mit  $1,7 \times 10^5 / \text{g FM}$  und an vierter Stelle S2 mit  $1,6 \times 10^5 / \text{g FM}$ . Jedoch wurden bei *S. caulescens* v. *pallens* (S25) mehr Protoplasten ( $2,2 \times 10^5 / \text{g FM}$ ) aus unter Licht regenerierten Sprossen gewonnen.

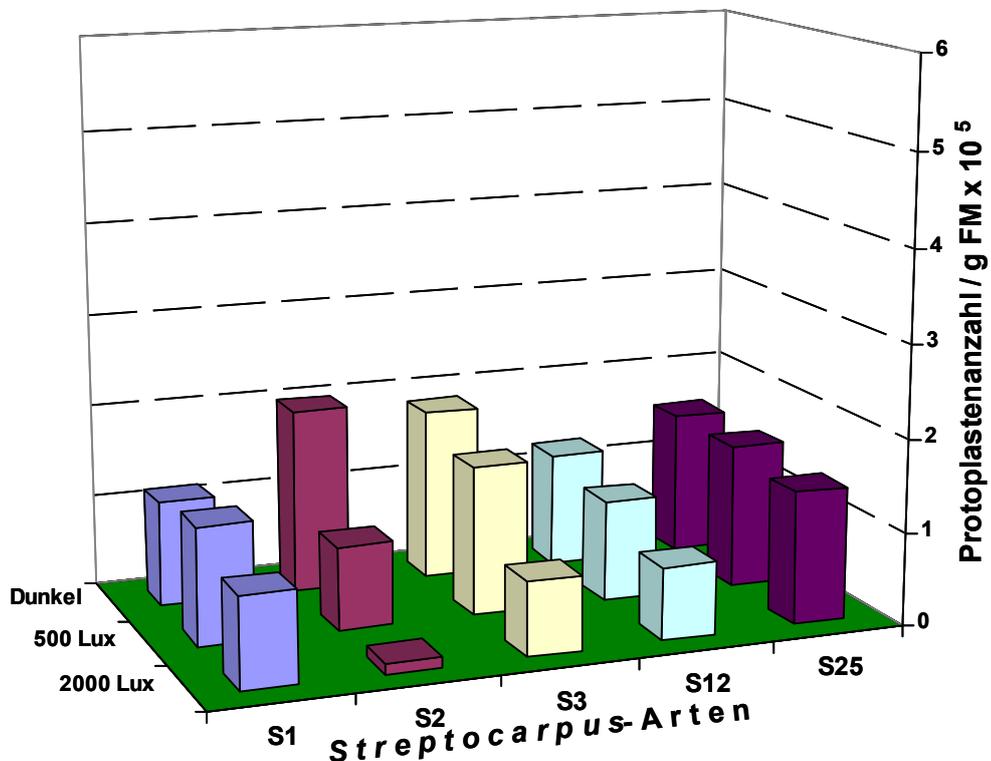
Bei weiteren Untersuchungen wurde die mittlere Anzahl der aus Blättern und Stängeln von In-vitro-Sprosskulturen auf dem festen Medium (s. 4.3.1.2) gewonnenen Protoplasten berechnet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Anzahl der Protoplasten durch Anwendung von Vakuum deutlich erhöht wurde (Abb. 4.10, Tab. 9.8). Jedoch war der Einfluss des Vakuums auf die Ausbeute bei den verschiedenen Genotypen unterschiedlich.

Genotyp S1 erbrachte beispielsweise mit  $1,6 \times 10^5$  Protoplasten / g Frischmasse die höchste Protoplastenausbeute bei Anlegen eines Vakuums. Genotyp S25 hatte bei beiden Verfahren eine hohe Ausbeute. Die Genotypen S3 und S12 zeigten mit Vakuum eine relativ hohe Protoplastenanzahl ( $1,2 \times 10^5 / \text{g FM}$ ). Dagegen war die Anzahl von Protoplasten bei S2 nicht durch Vakuum beeinflusst (wie auch bei den Blättern aus dem Gewächshaus) und von den getesteten Genotypen am niedrigsten.



**Abbildung 4.10:** Ausbeute von Protoplasten aus Blättern von fünf *Streptocarpus*-Arten, die aus In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium entnommen wurden

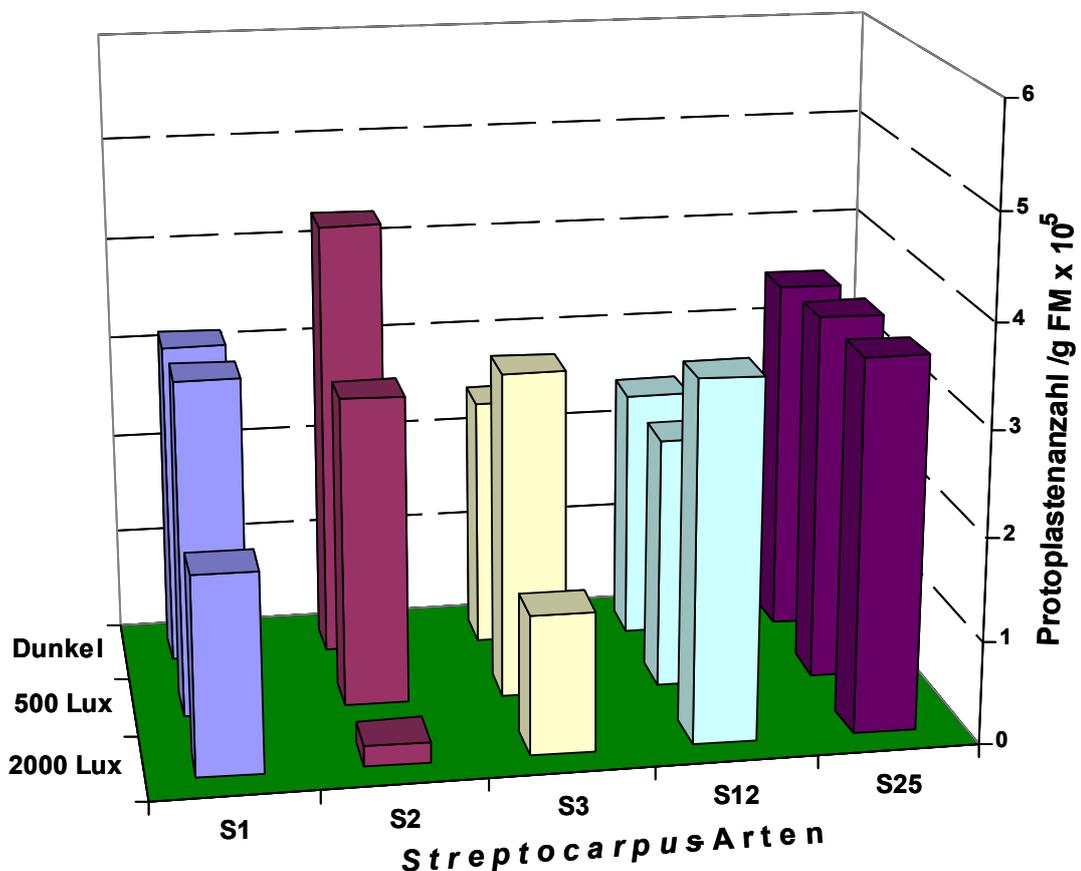
Anschließend wurde ein weiterer Vergleich zur Ausbeute von Protoplasten aus Blättern von In-vitro-Sprosskulturen, die unter verschiedener Lichtintensität kultiviert worden waren, durchgeführt (Abb. 4.11, Tab. 9.9):



**Abbildung 4.11:** Ausbeute von Protoplasten aus Blättern von fünf *Streptocarpus*-Arten, die unter verschiedenen Lichtbedingungen herangewachsen waren

Abbildung 4.11 zeigt deutlich, dass die mittlere Anzahl der je Gramm Blattmaterial gewonnenen Protoplasten bei den meisten Genotypen bei in Dunkelheit kultivierten Pflanzen am höchsten war. An zweiter Stelle folgen die Varianten, die unter 500 Lux kultiviert worden waren. Jedoch galt dies nicht für alle Genotypen gleichermaßen; bei S25 war der Einfluss der Lichtbedingungen relativ gering.

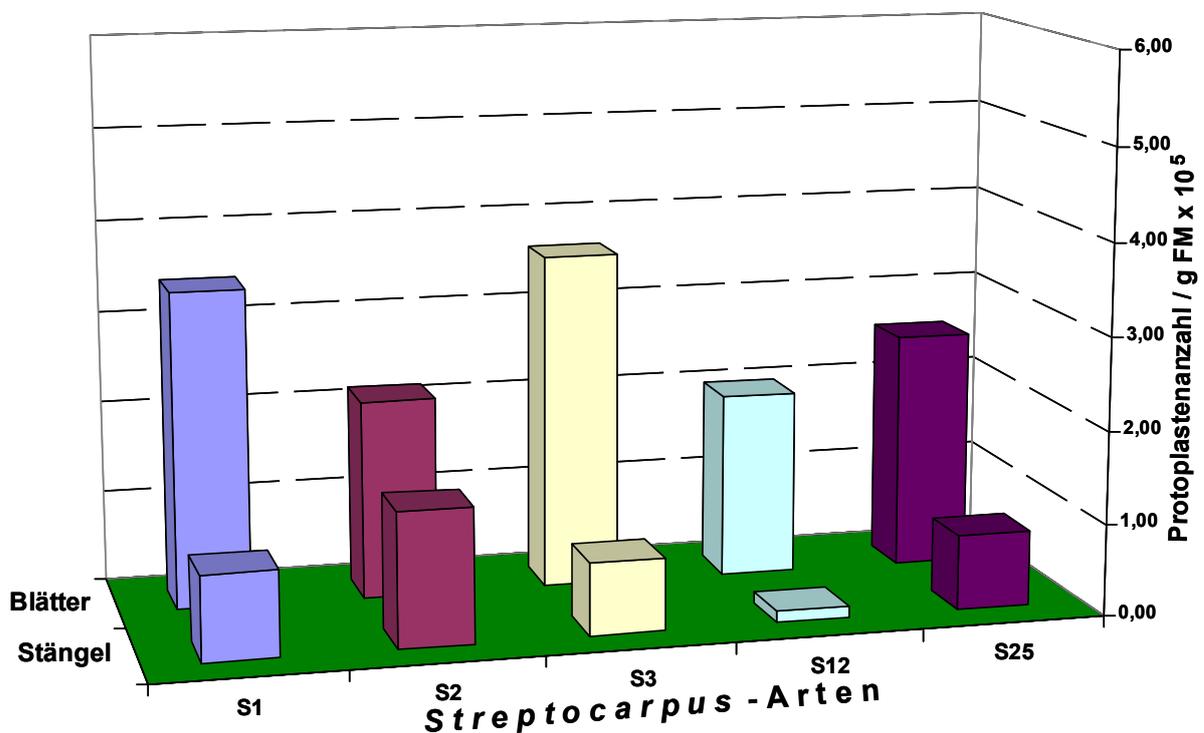
Die Anzahl der Protoplasten, die aus Stängeln, die unter unterschiedlichen Lichtbedingungen angezogen worden waren, gewonnen wurden, fiel für verschiedene *Streptocarpus*-Arten, wie aus Abbildung 4.12 und Tabelle 9.10 ersichtlich, sehr widersprüchlich aus. Beim Genotyp S2 wurde die Anzahl der Protoplasten durch Reduzierung des Lichts von 28 auf  $8 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  während der Kultur von  $0,2 \times 10^5 / \text{g FM}$  auf  $3 \times 10^5 / \text{g FM}$  erhöht, und aus den in Dunkelheit angezogenen Stängeln wurden  $4,3 \times 10^5 / \text{g FM}$  Protoplasten freigesetzt. Dagegen wurde bei S12 die höchste Ausbeute ( $3,5 \times 10^5 / \text{g FM}$ ) aus Stängeln gewonnen, die unter  $28 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  kultiviert worden waren. Auch bei S25 war bei Reduzierung des Lichtes während der Kultur eine leichte Abnahme der Anzahl von Protoplasten zu beobachten. Die Kultur von Pflanzen unter 500 Lux hatte bei S1 ( $3,3 \times 10^5 / \text{g FM}$ ) und S3 ( $3,2 \times 10^5 / \text{g FM}$ ) die höchste Anzahl von Protoplasten erbracht.



**Abbildung 4.12:** Protoplastenausbeute von fünf *Streptocarpus*-Arten aus Stängeln, die unter verschiedenen Lichtbedingungen herangewachsen waren

Die Ergebnisse der Protoplastenisolierungen aus In-vitro-Sprosskultur im flüssigen Medium sind in Abbildung 4.13 und Tab. 9.11 zu sehen.

Insgesamt wurden eindeutig mehr Protoplasten aus Blättern gewonnen als aus Stängeln. S3 erbrachte mit  $3,6 \times 10^5$  die höchste Ausbeute, gefolgt von S1 mit  $3,4 \times 10^5$  und S2 mit  $2,2 \times 10^5$  und an vierter und fünfter Stelle S12 und S25 mit  $2 \times 10^5$  Protoplasten / Gramm Frischmasse von Blättern. Im Gegensatz zu den auf dem festen Medium unter  $28 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  kultivierten Pflanzen (Abb.4.13) wurde die niedrigste Anzahl an Protoplasten aus Stängeln bei S12 ( $0,12 \times 10^5 / \text{g FM}$ ) freigesetzt (Abb. 4.13).



**Abbildung 4.13:** Ausbeute von Protoplasten aus Blättern und Stängeln von fünf *Streptocarpus*-Arten nach dreiwöchiger Kultur im flüssigen Medium in Dunkelheit

Die Isolierung der Protoplasten aus den Suspensionskulturen von S3 und S12 erbrachte eine hohe Anzahl von Protoplasten ( $160 \times 10^5 / \text{g FM}$ ).

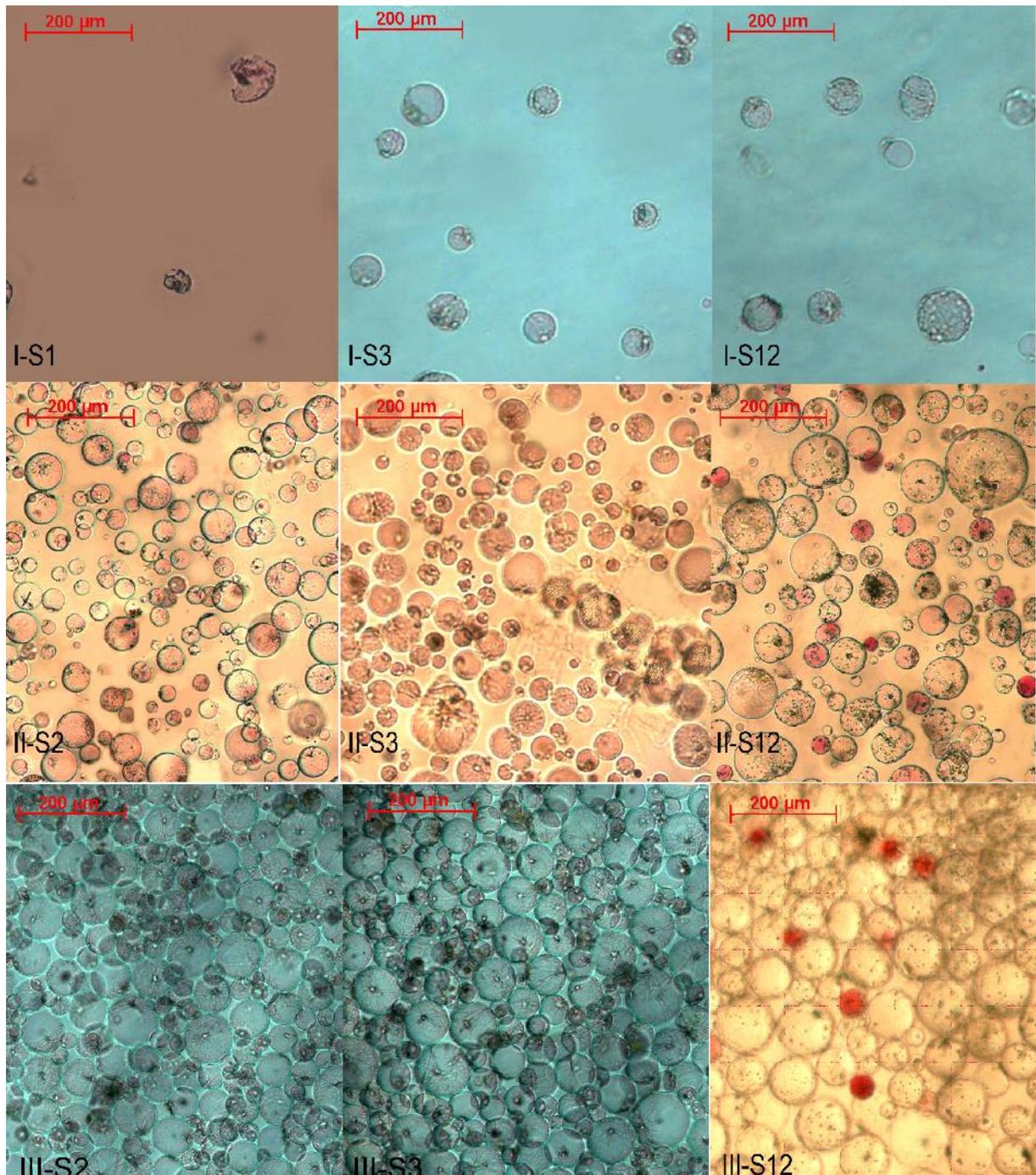
#### 4.3.4 Qualität der Protoplasten aus verschiedenen Pflanzenmaterialien

Die Protoplasten von *Streptocarpus* unterschieden sich je nach Art, Kulturbedingungen und Herkunft in Farbe, Größe, Chlorophyllgehalt und Vitalität.

Die Protoplasten aus an Blattextplantaten in Dunkelheit regenerierten Sprosse, die Protoplasten aus Stängeln – unabhängig von den Kulturbedingungen (Licht oder Dunkelheit) – sowie die Protoplasten aus der Suspensionskultur waren chlorophyllfrei. Dagegen wurden

aus unter Licht kultivierten Sprossen und Blättern – ebenfalls unabhängig von den Kulturbedingungen (Licht oder Dunkelheit) – Protoplasten mit grünen Chloroplasten freigesetzt.

Wie in Abbildung 4.14 zu sehen ist, hatten die Protoplasten je nach Herkunft und Kulturbedingungen verschiedene Durchmesser. Jedoch waren die Schwankungen des Durchmessers der Protoplasten bei den verschiedenen Experimenten auch innerhalb einer Art und unter gleichen Bedingungen relativ groß. Die Protoplasten aus unter Licht kultivierten Pflanzen zeigten niedrige Qualitäten und waren teilweise deformiert (Abb. 4.14, Gruppe I). Die Ausprägung von Chlorophyll war bei Blättern aus unter 500 Lux Licht (II) oder in Dunkelheit (III-S2 und III-S3) kultivierten Pflanzen schwächer. Die violetten Protoplasten (II-S12 und III-S12) stammten aus Epidermiszellen.



**Abbildung 4.14:** Freigesetzte Protoplasten in Suspensionen von verdautem Pflanzengewebe aus drei *Streptocarpus*-Arten nach 16 Stunden Enzymbehandlung und einer Stunde auf einem Kreisschüttler (GFL). I: aus Blättern aus In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium unter 2000 Lux freigesetzte Protoplasten, II: aus Blättern aus In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium unter 500 Lux freigesetzte Protoplasten, III-S2 und III-S3: aus Blättern aus In-vitro-Sprosskultur im flüssigen Medium in Dunkelheit freigesetzte Protoplasten, III-S12: aus Stängeln aus In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium unter 2000 Lux freigesetzte Protoplasten

Tabelle 4.7 stellt den Vergleich der Durchmesser der Protoplasten von fünf *Streptocarpus*-Arten nach Herkunft und Kulturbedingungen dar:

**Tabelle 4.7:** Vergleich der Durchmesser der Protoplasten ( $\mu\text{m}$ ) von fünf *Streptocarpus*-Arten nach Herkunft und Kulturbedingungen nach der Isolierung in Pufferlösung<sup>1</sup>

Art	Sprosse				Blätter								Stängel								Suspension	
	A		C		A		B		C		D		A		B		C		D		E	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
<b>S1</b>	49	12	46	13	47	14	52	21	50	17	48	11	47	14	40	18	37	14	35	15		
<b>S2</b>	45	13	38	10	43	9	45	17	41	17	45	13	38	13	38	15	35	14	32	14	5	2
<b>S3</b>	43	19	43	11	47	12	51	11	41	11	45	19	46	11	45	11	46	12	37	15	5	2
<b>S12</b>	50	11	46	12	52	13	57	14	47	14	56	15	53	13	51	15	55	31	42	21		
<b>S25</b>	58	13	61	11	62	28	65	17	58	12	65	14	62	13	60	14	63	33	51	20		

A: Kultur bei  $28 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf festem Medium

B: Kultur bei  $8 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf festem Medium

C: Kultur in Dunkelheit auf festem Medium

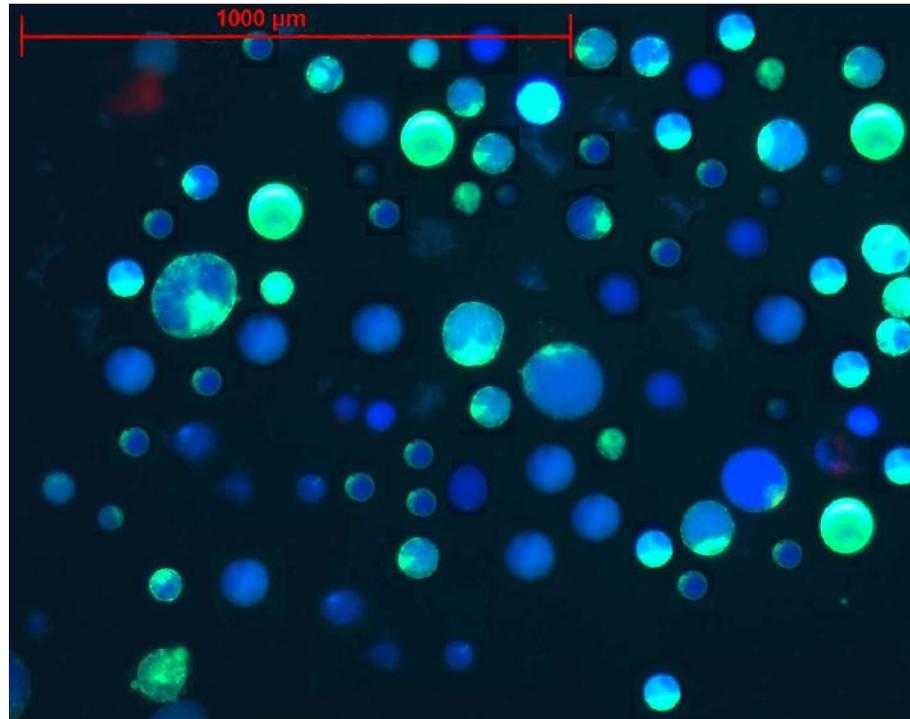
D: Kultur in Dunkelheit in flüssigem Medium

E: Suspensionskultur in Dunkelheit

X: Mittelwert

S: Standardabweichung

Die Vitalität der Protoplasten hing von der Art, dem Gewebe und den Kulturbedingungen ab. Die Einschätzung der Vitalität mittels FDA (Abb. 4.15) nach Reinigung der Suspensionen durch Sieben und Zentrifugieren schwankte bei verschiedenen Untersuchungen zwischen 15 % und 96 %.



**Abbildung 4.15:** Anfärbung der Protoplasten aus S1 (Stängel) durch FDA zur Einschätzung der Vitalität

Die Einschätzung der Vitalität der Protoplasten von verschiedenen *Streptocarpus*-Arten unter unterschiedlichen Kulturbedingungen wird in Tabelle 4.8 zusammengefasst:

**Tabelle 4.8:** Vitalität der Protoplasten (%) von fünf *Streptocarpus*-Arten aus verschiedenen Geweben und Kulturbedingungen nach der Isolierung in Pufferlösung 1

Art	Sprosse		Blätter				Stängel			
	A	C	A	B	C	D	A	B	C	D
S1	74	57	75	36	35	96	77	42	44	71
S2	73	58	71	25	22	81	71	18	15	78
S3	80	58	79	28	26	80	80	25	25	83
S12	65	42	68	22	17	76	72	24	25	76
S25	55	38	68	22	20	68	68	20	18	51

- A: Kultur unter 2000 Lux auf festem Medium
- B: Kultur unter 500 Lux auf festem Medium
- C: Kultur in Dunkelheit auf festem Medium
- D: Kultur in Dunkelheit flüssigem Medium

Aus Tabelle 4.8 ist deutlich zu erkennen, dass auf dem festen Medium insgesamt eindeutig ein höherer Anteil vitaler Protoplasten aus unter Licht kultiviertem Pflanzenmaterial gewonnen wurde als aus unter schwachem Licht oder in Dunkelheit kultiviertem Pflanzenmaterial. Jedoch war die Vitalität der Protoplasten aus den Pflanzen, die in Dunkelheit, aber im flüssigen Medium kultiviert worden waren (Variante D), sehr hoch. Der durch Lichtmangel verursachte Schaden für die Vitalität der Protoplasten auf dem festen Medium war bei den an Blattextplantaten regenerierten Sprossen im Vergleich zur Sprosskultur geringer. Bei Protoplasten aus regenerierten Sprossen von Genotyp S1 reduzierte sich die Vitalität durch Kultur in Dunkelheit beispielsweise um 18 %, bei Sprosskultur jedoch um 40 % bei Blättern und um 33 % bei Stängeln. Die Vitalität der Protoplasten von Blättern aus flüssiger Kultur war bei S1 am höchsten (96 %), gefolgt von S2 (81 %), S3 (80 %), S12 (75 %) und S25 (68 %).

#### 4.3.5 Optimierung der Kulturmedien

Die Protoplasten aus Stängeln von S12 und S25, die aus In-vitro-Sprosskulturen bei  $28 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auf dem festen Medium isoliert worden waren, teilten sich nicht. Aber bei Protoplasten von in Dunkelheit regenerierten Sprossen (S1 und S3) wurden Teilungen beobachtet. Dabei wurden ausschließlich die Daten aus den beiden Wiederholungen nach 14 Tagen verwendet (Tabelle 4.9).

**Tabelle 4.9:** Teilungsfrequenzen der Zellen aus Protoplasten von zwei *Streptocarpus*-Arten in drei Kulturmedien: 8pm7, 8pm7-a (8pm7 mit doppeltem Auxingehalt (2 mg / l NAA) und 8pm7-b (8pm7 mit Glutamin statt Ammonium)

Art	Medium	Anzahl von P.S. auswertbar	Anzahl von P.S. mit Teilung	Teilungsfrequenz nach 14 Tagen
S1	8pm7	2	2	0,7 %
	8pm7-a	4	3	2,3 %
	8pm7-b	4	2	0,8 %
S3	8pm7	3	1	1,1 %
	8pm7-a	5	3	2,2 %
	8pm7-b	5	3	1,2 %

Die Tabelle zeigt, dass mit der Variante 8pm7-a bei beiden Arten die höchste Teilungsfrequenz erreicht wurde. Das Ersetzen von Ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) durch Glutamin hinterließ keinen deutlichen Einfluss auf die Teilungsfrequenzen. Bei 8pm7-b waren die Teilungsfrequenzen von beiden Genotypen (S1 und S3) fast genauso gering wie bei der Kontrolle (8pm7).

Beim zweiten Versuch wurden die Einflüsse der Erhöhung von Kalzium im Kulturmedium auf die Teilungsfrequenzen von Protoplasten aus S1 und S3 getestet. Die Ergebnisse von diesem Versuch werden in der Tabelle 4.10 dargestellt:

**Tabelle 4.10:** Teilungsfrequenzen der Zellen aus Protoplasten von zwei *Streptocarpus*-Arten in drei Kulturmedien: 8pm7-a, 8pm7-ac (8pm7 mit doppeltem Auxingehalt und doppeltem Kalziumgehalt (2 mg NAA und 1200 mg Ca Cl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O / Liter) )

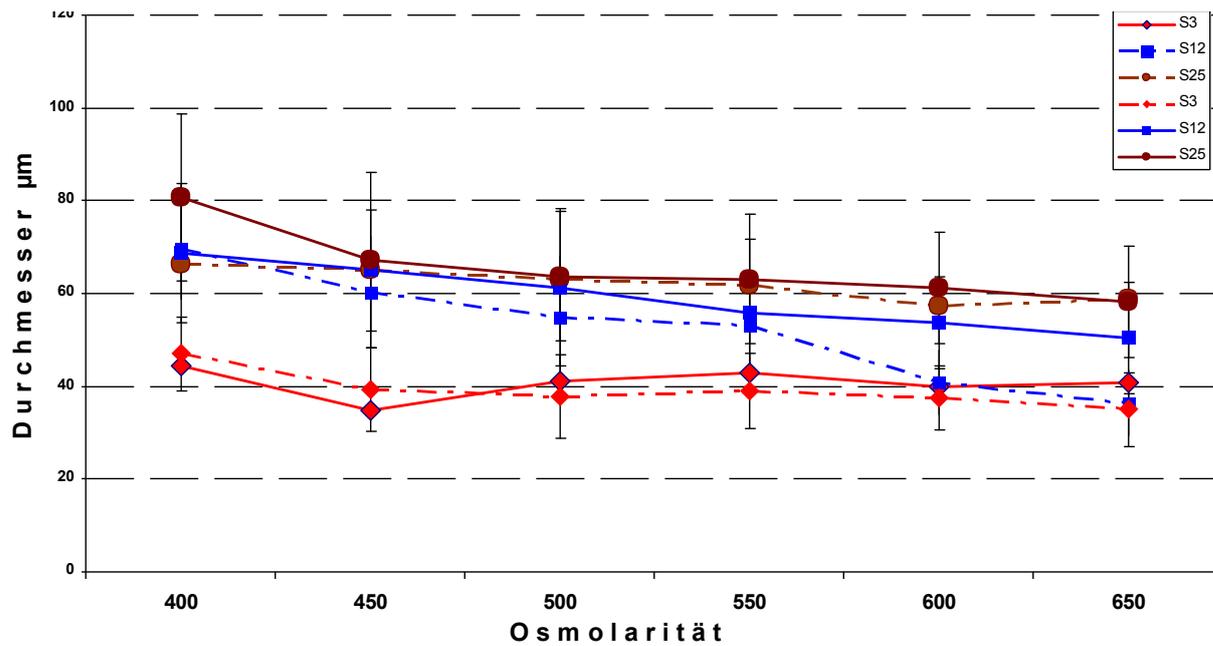
Art	Medium	Anzahl von P.S. Auswertbar	Anzahl von P.S. mit Teilung	Teilungsfrequenz nach 14 Tagen
S1	8pm7-a	3	2	2 %
	8pm7-ac	4	2	2,2 %
S3	8pm7-a	3	3	2,8 %
	8pm7-ac	4	4	3,3 %

Die berechneten Teilungsfrequenzen aus zwei Wiederholungen zeigten, dass die Verdopplung von Kalzium (8pm7-ac) die Teilung der Protoplasten leicht positiv beeinflussen konnte.

#### 4.3.6 Kultur der Protoplasten im flüssigen Medium

Um einen Vergleich zwischen Kulturmedien mit unterschiedlicher Osmolarität in Hinblick auf Durchmesser und Vitalität der Protoplasten darstellen zu können, wurden die Protoplasten von drei *Streptocarpus*-Arten im Medium 8pm7 mit Osmolaritäten zwischen 400 und 650 [mOsmol / kg H<sub>2</sub>O] kultiviert. Abbildung 4.16 und Tab. 9.12 stellen die Durchmesser der Protoplasten aus zwei Wiederholungen zu zwei Zeitpunkten dar. Die Messungen nach drei Tagen wurden als durchgehende Linien, die Messungen nach einer Woche als gebrochene Linien dargestellt.

In der Grafik ist deutlich zu sehen, dass die Durchmesser der Protoplasten bei Erhöhung der Osmolarität des Mediums allgemein kleiner wurden. Jedoch waren die Einflüsse der Osmolarität auf die Durchmesser der Protoplasten sowohl bei verschiedenen Arten als auch bei verschiedenen Varianten sehr unterschiedlich und manchmal widersprüchlich.



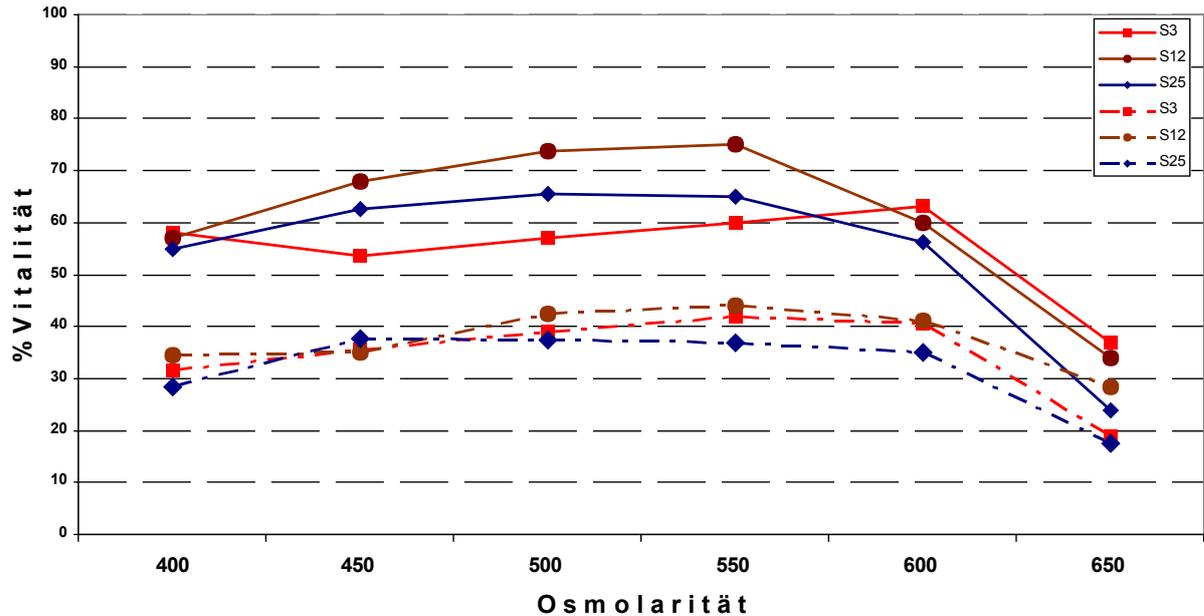
**Abbildung 4.16:** Änderungen der Durchmesser der kultivierten Protoplasten aus drei *Streptocarpus*-Arten im flüssigen 8pm7-Medium mit verschiedenen Osmolaritäten. Durchgehende Linien stellen die Messungen der Protoplasten nach drei Tagen Kultur dar, unterbrochene Linien repräsentieren die Messungen nach einer Woche

Die Protoplasten von Genotyp S12 zeigten nach drei Tagen bei stufenweiser Erhöhung der Osmolarität des Mediums eine fast gleichmäßige Verkleinerung, aber nach einer Woche zeigten die Protoplasten in den Medien mit über 550 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O eine starke Reduktion der Durchmesser.

Der Einfluss der Osmolarität der Medien auf die Protoplasten spiegelt sich auch in der Vitalität der Protoplasten deutlich wider (Abb. 4.17).

Abbildung 4.17 zeigt, dass sich die Vitalität der Protoplasten aus S12 und S25 (Stängel) nach drei Tagen mit Zunahme der Osmolarität von 400 auf bis zu 550 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O erhöhte. Die weitere Zunahme der Osmolarität im Medium auf 600 und dann 650 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O führte aber zunächst zu einer leichten, dann zu einer starken Beeinträchtigung der Vitalität dieser Arten. Bei S3 (auf Blattexplantaten regenerierte Sprosse) wurde eine Verbesserung der Vitalität bis 600 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O festgestellt, darüber hinaus nahm sie ab. Nach weiteren vier Tagen war bei allen Arten eine Abnahme der Vitalität um 18-30 % zu beobachten.

Der Grafik zeigt, dass die Protoplasten aus den Genotypen S3 und S12 nach einer Woche mit Erhöhung der Osmolarität der Medien bis 550 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O eine leichte Zunahme der Vitalität aufwiesen. Eine deutliche Verschlechterung zeigte sich ab 650 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O.



**Abbildung 4.17:** Die Vitalität der kultivierten Protoplasten aus drei *Streptocarpus*-Arten im flüssigen 8pm7-Medium mit verschiedenen Osmolaritäten. Durchgehende Linien zeigen die Einschätzung der Vitalität der Protoplasten durch FDA-Anfärbung nach drei Tagen Kultur, unterbrochene Linien repräsentieren die Einschätzung der Vitalität nach einer Woche

Nach zehn Tagen waren intakte Protoplasten noch bei den Medien mit 500 bis 550 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O zu sehen. Die Protoplasten bei den anderen Varianten verbräunten und starben ab. Nach 12 Tagen waren die Protoplasten bei allen Varianten braun. Während des Versuchs wurde bei keiner Variante Zellteilung beobachtet.

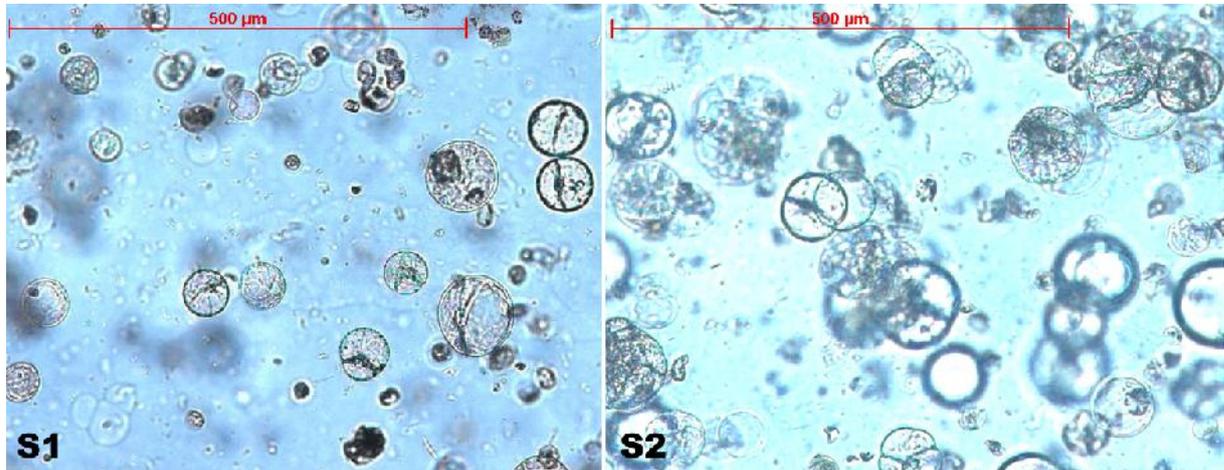
Deswegen wurde für weitere Versuche das Medium mit 560 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O, das für *Saintpaulia ionantha* verwendet wurde (WINKELMANN 1994), als in Hinblick auf die Osmolarität für *Streptocarpus* geeignet festgelegt.

#### 4.3.7 Kultur der Protoplasten in Alginatfilm

Außer den Protoplasten aus den Versuchen 4.2.6.4 (Protoplasten aus Suspensionsmedium) und 4.2.7.2 (Kultur der Protoplasten im flüssigen Medium) wurden die isolierten Protoplasten aus allen Versuchen in Alginatfilme eingebettet und in Dunkelheit bei 24 °C kultiviert. Durch „feeder cell layer“ wurde trotz Teilung von Protoplasten aus *Saintpaulia ionantha* und *Nicotiana tabacum* bei *Streptocarpus*-Arten keine Zellteilung induziert.

Bei Kultur der Protoplasten mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  in Alginatfilm wurden bei einigen *Streptocarpus*-Arten Zellteilungen beobachtet. Jedoch war der Beginn der Zellteilung bei verschiedenen *Streptocarpus*-Arten und auch bei unterschiedlichen Geweben nicht einheitlich. Die Protoplasten von S2 beispielsweise zeigten Teilungen nach 11 Tagen bei Stängeln und nach 7 Tagen bei Blättern. Allgemein wurden Vergrößerung und Teilung bei in

Alginate eingebetteten Protoplasten nach 7 bis 12 Tagen beobachtet. Dabei wurden in den Protoplasten Plasmastränge erkennbar. Die Teilungen traten meistens symmetrisch auf; bei einigen Protoplasten wurden die Cytoplasmen jedoch innerhalb der Zellen um den Kern durch Plasmastränge geteilt, und sie entwickelten sich zu Gruppen von kleinen Zellen (Abb. 4.18).



**Abbildung 4.18:** Die Zellteilung bei Protoplastenkulturen bei zwei *Streptocarpus*-Arten. Protoplasten von S1 aus an Blattexplantaten regenerierten Sprossen und Protoplasten von S2 aus Mesophyllzellen, die in Dunkelheit in flüssigem Medium kultiviert worden waren

Die Protoplastenkulturen aus Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus (Blätter und Stängel) ließen keine Teilungen erkennen. Bei Pflanzenmaterial aus In-vitro-Kultur waren unterschiedliche Ergebnisse zu verzeichnen. Tabelle 4.11 stellt ausführlich die Teilungsfrequenzen der Protoplasten von fünf *Streptocarpus*-Arten aus verschiedenem Pflanzenmaterial aus In-vitro-Kultur dar. Die Zellteilungsfrequenzen wurden nur bei Untersuchungen berechnet, in denen mindestens bei einer Petrischale Zellteilung stattfand. Tabelle 4.9 zeigt, dass bei den Protoplastenkulturen aus unter Licht auf Blattexplantaten regenerierten Sprossen keine Teilungen beobachtet wurden. Jedoch teilten sich beim gleichen Pflanzenmaterial, das in der Dunkelheit kultiviert worden war, die Zellen von einigen Arten (S1 und S3), allerdings in geringen Anteilen von 2-3 %. Bei der Sprosskultur auf dem festen Medium wurden nur bei Protoplasten aus Stängeln von S12, die unter 2000 Lux kultiviert worden waren, sowie bei Protoplasten aus Stängeln von S1 und S2, die unter 500 Lux kultiviert worden waren, Zellteilungen beobachtet. Die höchsten Zellteilungsraten wurden bei den Protoplastenkulturen aus Blättern von in Dunkelheit im flüssigen Medium kultivierten Pflanzen erreicht. Bei Genotyp S25 wurden in keinem Fall Zellteilungen festgestellt.

**Tabelle 4.11:** Teilungsfrequenzen [%] der Zellen aus Protoplasten von *Streptocarpus*-Arten nach 14 / 28 Tagen bei unterschiedlichem Pflanzenmaterial und unterschiedlichen Kulturbedingungen

In-vitro-Kultur																				
Regenerierte Sprosse auf Blattexplantaten					In-vitro-Sprosskultur															
					auf dem festen Medium									im flüssigen Medium						
2000 Lux		Dunkelheit			2000 Lux			500 Lux			Dunkelheit			Dunkelheit						
Art	Sprosse	Sprosse			Blatt	Stängel			Blatt	Stängel			Blatt	Stängel	Blatt			Stängel		
		n	X	S		n	X	S		n	X	S			n	X	S			
S1	-	510 / 270	2,3 / 3,5	1,1 / 1,7	-		-		-	525 / 335	1,8 / 1,8	1,5 / 0,6	-	-	372 / 150	3,9 / 11,5	1,2 / 3,1			
S2	-				-		-		-	470 / 254	2,1 / 3,5	1,1 / 2,8	-	-	487 / 235	5,5 / 6,7	1,8 / 3,5	-		
S3	-	420 / 212	2,5 / 3,3	1,5 / 2,1	-		-		-				-	-	462 / 283	4,5 / 13,2	2,5 / 0,9	-		
S12	-		-		-	456 / 280	1,7 / 2,5	0,7 / 1,8		-			-	-	378 / 223	2,1 / 3,7	1,3 / 0,9	437 / 150	1,8 / 5,2	1,5 / 1,7
S25	-		-		-		-		-				-	-	-			-		

X: Mittelwert

S: Standardabweichung

n: Anzahl gezählter Protoplasten vv

-: Keine Teilungen

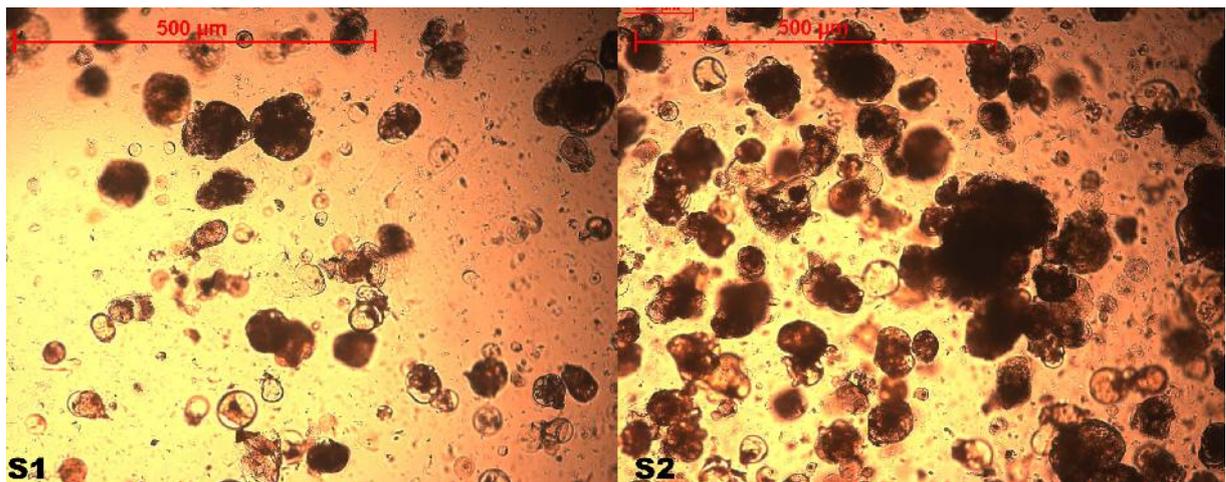
Wie bei *Saintpaulia ionantha*-Protoplasten spielte die Dichte der Protoplasten auch bei *Streptocarpus* eine wesentliche Rolle für die Zellteilung. Besonders bei ungleichmäßiger Verteilung der Protoplasten im Alginatfilm liefen dort, wo die Dichte niedriger war, weniger oder keine Zellteilungen ab, bei höherer Dichte dagegen häufiger. Bei zu hoher Dichte verbräunten die Protoplasten bei der weiteren Entwicklung und starben ab.

Die weiteren Zellteilungen der Protoplastenkulturen führten zur Bildung von Mikrokallussen, die nach drei Wochen deutlich erkennbar waren. Die Absenkung der Osmolarität und die Reduzierung von Wachstumsregulatoren durch Ersetzung des Kulturmediums 8pm7-ac durch das Medium KF1-ac (variierte KF1: 1 mg / l NAA und 1800 mg / l  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) nach 14 Tagen und durch das Medium KF2 nach weiteren zehn Tagen förderte diesen Prozess.

#### 4.3.8 Kalluskultur

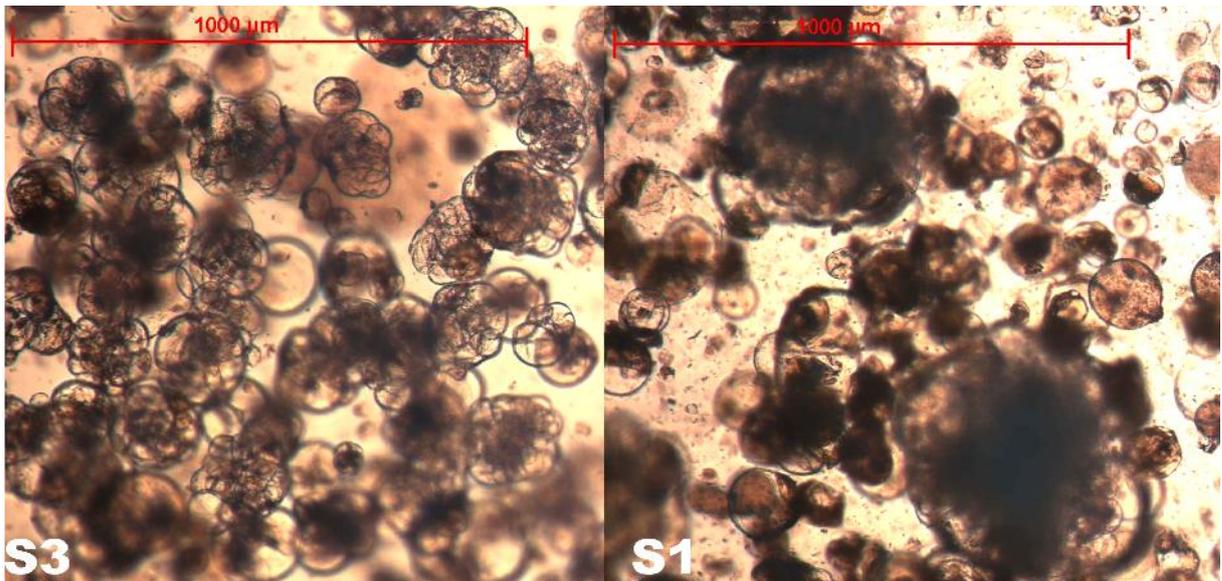
Die Mikrokallusbildung und die Entwicklung von Zellklustern waren bei verschiedenen *Streptocarpus*-Arten, Untersuchungen, Ansätzen und auch innerhalb der Ansätze und Petrischalen nicht einheitlich.

Aus diesem Grund konnte nicht leicht ein Zeitpunkt für das Auflösen der Alginatfilme in Kalium-Citrat-Lösung festgelegt werden. Die Mikrokalluse aus auf Blattexplantaten regenerierten Sprossen (S1 und S3), die Mikrokalluse aus Stängeln (S1, S2 und S12) und die Mikrokalluse aus Blättern von S2 verbräunten bei ihrer weiteren Entwicklung und starben vor der Übertragung auf das feste KF2-Medium ab (Abb. 4.19).



**Abbildung 4.19:** Die Mikrokalluse aus Protoplasten von Stängeln bei S1 (links) und die Mikrokalluse von Protoplasten aus Blättern bei S2 (rechts) verbräunten während der Kultur im KF1-a-Medium nach fünf Wochen und starben ab

Die Protoplasten von S1 und S3, die aus Blättern aus dem flüssigen Medium stammten, konnten sich weiter entwickeln. Nach vier Wochen erreichten die Mikrocalluse eine Größe von ca. 200  $\mu\text{m}$  (Abb. 4.22, links) und nach sechs Wochen von ca. 500  $\mu\text{m}$  (Abb. 4.20, rechts). Die Farbe der Kalluse änderte sich nach sechs Wochen von gelb-braun zu schneeweiß.



**Abbildung 4.20:** Mikrocalluse aus Protoplasten von Blättern bei S3 nach vier Wochen (links) und Mikrocalluse aus Protoplasten von Blättern bei S1 nach sechs Wochen (rechts). Die Blätter stammten von In-vitro-Pflanzen, die in Dunkelheit im flüssigen Medium kultiviert worden waren.

Als einige Kalluse Durchmesser von ca. 1 mm erreicht hatten, wurden sie mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Alginatefilm herausgelöst und auf das feste Kalluswachstumsmedium KF2 übertragen. Die Kalluse waren in diesem Stadium kugelförmig, kompakt, widerstandsfähig und schneeweiß. Die in den Alginatefilmen verbliebenen Kalluse blieben für ca. zwei weitere Wochen in frischem flüssigen KF2.

Ungefähr acht Wochen nach der Protoplastenisolierung wurden die Alginatefilme in Kalium-Citrat-Lösung aufgelöst. Danach wurden die Mikrocalluse nach dem Auswaschen mit flüssigem Medium KF2 auf festem KF2 kultiviert.

Die Tabelle 4.12 stellt jeweils zwei Untersuchungen bei jedem Pflanzenmaterial von verschiedenen *Streptocarpus*-Arten dar, in denen Zellteilungen beobachtet wurden:

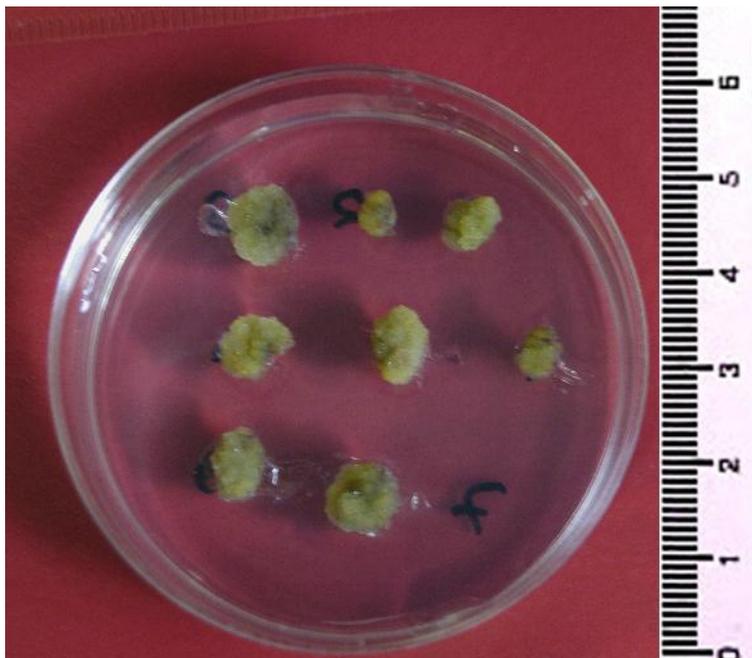
**Tabelle 4.12:** Protoplastenentwicklungen aus Versuchen von vier *Streptocarpus*-Arten aus unterschiedlichem Pflanzenmaterial und unterschiedlichen Kulturbedingungen

Variante	Art	Σ Wdh.	Aus zwei Wiederholungen mit Zellteilung					
			Σ Ansätze aus zwei Wdh. mit Zellteilungen	Ansätze mit Zellteilungen	Anzahl von kultivierten P.S.	Anzahl von P.S. mit Zellteilung	P.S. mit Mikrocallus	Anzahl von Kallussen mit weiterem Wachstum auf festem Medium
A	S1	17	6	3	5	3	3	-
	S3	15	6	4	12	9	8	-
B	S12	22	8	4	9	6	4	-
C	S1	14	8	3	6	6	6	-
	S2	12	6	4	10	7	3	-
D	S1	4	6	5	10	10	7	238
	S2	6	6	4	7	3	2	-
	S3	3	6	6	12	9	5	345
	S12	2	6	3	5	3	1	-
E	S12	4	8	2	3	2	1	-
		4						

- A: regenerierte Sprosse auf Blattexplantaten
- B: Stängel aus In-vitro-Sprosskultur unter 2000 Lux
- C: Stängel aus In-vitro-Sprosskultur unter 500 Lux
- D: Blätter aus In-vitro-Sprosskultur im flüssigen Medium in Dunkelheit
- E: Stängel aus In-vitro-Sprosskultur im flüssigen Medium in Dunkelheit

Danach wurden die Kallusse alle zwei Wochen auf frisches Medium KF2 umgesetzt. Dies wurde ein- bis zweimal wiederholt, bis die Kallusse Größen von 3-5 mm erreicht hatten. Während der Subkultur auf dem Kalluswachstumsmedium KF2 bildeten die Kallusse zumeist Wurzeln.

Anschließend wurden die Kallusse auf das Sprossregenerationsmedium KR10 umgesetzt. Abbildung 4.21 stellt einige Kallusse aus Protoplasten von S3 nach zweimaliger Subkultur auf dem Medium KR10 dar:



**Abbildung 4.21:** Kalluse von S3 aus Protoplasten aus Blättern von In-vitro-Sprossen, die in flüssigem Medium in Dunkelheit kultiviert worden waren, nach zweimaliger Subkultur auf dem Medium KR10

Da auf dem Medium KR10 keine Sprosse auf den Kallussen gebildet wurden, wurden die Kalluse auf verschiedene Medien mit unterschiedlichen Zusätzen (s. 4.2.9, Tab. 4.3) umgesetzt. Dadurch wurden keine Sprosse an den Kallussen regeneriert, obwohl die Kalluse Wurzeln gebildet hatten.

Die folgende Tabelle (Tab. 4.13) stellt einen Vergleich der Wurzelbildung von Kallussen bei S1 und S3 mit verschiedenen Wachstumsregulatoren dar:

**Tabelle 4.13:** Wurzelbildung von Kallussen aus Protoplasten aus Blättern bei S1 und S3 nach zweimaliger Subkultur auf dem Medium B5 mit unterschiedlichen Wachstumsregulatoren

Art	KR10		A		B		C		D		E		F		G		H		I	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
S1	16	19	2	5	20	20	2	5	27	20	100	0	17	18	27	27	69	28	11	11
S3	21	15	5	8	15	16	0	0	33	29	100	0	25	24	27	29	50	33	18	16

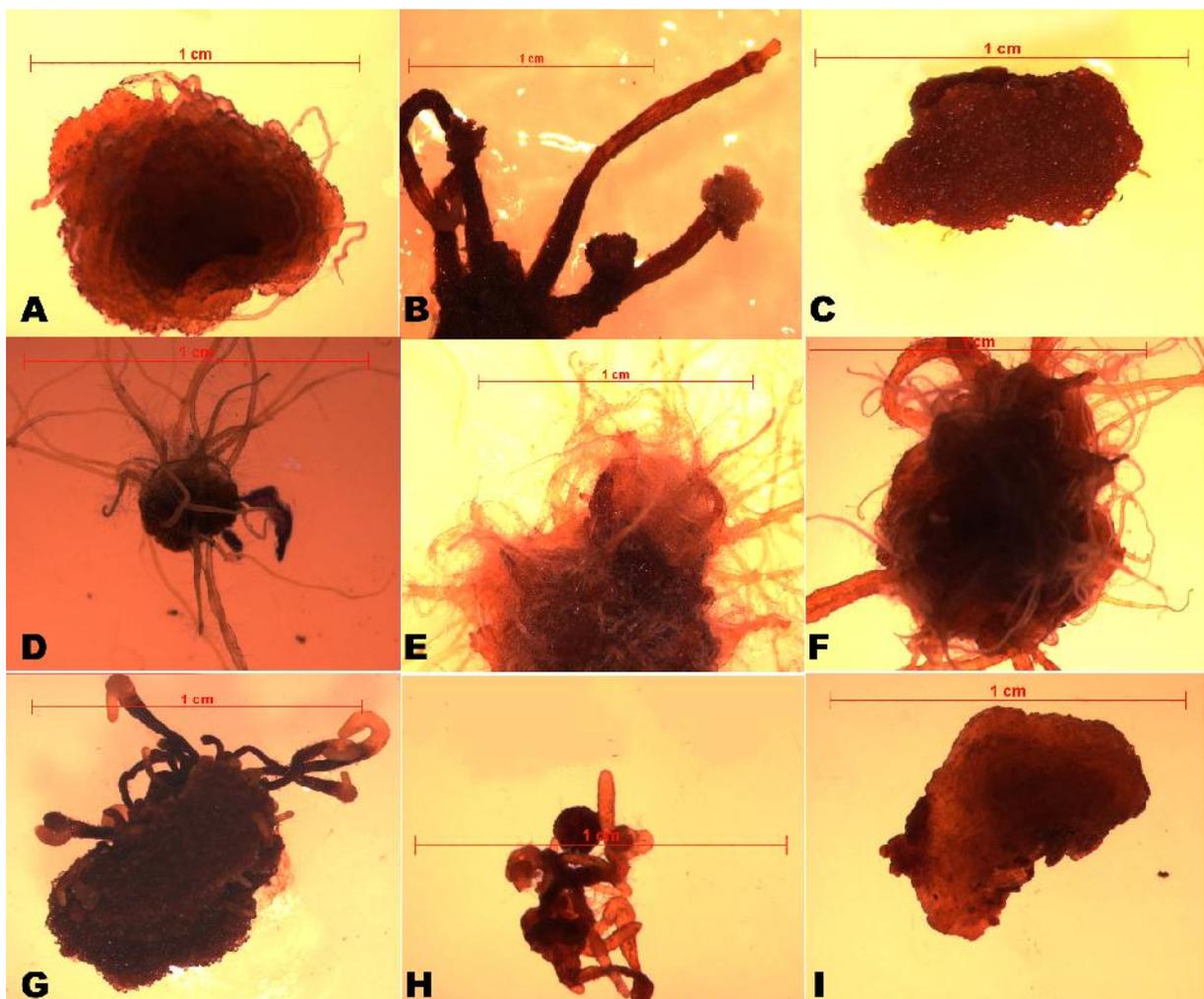
X: Mittelwert

S: Standardabweichung

Tabelle 4.13 zeigt, dass die Wurzelbildung bei S1 und S3 in Abhängigkeit von verschiedenen Wachstumsregulatoren sehr unterschiedlich war. Insgesamt war bei beiden Arten die höchste Wurzelbildung (100 %) an Variante E (0,5 mg / l NAA, 2 mg / l 2iP und 7 mg / l Adeninsulphat) zu verzeichnen, gefolgt von Variante H (1 mg / l IAA und 1 mg / l Kinetin) und, auf deutlich niedrigerem Niveau, den Varianten G (1 mg / l IAA und 4 mg / l Zeatin) und D (0,5 mg / l IAA und 4 mg / l 2iP). Die Wurzelbildung auf der Variante F (F<sub>1</sub>: 5 mg / l NAA

und 5 mg / l BAP und 3 mg / l AgNO<sub>3</sub>, F<sub>2</sub>: 3 mg / l BAP und 1 mg / l Zeatin) lag bei S1 bei ca. 17 %, wie bei der Kontrolle (KR10), und bei S3 bei ca. 25 %. Bei Variante B (0,5 mg / l NAA und 1 mg / l TDZ) wurden bei S1 ca. 20 % und bei S3 ca. 15 % Wurzelbildung beobachtet. Noch niedriger lag die Wurzelbildung bei Variante I (I<sub>1</sub>: 0,5 mg / l NAA und 0,5 mg / l BAP, I<sub>2</sub>: 0,01 mg / l NAA und 5 mg / l BAP). Die niedrigste Wurzelbildung wurde bei den Varianten A (0,5 mg / l IAA, 4 mg / l BAP) und C (0,5 mg / l IAA, 4 mg / l 2iP, 2 mg / l Metatopolin) beobachtet.

Auch die Form der Kallusse und Wurzeln war bei den Kulturen mit verschiedenen Medienvarianten sehr unterschiedlich (Abb. 4.22). Die Kallusse auf den Medien B und H waren kugelförmig. Die Wurzeln auf den Varianten A, D und E waren weiß und dünn, während die Wurzeln auf den Kallussen von den Varianten B, G und H braun und dicklich waren. Diese Wurzeln waren zerbrechlich. Bei den Varianten C und F wurden beide Formen festgestellt. Bei der Variante B bildeten sich an der Spitze der Wurzeln erneut kugelförmige Kallusse.



**Abbildung 4.22:** Wurzelbildung von Kallussen aus Protoplasten bei S1 nach zweimaliger Subkultur auf Medien mit unterschiedlichen Wachstumsregulatoren

#### **4.4 Diskussion**

Zur Meristemkultur wurde anhand der Ergebnisse festgestellt, dass die Pflanzen aus In-vitro-Sprosskulturen nicht für die Meristemkultur geeignet waren (s. 4.3.1.5). Möglicherweise konnten die Mikroorganismen die Apikalmeristeme von Pflanzen aus dem Gewächshaus aufgrund des schnelleren Wachstums nicht erreichen, im Gegensatz zu den Pflanzen aus In-vitro-Sprosskultur, deren langsames Wachstum die Kontamination der ganzen Pflanze begünstigte. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Bedingungen in vitro für die Mikroorganismen günstiger waren.

Eine hohe Anzahl vitaler Protoplasten ist Voraussetzung für ein erfolgreiches Protoplastenfusionsprogramm. Die Isolation und Kultur von Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* wurde erstmals von WINKELMANN UND GRUNEWALDT (1992) berichtet. Sie konnten nach vielen Untersuchungen an verschiedenen Pflanzenteilen wie Blattspreiten und Blattstielen aus jungen Sprossen, die für sechs Wochen bei 24 °C in Dunkelheit an Blattexplantaten regeneriert worden waren, lebensfähige Protoplasten gewinnen, die sich bei ihren weiteren Entwicklungen in der Kultur teilen konnten und neue Pflanzen regenerierten. Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Isolation und Regeneration von *Saintpaulia ionantha* als einem der Fusionspartner nach dem Protokoll von WINKELMANN (1994) im Labor etabliert (s. Kapitel 3).

Gereinigte Protoplasten hoher Qualität spielen bei der Protoplastenkultur eine entscheidende Rolle und werden entscheidend vom Ausgangsmaterial bestimmt (GROSSER 1994). Diese Aussage, dass das Ausgangsmaterial von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten bei *Saintpaulia ionantha* ist (WINKELMANN 1994), konnte auch für *Streptocarpus*-Arten bestätigt werden. Jedoch wurde nach den ersten Versuchen klar, dass die Verwendung von in Dunkelheit regenerierten Sprossen als Ausgangsmaterial bei *Streptocarpus*-Arten viele negative Effekte hatte (s. 4.3.1.1). Im Vergleich zu unter 2000 Lux Licht kultivierten Explantaten war die Regenerationsrate von in Dunkelheit angezogenen Explantaten signifikant reduziert (Abb. 4.2), und darüber hinaus wurde die Qualität des Pflanzenmaterials durch den Lichtmangel stark beeinträchtigt, so dass die regenerierten Sprosse an Blattexplantaten bei S12 und S25 verbräunten und bei S1, S2 und S3 zu 80 % hyperhydriert und durchsichtig waren und deshalb für die Protoplastenisolation unbrauchbar wurden (Abb. 4.3). Aus gesund aussehenden Sprossen wurden relativ hohe Anzahlen von Protoplasten gewonnen. Besonders bei S3 wurden bis zu  $5,9 \times 10^5$  Protoplasten / Gramm Frischmasse freigesetzt. Aber die Vitalität der Protoplasten aus den regenerierten Sprossen war niedrig (Tabelle 4.8). Laut RETHMEIER ET AL. (1990)

fürte die geringe Vitalität der Protoplasten von *Lycopersicon pennellii* zur Produktion von toxischen Stoffen wie Ethylen und zur Erhöhung der Osmolarität im Medium, was die Zellteilung verhinderte. Daher wurden mehrere weitere Versuche zur Identifizierung von Ausgangsmaterial, das zur Gewinnung zahlreicher vitaler Protoplasten von *Streptocarpus*-Arten führte, durchgeführt.

Laut den Literaturangaben wurden unterschiedliche Pflanzenorgane unter verschiedenen Kulturbedingungen für die Isolation der Protoplasten verwendet. Einige Autoren wie BHOJWANI UND RAZDAN (1996) vertreten die Auffassung, dass Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus oder vom Feld für die Protoplastenkultur besser geeignet ist, weil es in Hinblick auf Licht, Feuchtigkeit, Temperatur und Ernährung unter optimalen Bedingungen heranwächst. Von den Pflanzen, die im Gewächshaus kultiviert worden waren, wurden in dieser Arbeit Blüten, Stängel und Blätter für die Protoplastenisolation getestet. Auf die Blütenstiele wurde verzichtet, weil sie hart und ungeeignet waren. Die Blütenblätter verbräunten während der Präplasmolyse in der Präplasmolyse-Lösung, und ihre Zellen starben ab, wahrscheinlich wegen des pH-Wertes von 5,6.

Aus den Stängeln aus dem Gewächshaus wurden nur wenige Protoplasten freigesetzt (Tab. 4.7). Obwohl aus den Stängeln von In-vitro-Sprosskulturen im Vergleich zu im Gewächshaus kultivierten Pflanzen mehr Protoplasten freigesetzt werden konnten (Tab. 4.7 und Abb. 4.14), reichte die Ausbeute bei einigen *Streptocarpus*-Arten (S1, S2 und S3) für eine Protoplastenkultur nicht aus.

Laut den Literaturangaben wurden zur Isolation der Protoplasten meist Blätter verwendet, weil sich aus ihnen viele Protoplasten gewinnen ließen. Beispielweise wurden bei Tabak (KELLER UND MELCHERS), *Petunia* (FREARSON ET AL. 1973; OH UND CLOUSE 1998), *Vicia hajastana* (CONSTABEL UND KAO 1974), Erbse (ARNOLD UND ERIKSSON 1975), Weizen und Mais (HARMS UND POTRYKUS 1978a; GÖNTÉR ET AL. 2002), *Vicia faba* (ZIMMERMANN UND SCHEURLICH 1981), *Brassica campestris* (MENCZEL UND WOLFE 1984), *Solanum melongena* (SIHACHAKR UND DUREUX 1987), *Rudbeckia hirta* (AL-ATABEE ET AL. 1990), *Dianthus* (NAKANO UND MII 1992a), *Passiflora* (OTONI ET AL. 1995), *Genetiana triflora* (NAKANO ET AL. 1995), *Rosa hybrida* (MARCHANT ET AL. 1997), *Solanum integrifolium* und *Solanum violaceum* (TAMURA ET AL. 2002) Protoplasten aus Blättern isoliert und erfolgreich regeneriert.

Aus Blättern aus dem Gewächshaus wurden nur wenige Protoplasten freigesetzt, die normalerweise für eine Protoplastenkultur nicht ausreichten. Aus den Blättern einer Art (S2) wurden gar keine Protoplasten herausgelöst (Tab. 4.6).

Durch die Anwendung von Material aus In-vitro-Kultur konnte die Ausbeute an Protoplasten erhöht werden. Beispielsweise wurden bei S1 aus den Blättern, die im Gewächshaus kultiviert worden waren,  $0,05 \times 10^5$  Protoplasten / g Frischmasse freigesetzt, während aus den Blättern der gleichen Art aus In-vitro-Sprosskultur, die auf dem festen Medium bei  $28 \text{ Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (2000 Lux) kultiviert worden waren,  $0,9 \times 10^5$  Protoplasten / g Frischmasse gewonnen werden konnten. Obwohl die Anzahl von freigesetzten Protoplasten durch die Entfernung der unteren Epidermis der Blätter entsprechend der Empfehlung von BHOJWANI UND RAZDAN (1996) und die Anwendung von Vakuum (SCOTT ET AL 1978; GROSSER 1994) aufgrund der besseren Penetration der Enzyme zwischen den Mesophyllzellen beispielsweise bei S1 um 23 % und bei S25 um 4 % erhöht wurde, reichte diese Steigerung für eine geeignete Kulturdichte der Protoplasten nicht aus (Abb. 4.19 und 4.10).

Die Digestion von Blättern in der Enzymlösung durch Vakuum war bei den *Streptocarpus*-Arten unterschiedlich. S25 reagierte am empfindlichsten auf die Enzymbehandlung, gefolgt von S12, S1 und S3. Die geringste Enzympenetration wurde bei S2 festgestellt (Abb. 4.10 und Tab. 9.8). Im Vergleich zu den Blättern waren die Stängel wahrscheinlich empfindlicher (Tab. 4.4, 4.5, Abb. 4.8).

Diese Unterschiede können möglicherweise durch die unterschiedliche Beschaffenheit der Zellwände erklärt werden. Durch die Zellwandmatrix können Wasser, Gase und wasserlösliche Stoffe, zu denen auch die Enzymlösung gehört, in die Zellen diffundieren. Je nach Porosität der Zellwand und Stärke der Kutikula geschieht dies in unterschiedlichem Maße. Bei manchen Zellen verhindert auch eine auf der Wand aufgelagerte Wachsschicht die Diffusion der Moleküle (ALBERTS ET AL. 1986).

Wahrscheinlich bilden die Pflanzen unter normalem Tageslicht und geringer Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus kompaktere Mesophyllgewebe und unterschiedlich beschaffene Zellwände, so dass die Enzymlösung nicht zwischen die Zellwände vordringen und die Protoplasten freisetzen kann. Deswegen wurden für die Isolation der Protoplasten meistens Pflanzen aus In-vitro-Kultur verwendet. Ein weiterer Vorteil von Pflanzenmaterial aus In-vitro-Kultur liegt darin, dass Schäden, die bei sensiblen Pflanzen durch Oberflächensterilisation entstehen, vermieden werden (GROSSER 1994).

Licht und Lichtintensität während der Kultur des Ausgangsmaterials sind wichtige Faktoren, die indirekt die Isolation und die weitere Entwicklung der Protoplasten beeinflussen. GROSSER (1994) schlug vor, Pflanzen für die Protoplastenisolation unter geringer Lichtintensität und hoher Luftfeuchtigkeit zu kultivieren.

Bei *Streptocarpus*-Arten wurde in der vorliegenden Arbeit anhand des Vergleichs zwischen

der Kultur der Pflanzen unter Licht und in Dunkelheit festgestellt, dass Lichtmangel meistens zur Streckung der Zellen und zur Bildung von weicherem, chlorophyllarmem Gewebe führte. Die unter niedriger Lichtintensität oder in Dunkelheit kultivierten Pflanzen bildeten längere Internodien und Blattstiele sowie breitere Blattspreiten. Dies war für Arten wie S1, S3 und besonders S2, die unter normalen Lichtbedingungen sehr kurze Stängel und kompakte Blätter bildeten, von Vorteil. Wurde die Lichtintensität von 2000 Lux auf 500 Lux reduziert oder wurden die Pflanzen in Dunkelheit kultiviert, stieg die Ausbeute von Protoplasten aus Stängeln bei einigen Arten sehr deutlich an. Nur bei Stängeln von S12 nahm die Anzahl von freigesetzten Protoplasten durch die Reduzierung der Lichtintensität ab (Abb. 4.14).

Der Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Anzahl isolierter Protoplasten bei Ausgangsmaterial aus Blattspreiten wird in Abbildung 4.11 dargestellt. Bei allen untersuchten *Streptocarpus*-Arten nahm die Ausbeute aus Blättern mit Reduktion der Lichtintensität zu. Beispielsweise stieg die Anzahl der Protoplasten aus Blättern bei S2 unter 2000 Lux von  $0,11 \times 10^5$  auf  $0,89 \times 10^5$  / g Frischmasse. Wenn die Pflanzen bei 500 Lux kultiviert worden waren, sowie bei Kultur der Pflanzen in Dunkelheit, stieg die Anzahl der Protoplasten pro g Frischmasse auf  $2 \times 10^5$ .

Ähnliche Wirkungen der Kultur unter Licht und in Dunkelheit wurden auch bei an Blattexplantaten regenerierten Sprossen beobachtet. Nur bei einem Genotyp (S25) konnten unter Licht angezogenen Sprosse im Vergleich zu in Dunkelheit kultivierten Sprossen mehr Protoplasten freisetzen (Abb. 4.12).

Die positive Wirkung der Reduzierung der Lichtintensität war bei den *Streptocarpus*-Arten an mehrere Nachteile gekoppelt. Signifikant niedrigere Sprossregeneration an Blattexplantaten, Verbräunung der Sprosse und Bildung von hyperhydrierten Sprossen bei allen Arten (Abb.4.3) führten zu ca. 80 % Verlust von Pflanzenmaterial. Bei der In-vitro-Sprosskultur führte eine geringe Lichtintensität zur Bildung von braun gesprenkelten Blättern und Stängeln, was sich bei Kultur in Dunkelheit bis hin zu Verbräunung und Absterben der Pflanzen steigerte.

Bei Stängeln reagierten die *Streptocarpus*-Arten in Bezug auf die Isolation von Protoplasten unterschiedlich auf verschiedene Lichtbedingungen. Während bei drei Arten (S1, S2 und S3) Lichtmangel zur Steigerung der Ausbeute führte, wurde die Anzahl der Protoplasten bei S12 durch Kultur unter 500 Lux oder in Dunkelheit reduziert, und bei S25 wurden keine deutlichen Unterschiede bei den Ausbeuten beobachtet (Abb. 4.11 und 4.12).

Die negativen Auswirkungen des Lichtmangels während der Kultur des Ausgangsmaterials, die sich als kleine Flecken auf Blättern und Stängeln zeigten, wirkten sich auch auf die

Vitalität der Protoplasten aus, die deutlich beeinträchtigt war. Im Gegensatz zu *Saintpaulia ionantha*, deren aus in Dunkelheit angezogenem Ausgangsmaterial gewonnene Protoplasten eine höhere Vitalität hatten (WINKELMANN 1994), zeigten die Protoplasten von *Streptocarpus* aus auf dem festen Medium unter Lichtmangel oder in Dunkelheit kultivierten Pflanzen eine niedrigere Lebensfähigkeit (Tab. 4.8).

Nur aus Blättern aus in Dunkelheit im flüssigen Medium kultivierten In-vitro-Sprosskulturen konnten zahlreiche Protoplasten mit hoher Vitalität gewonnen werden (Abb. 4.5, 4.13).

Die Sprosse wurden im flüssigen Medium kultiviert und in Dunkelheit auf einen Kreisschüttler bei 40 rpm. gestellt. Im Vergleich zu den vorherigen Kulturmaßnahmen konnten die Pflanzen bei dieser Methode aufgrund ihres schnellen Wachstums (zwei statt sechs Wochen) kurz nach der Subkultur und der Überführung in Dunkelheit verwendet werden. Der zweite Vorteil lag im relativ gleichmäßigen Wachstum. Insgesamt ergaben sich so die geringsten Verluste von Pflanzenmaterial, und die Anzahl der Protoplasten war bei dieser Methode hoch (Abb. 4.13). Ein weiterer Vorteil lag in der für die meisten Arten sehr hohen Vitalität der Protoplasten (Tab. 4.8).

Diese Ergebnisse zeigten, dass Licht aufgrund zweier unterschiedlicher Auswirkungen Quantität und Qualität des Ausgangsmaterials bzw. der Protoplasten von *Streptocarpus*-Arten beeinflusste. Durch Licht bildeten sich kompaktere Mesophyllgewebe und stärker ausgeprägte Kutikula, was die Penetration der Enzymlösung verhinderte und die Digestion der Blätter in der Enzymlösung störte. Wo, wie bei Stängeln von S12, keine Mesophyllzellen bzw. chloroplastenhaltige Zellen vorhanden waren, wurden keine Probleme bei der Auflösung der Gewebeverbände beobachtet. Mehrere Autoren berichteten von Schwierigkeiten bei der Isolierung von Protoplasten aus chlorophyllhaltigen Geweben. Diesen wurde z.B. mit Kultur in Dunkelheit (WINKELMANN 1994), Anwendung von Suspensionkultur (GROSSER 1994) und Anwendung von Vakuum (SCOTT ET AL. 1978) begegnet. GÖNTÉR ET AL (2002) hatten bei Mais und SHIMIZU ET AL. (1999) bei *Iris ensata* Blätter von Albinopflanzen zur Protoplastenisolierung verwendet; eine Methode, die wahrscheinlich auch bei *Streptocarpus*-Arten angewendet werden kann, weil während der In-vitro-Kultur bei einigen Arten Chimären oder Albinopflanzen gefunden wurden. Bei *Streptocarpus* wird der Transport von Nährstoffen in den Pflanzen wahrscheinlich durch Licht gesteuert. Dieser wurde vermutlich durch den Lichtmangel gestört, was zur Verbräunung der Blätter und Stängel und damit zur Absenkung der Qualität bzw. der Vitalität der Protoplasten führte. Durch die Kultur der Pflanzen im flüssigen Medium in Dunkelheit wurde einerseits der Einfluss des Lichts auf die Bildung von

dichten Zellverbänden verhindert, und andererseits wurde die Ernährung der Pflanzenorgane, die durch Lichtmangel gestört wurde, durch den ständigen Kontakt der Blätter mit dem flüssigen Medium gesichert, was zur höchsten Qualität und Vitalität der Protoplasten führte. Zusätzlich wurden nicht nur die neu gebildeten Blätter, sondern auch ältere Blätter durch den ständigen Kontakt mit dem flüssigen Medium verdickt und aufgeschwemmt, was deren Zerkleinerung und Verdauung in der Enzymlyse erleichterte und förderte.

Bei den Protoplasten aus chlorophyllhaltigem Gewebe, das unter Licht kultiviert wurde, wurden keine Zellteilungen beobachtet (Tab. 4.9). Bei Protoplasten aus unter Licht angezogenen Stängeln bei S12 fanden jedoch Zellteilungen statt. Das beweist, dass die negativen Auswirkungen von Licht auf die Protoplasten nur in Bezug auf chlorophyllhaltige Zellen von Bedeutung sind.

Von Vorteilen der Kultur des Ausgangsmaterials in Dunkelheit oder unter schwachem Licht in Bezug auf die Zellteilung wurde bei verschiedenen Pflanzen wie *Citrus* (GROSSER 1994), *Saintpaulia ionantha* (WINKELMANN 1994) und Nelken (NAKANO ET AL. 1992) berichtet. WINKELMANN (1994) vermutete, dass die Chloroplasten möglicherweise aufgrund ihrer hohen Dichte bei der Zentrifugation einen starken Druck auf das Plasmalemma ausübten, was zu deren Schädigung führte.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei Isolation und Kultur der Protoplasten aus Blättern wurden bei mehreren Pflanzen Suspensionskulturen verwendet: *Limonium perezii* (KUNITAKE UND MII 1990), *Citrus* (GROSSER 1990, 1994), Nelken (NAKANO ET AL. 1996), Reis (LIU ET AL. 1999), *Rosa* (SCHUM ET AL. 2002; SQUIRREL ET AL. 2005), Banane (KAZUMITSU ET AL. 2002; ASSANI ET AL. 2005).

Bei dieser Arbeit wurde das Protokoll von HOSHINO ET AL (1995), das sie für Suspensionskultur bei *Saintpaulia ionantha* verwendet hatten, für *Streptocarpus*-Arten variiert und in mehreren Versuchen getestet (s. 4.3.1.4). Jedoch wurde aus mehreren Gründen trotz hoher Ausbeute (s. 4.3.3) bei weiteren Versuchen von der Suspensionskultur abgesehen: Erstens wurde durch Suspensionskultur nur bei zwei Arten (S3 und S12) verwertbares Ausgangsmaterial gewonnen. Bei zwei weiteren Arten (S2 und S25) konnten trotz Kallusinduktion keine Suspensionskulturen etabliert werden, und eine weitere Optimierung des Protokolls war erforderlich. Der zweite Grund waren die Durchmesser der Zellen aus Suspensionsmedien, die im Vergleich zu den Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten, die aus anderen Ausgangsmaterialien gewonnen worden waren, ca. 9 mal (900 %) kleiner (Tab. 4.7) und deswegen als Partnerkandidaten für die Fusion nicht geeignet waren. Sie verteilten sich nach der PEG-Behandlung nicht gleichmäßig in der

Lösung und bildeten meist miteinander Aggregate, so dass sie oft nicht mit den Protoplasten der anderen Fusionspartner aggregierten. Der Einsatz von Protoplasten mit solch unterschiedlichen Durchmessern kann bei der Elektrofusion problematisch sein, weil die angewendeten Pulse bei Elektrofusionen laut der Gleichung  $V = 1,5 \cdot r \cdot E \cdot \cos\alpha$  nach dem Radius der Protoplasten eingerichtet wurden (ZIMMERMANN UND SCHEURLICH 1981). Drittens zeigten die aus Suspensionskultur kultivierten Protoplasten auf dem Sprossinduktionsmedium keine Differenzierung und bildeten nur eine Masse von Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Vergleichstest von VASIL ET AL. (1981) überein, bei dem bei Weizen aus Suspensionskultur ohne Induktion von somatischen Embryonen keine Sprossregeneration erfolgte.

Da die anzuwendenden Enzymkonzentrationen an jede Pflanzenart und an jeden Genotypen speziell angepasst werden müssen, wäre ein Vergleich mit Lösungen, die für andere Arten eingesetzt werden, wenig aussagekräftig (WINKELMANN 1994). Zur Optimierung der Enzymlösungen wurde zuerst die Konzentration von 2 % Cellulase und 0,5 % Macerozyme, jedoch ohne Driselase, die von WINKELMANN (1994) für *Saintpaulia ionantha* verwendet wurde (EI), eingesetzt. Auf die Verwendung von Driselase wurde verzichtet, weil sie keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute zeigte (Daten wurden nicht dargestellt) und möglicherweise negative Auswirkungen auf die Vitalität der Protoplasten hatten (KAO UND WETTER 1977). Danach wurden die Konzentrationen von Cellulase und Macerozyme variiert (EII und EIII) und die durch verschiedene Konzentrationen gewonnenen Protoplastenausbeuten miteinander verglichen (Tab. 4.4, Abb. 4.8). Die Ergebnisse zeigten, dass die für *Streptocarpus*-Arten geeignete Konzentration höher als die Enzymkonzentration für *Saintpaulia ionantha* war. Dabei wurden bei einigen Varianten durch EII und bei anderen Varianten durch EIII höhere Ausbeuten erbracht. Da jedoch die Enzympräparationen stets Verunreinigungen durch toxisch wirkende Bestandteile wie proteolytische Enzyme und Nuklease enthielten, die zu irreversiblen Schädigungen der Protoplasten führen könnten (EVANS UND COOKING 1975; BILKEY UND COOKING 1982; MAHESHWARI ET AL. 1986), wurde für alle *Streptocarpus*-Arten bei weiteren Versuchen die niedrigere Konzentration von 2 % Cellulase und 1 % Macerozyme (EII) verwendet.

Sowohl kürzere als auch längere Inkubationszeiten als 16 Stunden in der Enzymlösung führten zur Reduzierung der Anzahl der Protoplasten. Erst als die Proben nach der Inkubation für mehr als eine Stunde (ca. 2 Stunden) auf dem Kreisschüttler verblieben, stieg die Ausbeute (Daten nicht aufgeführt).

Insgesamt wurde durch mehrere unabhängige Versuche festgestellt, dass die

Enzymkonzentrationen im Vergleich zu den Pflanzenmaterialien weniger Einfluss auf die Anzahl der gewonnenen Protoplasten hatten. Diese Beobachtung stimmt mit den Befunden von SCHUM ET AL. (2002) bei Rosen überein, dass die Ausbeute mehr vom Ausgangsmaterial und weniger von der Enzymkonzentration abhängt.

Nach dem Ausgangsmaterial spielen die Kulturbedingungen der Protoplasten, zu denen auch die Auswahl des Kulturmediums gehört, eine entscheidende Rolle für die Zellteilung und die weitere Entwicklung der Protoplasten. Das Medium 8p von KAO UND MYCHAYLUK (1975) wurde bei vielen Arten erfolgreich zur Protoplastenkultur verwendet. Es wurde von WINKELMANN (1994) für *Saintpaulia ionantha* als 8pm7 optimiert und verwendet und im Rahmen dieser Arbeit variiert, weil die erzielten Zellteilungsfrequenzen bei *Streptocarpus* gering waren.

Die Ergebnisse aus Versuchen zur In-vitro-Sprossregeneration an Blattexplantaten zeigten, dass sich eine höhere Auxin-Zugabe zum Nährmedium positiv auf die Regeneration von *Streptocarpus*-Arten auswirkte (AFKHAMI 2002). Bei der Protoplastenkultur stiegen die Teilungsfrequenzen beider untersuchter *Streptocarpus*-Arten mit Verdopplung der NAA-Konzentration im Protoplastenkulturmedium 8pm7-a (Tab. 4.2) deutlich von 0,7 % auf 2,3 % bei S1 und von 1,1 % auf 2,2 % bei S3 (Tab. 4.9).

Weitere Änderungen zur Optimierung des Kulturmediums bestanden in der Erhöhung der Kalziumkonzentration ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ). Kalzium erhöht die Stabilität der Membrane (BHOJWANI UND RAZDAN 1996) und kann daher die Anzahl geplatzter Protoplasten reduzieren. KAO UND MICHAYLUK (1974) berichteten, dass die Zugabe von  $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ CaCl}_2$  zum Medium B5 zur Verbesserung der Zellteilung bzw. der Protoplastenkultur bei *Vicia hajastana* und *Bromus inermis* führte. In dieser Arbeit stiegen die Zellteilungsfrequenzen beim Kulturmedium 8pm7-ac, das außer einem hohen Auxingehalt (NAA) auch eine Verdopplung des Kalziumgehaltes beinhaltete, um weitere 0,2 (S1) bzw. 0,5 % (S3) (Tab. 4.10).

Ein kritischer Stoff im Kulturmedium ist Ammonium, das auf die Protoplasten von mehreren Arten toxisch wirkte. Von der Toxizität von Ammonium wurde bei *Brassica* (MENCZEL UND WOLFE 1984), *Citrus* (GROSSER UND GMITTER 1990) und *Populus* (RUSSEL UND MCCOWN 1986) berichtet. Auch BHOJWANI UND RAZDAN (1996) bestätigten die schädlichen Auswirkungen von Ammonium auf die Protoplastenkultur und zitierten eine Reihe von Berichten, die bei denen eine Reduzierung (*Vicia hajastana* und *Bromus inermis* bei KAO UND MICHAYLUK 1974); *Broussonetia kazinoki* bei OKA UND OHYAMA 1985) oder Eliminierung

(*Solanum tuberosum* bei UPADHYA 1975; *Lycopersicon sp.* bei ZAPATA ET AL. 1981) von Ammonium aus dem Protoplastenkulturmedium zu Zellteilungen bzw. verbesserten Zellteilungen führte.

Um die toxischen Wirkungen von Ammonium zu eliminieren und gleichzeitig die Stickstoffversorgung der Protoplasten aufrecht zu erhalten, wurde im Protoplastenkulturmedium für einige empfindliche Arten wie *Populus* (RUSSEL UND MCCOWN 1986) oder *Citrus* (GROSSER UND GMITTER 1990) Ammonium durch Glutamin ( $C_5H_{10}N_2O_3$ ) ersetzt.

Eine mögliche Erhöhung der Zellteilung durch Verwendung von Glutamin anstelle von Ammoniumnitrat ( $NH_4NO_3$ ) wurde an zwei *Streptocarpus*-Arten (s. 4.3.5) überprüft. Bei beiden Arten stieg die Zellteilungsfrequenz durch Ersetzen von Ammonium durch Glutamin im Protoplastenkulturmedium (8pm7-b) nur um 0,1 % (Tab. 4.9). Laut diesen Ergebnissen wurde keine deutliche Änderung bzw. Schädigung durch die Anwendung von 300 mg / l  $NH_4NO_3$  im Protoplastenkulturmedium in Bezug auf die Zellteilung bei *Streptocarpus*-Arten festgestellt.

Bei der Kultur der Protoplasten, besonders im flüssigen Medium, ist für die Zellteilung ein richtig eingestellter osmotischer Druck erforderlich (BHOJWANI UND RAZDAN 1996). Vor der Zellwandbildung benötigen Protoplasten eine Osmolarität zwischen 500 und 600 mmol  $l^{-1}$  im Medium. Diese Osmolarität kann durch Mannitol, Sorbitol (SCOTT ET AL. 1978; ARNOLD UND ERIKSSON 1975) oder Glukose (GAMBORG ET AL. 1975; KAO UND MICHAYLUK 1975; EVANS ET AL. 1980) erreicht werden.

In dieser Arbeit wurde die Osmolarität der Protoplastenkulturmedien wie bei WINKELMANN (1994) durch Zugabe von Saccharose geregelt, und die Protoplasten von drei *Streptocarpus*-Arten wurden im flüssigen Medium 8pm7 mit Osmolaritäten zwischen 400 und 650 mOsmol / kg  $H_2O$  kultiviert (s. 4.3.6). Durchmesser und Vitalität der Protoplasten wurden zu zwei Zeitpunkten (nach drei und sieben Tagen) berechnet. Insgesamt reduzierten sich die Durchmesser der Protoplasten mit Zunahme des osmotischen Drucks ab 400 mOsmol / kg  $H_2O$  im Kulturmedium; ab 500 mOsmol / kg  $H_2O$  wurden drei Tage nach der Kultur keine deutlichen Änderungen bei den Durchmessern der Protoplasten beobachtet (Abb. 4.16). Abbildung 4.17 zeigt, dass die Vitalität der Protoplasten in den flüssigen Medien in unterschiedlichem Maße abnahm. Die geringste Verschlechterung der Vitalität fand im Medium mit 550 mOsmol / kg  $H_2O$  statt. Abbildung 4.17 zeigt auch eine leichte Änderung der Vitalität der Protoplasten, als sie in Medien mit niedrigerer Osmolarität kultiviert wurden. Eine Zunahme der Osmolarität der Kulturmedien führte dagegen zu einer starken

Verschlechterung der Vitalität der Protoplasten. Bei Betrachtung beider Aspekte, also der Änderungen der Durchmesser (Abb. 4.16) und der Vitalität der Protoplasten (Abb. 4.17) unter verschiedenen Osmolaritäten wurde deutlich, dass die geeignete Osmolarität des Kulturmediums für die Protoplasten von *Streptocarpus* um 550 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O lag.

Zu den Kulturbedingungen gehört auch die Kulturmethode, die von WINKELMANN (1994) neben dem Ausgangsmaterial als zweiter entscheidender Einflussfaktor für den Regenerationserfolg bei *Saintpaulia ionantha* genannt wurde.

In mehreren Vergleichstests wurde festgestellt, dass bei Protoplasten von *Streptocarpus*-Arten im flüssigen Medium, trotz kontrollierter Dichte ( $1,5 \times 10^5$ ) und Anwendung von für den vollständigen Austausch des Mediums während der Kulturzeit geeigneten Gefäßen (Abb. 4.1), keine Zellteilung induziert wurde und die Protoplasten nach wenigen Tagen kollabierten. Diese Ergebnisse widersprachen teilweise den auf andere Kulturen bezogenen Literaturangaben: GOSCH ET AL. (1975) stellten fest, dass sich die Protoplasten mancher Arten nicht im festen Medium teilen konnten. Aufgrund der Möglichkeit, zum einen die Osmolarität des Mediums während der Kultur effektiv reduzieren zu können, und zum anderen toxische Stoffe, die durch die Degeneration mancher Protoplasten entstehen, durch den Wechsel des Mediums beseitigen sowie die Dichte der Protoplasten im flüssigen Medium nach der Kultur ändern zu können, nahmen BHOJWANI UND RAZDAN (1981) die Kultur im flüssigen Medium als vorteilhaft an.

Jedoch wurden bei den Protoplasten von *Streptocarpus* nur Zellteilungen beobachtet, wenn sie in Alginatfilme eingebettet waren. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Autoren, die bei der Kultur der Protoplasten eine mechanische Stabilisierung als für die Zellwandbildung und Zellteilung notwendig erachten (BINDING ET AL. 1981; WINKELMANN 1994). Seitdem ADAOHA UND ROSCOE (1982) die Kultur von *Petunia* durch Einbetten in Alginatfilm veröffentlichte, wurde diese Methode bei mehreren Pflanzen erfolgreich verwendet und führte Protoplasten zu Zellteilungen (TRICOLI ET AL. 1986; DRAGET ET AL. 1988a, 1988b; SVOBODA UND OUREDNIČEK 1990; NIEDZ 1993; WINKELMANN 1994; SCHUM UND HOFMANN 2001; EBRAHIMZADEH ET AL. 2000; XIAOKE ET AL. 2007; KARAMIAN UND RANJBAR 2008; PATIP ET AL. 2008; WANGLER ET AL. 2009). Von positiven Wirkungen einer mechanischen Stabilität durch Alginat auf die Zellteilung und die weitere Entwicklung der Protoplasten wurde auch bei anderen Arten wie *Beta vulgaris* (HALL ET AL. 1983), *Arabidopsis thaliana* (KARESCH ET AL. 1991) und *Avena sativa* (HAHNE ET AL. 1991) berichtet. SHILLITO ET AL. (1983) hatten durch mehrere Untersuchungen von verschiedenen Kulturmethoden bei *Hyoscyamus muticus*, *Lycopersicum esculentum*, *Crepis capillaris* und *Brassica rapa* festgestellt, dass die toxischen

Effekte von Agar, die zumindest teilweise durch diffundierende Fremdstoffe entstehen, durch Reinigung mit Ethanol oder durch Vakuum nicht beseitigt, die toxischen Stoffe, die durch die Entwicklung der in Agarose eingebetteten Protoplasten freigesetzt wurden, jedoch durch Wechseln des Mediums aus dem Kulturbereich entfernt werden konnten. Sie beobachteten, dass die in Agarose kultivierten Protoplasten im Vergleich zu in flüssigem Medium kultivierten Protoplasten bessere Zellkolonien bildeten.

Obwohl durch Kultur in Agarose eine Immobilisierung der Protoplasten erreicht werden kann, entstehen möglicherweise Nachteile durch die Temperatur (35 °C). Durch Kultur in Alginat wird eine sowohl in Bezug auf die Ernährung als auch in Bezug auf die Entfernung von Schadstoffen geeignete Situation für Protoplasten hergestellt. In einem Vergleichstest bei den Protoplasten von *Nicotiana tabacum* und *Petunia inflata* wurde festgestellt, dass sich in Alginatfilm eingebettete Protoplasten von Tabak manchmal früher teilten und sie dichtere Kolonien bildeten als in Agar kultivierte (ADAOHA UND ROSCOE 1982).

Weitere von verschiedenen Autoren festgestellte Vorteile von Alginat, wie die verbesserte Kalziumversorgung der Protoplasten, die zu höherer Stabilität der Membranen führte (DAMM UND WILLMITZER 1998), die bessere Versorgung mit Nährstoffen (SMIDSRØD UND SKJÅK-BÆK 1990; MAHESHWARI ET AL. 1986), die Verzögerung der Alterungsprozesse der Protoplasten sowie unbekannt positive Wirkungen von Alginat (SCHNABLE ET AL. 1983) wurden von WINKELMANN (1994) ausführlich diskutiert.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Zellteilung bei Protoplasten von *Sainpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten ähnlich beeinflusste, war die Dichte der Protoplasten in den Alginatfilmen. Für die Zellteilung brauchen Protoplasten normalerweise eine Dichte von  $1 \times 10^4$  / ml bis  $5 \times 10^5$  / ml (HANSEN ET AL. 1998). Die geeignete Dichte für Protoplasten sowohl von *Streptocarpus*-Arten als auch von *Sainpaulia ionantha* betrug  $1,5 \times 10^5$  / ml (WINKELMANN 1995). Bei ungleichmäßiger Verteilung der Protoplasten zeigte sich, dass die Protoplasten, wie bei den Usambaraveilchen (WINKELMANN 1995), bei niedriger Dichte weniger oder keine Zellteilung zeigten, wogegen bei höherer Dichte häufiger Teilung stattfand (s. 4.3.7).

Zur Förderung der Zellteilung bei den Protoplasten von *Streptocarpus* wurde die „feeder cell layer“-Technik bzw. „nurse technique“ verwendet. Diese Technik wurde von RAVEH ET AL. (1979) für die Kultur von Protoplasten mit einer geringen Dichte von 10-100 / ml sowie für die Förderung der Zellteilung von Protoplasten, die sich selbst nicht teilten, entwickelt. Die

Methode wurde für einige Pflanzen optimiert und erfolgreich verwendet. Beispielsweise konnten sich Protoplasten von Gerste, Tabak und Raps (EIGEL UND KOOP 1989; SCHAFFLER UND KOOP 1990) durch diese Methode teilen. JAIN ET AL. (1995) verwendeten bei zwei Indica-Reis-Sorten, deren Protoplasten sich nicht teilen konnten, die Protoplasten von *Oryza ridleyi* oder *Lilium multiflorum* als „feeder cell layer“ und induzierten damit Zellteilung. KYOZUKA ET AL. (1987) und LIU ET AL. (1999) konnten durch aktive Zellsuspensionen von Reis, die durch einen Nitrocellulosefilter von den Protoplasten getrennt wurden, die Protoplasten von Reis zur Teilung führen. Suspensionskultur wurde von ASSANI ET AL. (2005) auch bei Bananenprotoplasten als „feeder cell layer“ zur Induzierung der Zellteilung angewendet.

SCHUM ET AL. (2002) konnten durch die Anwendung von schnell wachsenden Protoplasten als „feeder cell layer“ die Zellteilung von Protoplastenkulturen bei Rosen fördern. Die Protoplasten von Reis (*Oryza sativa*) konnten als „nurse culture“ Zellteilungen bei Bananenprotoplasten induzieren (KAZUMITSU ET AL. 2002). HANSEN (1998) plattierte Protoplasten aus Blättern von *Brassica oleraceae* und *Camelina sativa* auf einer Membran, überführte diese auf eine Schicht von Zellen aus Zellsuspensionen von Raps (*B. napus*) auf festem Medium und konnte auf diese Weise 2903 Kallusse gewinnen.

Zur Förderung der Zellteilung bei Protoplasten von vier *Streptocarpus*-Arten (S1, S3, S12 und S25) wurde ebenfalls die „feeder cell layer“-Technik getestet. In zwei unabhängigen Versuchen wurden die Protoplasten aus *Streptocarpus*-Arten mit aktiven Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Nicotiana tabacum* kultiviert (s. 4.2.9.4). Bei keinem der Ansätze wurde eine Induzierung von Zellteilung durch die aktiven Protoplasten von *Nicotiana tabacum* oder *Saintpaulia ionantha* bei *Streptocarpus*-Arten beobachtet.

Durch die Anwendung von Protoplasten von *Brassica juncea* als „nurse culture“ erreichten CHEN ET AL. (2004), dass die Protoplasten von *Brassica oleraceae* Mikrocallusse bilden, die anschließend zur Sprossbildung führten. Sie verwendeten zwei Methoden: a) Protoplasten von beiden Pflanzen wurden in einem Verhältnis von 1 zu 1 gemischt und im Medium kultiviert; b) Agarose-Blöcke mit den Protoplasten von *Brassica oleraceae* wurden zerschnitten und in Petrischalen mit kultivierten *Brassica juncea*-Protoplasten transportiert.

Bei Versuchen, die in Kapitel 5 ausführlich beschrieben werden, wurden bei der Fusion der Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und verschiedenen *Streptocarpus*-Arten in einigen Proben als „Kontrolle“ Protoplasten von beiden Fusionspartnern wie bei der ersten Variante von CHEN ET AL. (2004) in einem Verhältnis von 1 zu 1 gemischt und im Medium kultiviert. Bei den Zellteilungen bildeten sich stets nur aus den Protoplasten eines Partners

Mikrokallusse, nie aus beiden. Bei diesen Proben wurden entweder an allen Kallussen Sprosse gebildet, die später als *Saintpaulia ionantha* identifiziert wurden, oder es wurden an keinem der Kallusse Sprosse gebildet, was ein Hinweis auf *Streptocarpus* war.

Die physiologischen Wirkungen der Dichte oder des „feeder cell layer“ auf die Teilung der Protoplasten führen einige Autoren auf Brassinolide zurück. Brassinolide sind natürliche Produkte von Pflanzen mit einer den Steroid-Hormonen bei Tieren ähnlichen Struktur. Über die Rolle von Brassinoliden in Bezug auf das Wachstum von Pflanzen gibt es unterschiedliche Auffassungen (OH UND CLOUSE 1988). ROTH ET AL. (1989) berichten, dass Brassinolide das Wachstum von Kallussen und Suspensionskulturen von *Nicotiana tabacum*, die durch *Agrobacterium tumefaciens* transformiert wurden, verhinderten.

SALA UND SALA (1985) kamen zu dem Ergebnis, dass Brassinolide die Zellstreckung bei der Suspensionskultur von Karotten förderten, aber keinen Einfluss auf die Zellteilungen zeigten.

KAUSCHMANN ET AL. (1996) untersuchten brassinolidempfindliche und brassinolidunempfindliche Mutanten bei *Arabidopsis thaliana*. Sie stellten fest, dass die Durchmesser der Zellen durch Brassinolide reduziert wurden.

Dagegen berichteten manche Forscher auch von positiven Wirkungen von Brassinoliden. Sie vertreten die Auffassung, dass Brassinolide für die Stimulierung der Zellstreckung und Zellteilung verantwortlich sind, was zum Wachstum der Pflanzen führt (CLUSE UND ZUREK 1991; NAKAJIMA ET AL. 1996; OH UND CLOUSE 1998).

Die Zellen aus Protoplasten von *Petunia hybrida* konnten sich unter optimalen Bedingungen 12 Stunden früher teilen, als die Kultur mit 0,1-1.0  $\mu\text{M}$  Brassinoliden behandelt wurde (OH UND CLOUSE 1998).

Die Untersuchung des Einflusses der Brassinolide auf die Zellteilung war nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse in Bezug auf „feeder cell layer“ stimmen jedoch mit den Ergebnissen jener Autoren überein, die Brassinolide als störenden Faktor für Wachstum und Entwicklung der Zellen identifizierten. Die Ergebnisse in Bezug auf die für die Zellteilung als geeignet ermittelte Dichte entsprechen hingegen den Auffassungen der Autoren, die Brassinolide als positiven Faktor für die Zellteilungen benannten.

Eine Erklärung für die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit in Bezug auf Dichte und „feeder cell layer“ könnte sich aus zukünftigen Untersuchungen der Brassinolide bei *Streptocarpus* und *Saintpaulia* ergeben und vielleicht die erfolglosen Ergebnisse aus „feeder cell layer“ bei *Streptocarpus* erklären.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich nur die Protoplasten von S1 und S3, die aus in flüssigem Medium in der Dunkelheit kultivierten Blättern isoliert worden waren, bis zum Kallusstadium

entwickeln konnten. Diese Kallusse bildeten, wie auch die Kallusse von *Saintpaulia ionantha*, auf dem festen Medium KF2 teilweise Wurzeln (s. 3.3.3), konnten aber auf dem Medium KR10 keine Sprosse bilden (s. 4.3.8). Daher wurden sie zur Sprossinduktion und Sprossbildung auf Medien mit verschiedenen Arten und Konzentrationen von Wachstumsregulatoren und weiteren Zusätzen umgesetzt (s. Tab. 4.3). Leider wurden bei diesen Versuche keine Sprossbildungen aus Kallussen beobachtet. Die Sprossinduktion aus Mesophyllzellen wurde bei einigen Arten als schwer oder unmöglich beschrieben, wahrscheinlich aufgrund der hohen Differenzierung der Mesophyllzellen (EVANS UND COCKING 1975).

WANG ET AL. (1991) stellten in einem Vergleichstest bei Protoplasten von Mais fest, dass die Zellwandregeneration bei Protoplasten aus Mesophyllzellen im Vergleich zu Protoplasten aus Suspensionskultur langsamer und oft unregelmäßig in unorganisierten Fibrillen erfolgte. Dadurch bildeten die Protoplasten aus Mesophyllzellen schwächere Zellwände, und die Teilungsfrequenzen von Protoplasten aus Mesophyllzellen waren geringer (WANG ET AL. 1991). Auch GÜREL ET AL. (2002) berichteten, dass die Protoplasten aus Mesophyllzellen bei *Beta vulgaris* nach der Fusion abstarben, die Protoplasten aus Suspensionskultur sich aber nach fünf bis zehn Tagen teilten und Mikrocallusse bildeten.

ZHANG ET AL. (1998) führten einen Versuch mit *Brassica campestris* durch, in dem sie zu dem Ergebnis kamen, dass der Zusatz von  $\text{AgNO}_3$  zum Kulturmedium zur Sprossregeneration führte. Von positiven Auswirkungen von  $\text{AgNO}_3$  auf die Sprossbildung berichteten mehrere Autoren: *Helianthus annuus* (CHRAIBI ET AL. 1991), *Albizia julibrissin* (SANKHLA ET AL. 1995), *Arachis hypogaea* L. (PESTANA ET AL. 1999), Raps (AKASAKA-AKENNEDY ET AL. 2005), Birne (XU ET AL. 2002; ZHAO ET AL. 2007), *Pyrus spp* (LIU ET AL. 2009).

AKASAKA-AKENNEDY ET AL. (2005) verwendeten ein Verfahren, das der Variante F in dieser Arbeit ähnelte (Tab. 4.3). Zur Sprossinduktion kultivierten sie zuerst die Kallusse von 48 Rapssorten auf einem Kulturmedium, das 5 mg / l BAP, 5 mg / l NAA und 3 mg / l  $\text{AgNO}_3$  enthielt. Nach einer Woche überführten sie die Kallusse zur Sprossbildung auf ein Kulturmedium mit 3 mg / l BAP und 1 mg / l Zeatin und konnten so bei 47 Sorten Sprossbildungen beobachten. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Sprossbildung in vitro von Ethylen unterdrückt wurde und die Wirkung von Ethylen durch  $\text{AgNO}_3$  gehemmt werden konnte. Durch  $\text{AgNO}_3$  wurde die Weiteleitung des Ethylensignals unterbrochen, was zur Sprossinduktion führte. Andere Autoren stellten fest, dass die Produktion von Ethylen durch  $\text{Ag}^+$  gehemmt wurde. Bei einem Versuch wurde der Einfluss von  $\text{AgNO}_3$  auf die Konzentration von Ethylen in der Kultur und auf die Sprossregeneration von *Helianthus*

*annuus* untersucht (CHRAIBI ET AL. 1991). Die Autoren stellten fest, dass 5  $\mu\text{M}$   $\text{Ag}^+$  zur signifikanten Reduzierung von Ethylen und dadurch zur Stimulation von Sprossbildung führte. Sie vermuteten, dass das Ethylen die Aktivität der Arginindecarboxylase blockierte und dadurch den Stoffwechsel von Polyamin beeinflussen könnte. Der Zusammenhang zwischen Polyamin und der Stimulierung von Sprossbildung wurde bei bisherigen Untersuchungen jedoch nicht eindeutig geklärt. Eine weitere Erklärung für die Blockierung der Ethylenreaktionen und die positive Wirkung von  $\text{Ag}^+$  auf die Sprossregeneration geht auf Untersuchungen von RODRIGUEZ ET AL. (1999) zurück. Sie stellten fest, dass der in den Membranen vorhandene ETR1-Rezeptor das gasförmige Hormon Ethylen band. Dabei stellte sich heraus, dass ein mit dem Rezeptor verbundenes Kupfer-Ion für die ethylenbindende Aktivität erforderlich war, das bei der Zugabe von Silbernitrat durch ein  $\text{Ag}$ -Ion ersetzt wurde.

Die Auswirkungen von TDZ auf die Sprossinduktion wurden von mehreren Autoren bei anderen Arten dargelegt (ELLIS ET AL. 1991; LU 1993; HUETTEMAN UND PREECE 1993; WINKELMANN 1994; NAKANO ET AL. 1995; OCHATT ET AL. 2001; GAIRI UND RASHID 2004). ELLIS ET AL. (1991) und LU (1993) vertreten die Auffassung, dass TDZ für die Regeneration bei Gehölzen effektiver ist als purinartige Cytokinine wie BAP, Kinetin und Zeatin. GAIRI UND RASHID (2004) kultivierten Kallusse von Indica-Reis (Sorte 'Jumala') auf Medien mit 10  $\mu\text{M}$  TDZ (ähnlich der Variante B, Tab. 4.3) oder BAP (ähnlich den Varianten A und E, Tab. 4.3). Nach zehn bis 15 Tagen bildeten sich aus den Kallussen Sprosse. Die Autoren berichten, dass TDZ effektiver für die Sprossbildung wirkte als BAP. OCHATT ET AL. (2001) hatten die Protoplasten von Erbsen aus Blättern isoliert und kultivierten die Kallusse zur Sprossregeneration erfolgreich auf Kulturmedien, die geringe Mengen Auxin (0,01 mg / l oder 0,05 mg / l NAA) und hohe Mengen BAP (5,0 mg / l, s. Variante I, Tab. 4.3) enthielten, sowie auf auxinfreien Medien mit TDZ oder Zeatin (s. Varianten F und G, Tab. 4.3).

NAKANO ET AL. (1995) verwendeten zur Protoplastenisolierung von *Gentiana triflora* Mesophyllzellen aus In-vitro-Kultur. Nach der Kultur der Protoplasten beobachteten sie, dass die höchste Anzahl von Zellteilungen (25,6 %) durch eine Kombination von TDZ und NAA erreicht wurde. Als sie die Kallusse auf dem B5-Medium mit verschiedenen Kombinationen von Wachstumsregulatoren wie NAA, BAP und TDZ kultivierten, wurde nur durch eine Kombination von NAA und TDZ (s. Variante B, Tab. 4.4) Sprossinduktion stimuliert und Sprossregeneration beobachtet.

Zur Kalluskultur bei *Streptocarpus*-Arten ist festzustellen, dass auch die während der Protoplastenkultur verwendeten Auxine zu Wurzelbildung bei den Kallussen führten. Bei

Kalluskultur zeigte NAA einen starken Einfluss auf die Wurzelbildungen, und in Kombination mit 2iP und Adeninsulfat bildeten sich zahlreiche weiße, haarförmige, dünne Wurzeln. TDZ führte zur Bildung kugelförmiger Kallusse. Zeatin führte zur Bildung kleiner Kallusse; in Kombination mit IAA bildeten sich dicke, braune Wurzeln, die leicht zerbrachen (Abb. 4.22).

Voraussetzungen für die Durchführung von Protoplastenfusion sind, dass sich aus Pflanzen beider Partner Protoplasten isolieren lassen und dass die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten zumindest für einen Partner möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde Sprossregeneration aus den Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* etabliert (Kapitel 3). Bei drei *Streptocarpus*-Arten (S1, S2 und S3) wurden aus Blättern aus im flüssigen Medium kultivierten Sprossen und bei zwei *Streptocarpus*-Arten (S12 und S25) aus den Stängeln aus auf dem festen Medium kultivierten Sprossen zahlreiche Protoplasten gewonnen. Bei vier Arten entwickelten sich die Protoplasten bis zu Mikrokallusbildungen, und bei zwei Arten wurden Kallusse gewonnen (Kapitel 4). Obwohl bei der Kultur der Protoplasten von *Streptocarpus*-Arten keine Sprossregenerationen erreicht wurden, wurden Versuche für Protoplastenfusionen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten durchgeführt, da die Voraussetzungen für die Protoplastenfusion erreicht waren. Auch wurden Protoplastenfusionen innerhalb der *Streptocarpus*-Arten durchgeführt, in der Hoffnung, dass durch weitere Untersuchungen die Regeneration von Sprossen aus Protoplasten von *Streptocarpus* erreicht wird. Diese Untersuchungen werden im folgenden Kapitel dargestellt.

## 5 Protoplastenfusion

### 5.1 Einleitung

Zu den neuen Techniken, derer sich Züchter bedienen, um die genetische Variabilität bei Pflanzen zu erhöhen, gehört die Protoplastenfusion.

Protoplastenfusion bezeichnet die Verschmelzung zweier Zellen, deren Zellwände z.B. durch Enzyme aufgelöst wurden. Durch Protoplastenfusion können somatische Hybriden oder Cybriden erzeugt werden, die durch sexuelle Kreuzungen nicht hergestellt werden könnten. Bei einer sexuellen Kreuzung fusionieren haploide Zellen, die aus einer vorangegangenen Meiose entstanden sind. Bei der Fusion somatischer diploider Zellen ist ein tetraploides Fusionsprodukt zu erwarten, sofern auch die Zellkerne fusionieren. Bei der somatischen Hybridisierung werden im Gegensatz zur gametischen Hybridisierung alle cytoplasmatischen Komponenten miteinander vermischt. Dabei werden außer den Kerngenomen häufig auch die Mitochondriengenome und selten die Chloroplastengenome rekombiniert, und oft werden die Chloroplasten von einem Fusionspartner im neuen Produkt eliminiert (BHOJWANI UND RAZDAN 1996).

Bereits während des Abbaus der Zellwände fusionieren einige Protoplasten miteinander (MILLER ET AL. 1971; MOTOYOSHI 1971). Diese Art von Protoplastenfusion wurde „spontane Fusion“ genannt. Der Prozess kann durch die Anwendung von teilenden Zellen, wie z.B. Kallussen oder Zellen aus Suspensionen als Ausgangsmaterial verstärkt werden. Der Anteil mehrkerniger Protoplasten lag bei bis zu 50 %, wenn Kallusse, die aus Endosperm von Mais entstanden waren, für die Isolation der Protoplasten verwendet wurden (MOTOYOSHI 1971). Insgesamt sind die Fusionsraten bei spontanen Fusionen jedoch zu niedrig für eine Anwendung in der Züchtung.

Die Oberflächen der Protoplasten sind stark negativ geladen. Intakte Protoplasten stoßen einander deshalb in der Suspension ab. Zur Neutralisation der Oberflächenladung wurden verschiedene Chemikalien verwendet. KÜSTER (1909) verwendete  $\text{NaNO}_3$  für die Fusion von Epidermiszellen, von einer gezielten Protoplastenfusion mit Hilfe von Natriumnitrat berichtete später auch POWER (1970). Zwei Jahre später dokumentierten CARLSON ET AL. (1972) die erste durch diese Methode erzeugte somatische Hybridpflanze aus den Protoplasten von zwei Arten (BHOJWANI UND RAZDAN 1996).

Bei der Fusion der Protoplasten sind ein hoher pH-Wert und Kalzium-Ionen sehr wirkungsvoll. 1973 berichteten KELLER UND MELCHERS von einer Fusion zwischen zwei Tabak-Linien durch einen hohen pH-Wert von 10,5 und reichlich  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) bei 37

°C. Die Anwendung dieser Methode von MELCHERS UND LABIB (1974) und MELCHERS (1977) führte bei der Gattung *Nicotiana* zu intra- bzw. interspezifischen Fusionen. POWER ET AL. (1980) konnten durch diese Methode eine erfolgreiche Fusion bei Petunien durchführen.

1974 verwendeten KAO UND MICHAYLUK erstmals Polyethylenglycol, wodurch die Protoplasten vernetzt und zur Fusion gebracht werden konnten. Weil PEG reproduzierbar wirkt und die Häufigkeit von Zellfusionen, besonders von Produkten mit zwei Kernen, erhöht, wird immer häufiger PEG für die Protoplastenfusion verwendet (BHOJWANI UND RAZDAN 1996).

Die Wirksamkeit von PEG wird durch die Anwesenheit von Kalzium-Ionen und durch höheren pH-Wert verstärkt. Diese Methode wurde für die Protoplastenfusion bei mehreren Pflanzen (Sojabohnen, Mais, Gerste; KAO ET AL. 1974), Tieren (AHKONG ET AL. 1975), Tieren mit Pilzen (AHKONG ET AL. 1975) und Tieren mit höheren Pflanzen (COCKING UND PEBERDY 1974; DUDITS ET AL. 1976; DAVEY ET AL. 1978) angewendet.

Als Alternative zur chemischen Protoplastenfusion kann ein elektrisches Feld angelegt und die Verschmelzung der Protoplasten mit elektrischem Strom durchgeführt werden. Diese Methode wurde erstmals von ZIMMERMANN UND SCHEURICH (1981) verwendet. Bei der Elektrofusion werden die Protoplasten von beiden Partnern in eine Fusionsmikrokammer eingebracht, in der sich zwei Elektroden befinden. Zunächst wird ein Wechselstrom (5-10 Volt) mit hoher Frequenz (0,5 – 1,0 MHz) angelegt. Falls sich mehrere Protoplasten in den Fusionsmikrokammern befinden, bilden sie innerhalb weniger Minuten durch Elektrophorese eine Kette von Elektrode zu Elektrode. Wenn die Protoplasten miteinander in Kontakt gebracht werden, sind die Voraussetzungen für die Fusion geschaffen. Die Fusion selbst wird durch einen oder zwei kurze, aber starke Pulse (etwa 1000 V / cm für 10-50 ms) induziert. Die Membranen werden dadurch geschädigt. In der Kontaktzone von Protoplast zu Protoplast bilden sich zunächst Poren. Dann kollabiert die Membran lokal völlig: es kommt zur Fusion, die sich leicht mikroskopisch verfolgen lässt.

Auch eine Kombination von Chemikalien und elektrischem Feld wurde zur Protoplastenfusion angewendet (DE FILIPPIS ET AL. 2000).

In den Kapiteln 3 und 4 wurden die Protoplastenisolation und -regeneration von *Saintpaulia ionantha*-Sorten und einigen *Streptocarpus*-Arten untersucht. Auf Basis dieser Untersuchungen werden im aktuellen Kapitel die Untersuchungen dargestellt, die zur Fusion zwischen *Saintpaulia ionantha*-Sorten und *Streptocarpus*-Arten auf der einen Seite und zur Protoplastenfusion zwischen der *Streptocarpus*-Arten auf der anderen Seite durchgeführt wurden.

## 5.2 Material und Methoden

### 5.2.1 Pflanzenmaterial

Für diese Versuche wurden die Protoplasten von zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten ('Claudia' und 'De Eewige Lente') und fünf *Streptocarpus*-Arten (S1: *S. saxorum* x *S. stomandrus*, S2: *S. saxorum*, S3: *S. caulescens*, S12: *S. glandulosissimus* und S25: *S. caulescens* v. *pallens*) (Tab. 2.2) verwendet.

### 5.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Medien für die Protoplastenfusion

Um ein geeignetes Protokoll für die Fusion zwischen *Saintpaulia* und *Streptocarpus* und innerhalb von *Streptocarpus* zu finden, wurden mehrere Protokolle getestet. Die verwendeten Lösungen, die für die Durchführung dieser Protokolle verwendet wurden, werden in Tabelle 5.1 aufgelistet. Alle PEG-Lösungen wurden vorbereitet und nach dem Autoklavieren bei 1,1 kg / cm<sup>2</sup> Dampfdruck und 121 °C in kleinen Portionen (5 ml) bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 5.1:** Einige für die Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia* und *Streptocarpus* und innerhalb von *Streptocarpella*-Arten verwendete Lösungen

Variante	Bestandteile der Vorbehandlungs-Lösung	Bestandteile der PEG-Lösung	Bestandteile der Nachbehandlungs-Lösung
<b>P1:</b> nach NAUMANN (1994)	<b>PS1:</b> 0,5 M Mannitol, 5 mM CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	<b>PEG1:</b> 2 M PEG 6000 (3 g PEG / 10 g H <sub>2</sub> O, 0,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	<b>PV1:</b> (PV1a: 50 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0,5 M Mannitol), (PV1b: 50 mM Glycin (pH-Wert: 10) )
<b>P2:</b> nach MOTTLEY (1996)	CPW 13 M (13 % w / v Mannitol)	<b>PEG2:</b> 2 M PEG 6000 (3 g PEG / 10 g H <sub>2</sub> O), 4 % Saccharose, 10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	DW9M (9 % w / v Mannitol)
<b>P3:</b> nach SCHUM UND HOFMANN (2001)	CPW: (0,2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 1 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 0,02 mM KJ, 0,01 mM CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O)	<b>PEG3:</b> 0,6 M Mannitol, 20 % PEG 6000, 1 M Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O, 110 mM HEPES (pH-Wert: 9,5)	275 mM Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
<b>P4:</b> nach NAKANO UND MII (1992)	0,5 M Mannitol	<b>PEG4:</b> 40 % PEG 6000, 50 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 50 mM HEPES (pH-Wert: 6,5)	<b>PV4:</b> 50 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0,5 M Mannitol (pH-Wert: 10,5)
<b>P5:</b> nach ASSANI ET AL. (2005)	<b>PS5:</b> 0,5 M Mannitol, 5 mM CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (pH-Wert: 6)	<b>PEG5:</b> 50 % PEG 6000, 0,5 M Mannitol, 0,5 M CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	<b>PV5:</b> 0,5 M Mannitol, 5 mM CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (pH-Wert: 6)
<b>P6</b>	<b>PS6:</b> 0,4 M Glukose, 3,5 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>PEG6:</b> 0,2 M Glukose, 2 M PEG 6000 (3 g PEG / 10 g H <sub>2</sub> O), 8 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM HEPES	<b>PV6:</b> BNE 9 (pH-Wert: 9,5)

CPW nach COCKING UND PEBERDY (1974) im Anhang (s. Tab. 9.13)

### 5.2.3 Versuche zur Optimierung des Protokolls für die Protoplastenfusion

Die Fusionen wurden nach verschiedenen Protokollen durchgeführt. Auf Grundlage der Beobachtungen wurde durch Optimierung des Protokolls P1 ein geeignetes Protokoll (P6) für Protoplastenfusionen zwischen *Saintpaulia* und *Streptocarpus* und innerhalb von *Streptocarpus*-Arten definiert. Die Protokolle werden im Anhang dargestellt (9.1)

#### 5.2.3.1 Protokoll P1 (nach NAUMANN 1994)

1. Die Protoplasten jedes Fusionspartners werden mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Pps / ml in PS1-Lösung suspendiert und in einem Verhältnis von 1 zu 1 gemischt.
2. Eine Probe in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml wird als Kontrolle entnommen.
3. Jeweils 225  $\mu$ l PEG-Lösung PEG1 (nach MENCZEL UND WOLFE 1984) werden in vier Tropfen in 6 cm Glasspetrischalen gegeben.
4. 150  $\mu$ l Protoplastensuspension PS1 werden in die Mitte der vier Tropfen zugegeben, so dass sich die PEG-Tropfen mit der Protoplastensuspension mischen und die Protoplasten nicht mit dem Boden der Petrischale in Kontakt kommen.
5. Weitere 225  $\mu$ l PEG-Lösung PEG1 werden darauf zugegeben. Die angegebenen Mengenverhältnisse gehen auf KAO UND MICHAYLUK (1974) und KAO ET AL. (1974) zurück.
6. Die Petrischale wird für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit werden die beiden Teile der Nachbehandlungslösung (PV1a und PV1b) miteinander gemischt.
7. Nach 20 min. werden langsam 500  $\mu$ l der Mischung aus PV1a und PV1b zugegeben.
8. Die Petrischale wird für 10 min. bei Raumtemperatur belassen.
9. 3 ml Pufferlösung 1 mit MES werden zugeben.
10. Die Fusionsprodukte werden mit einer Pipette mit weiter Öffnung abgesaugt und in ein steriles Glaszentrifugenröhrchen gefüllt.
11. Zusätzlich werden durch Zugabe von 5 ml Pufferlösung 1 mit MES die auf dem Boden der Petrischale verbliebenen Protoplasten gesammelt, abgesaugt und in das Röhrchen nachgefüllt.
12. Das Röhrchen wird für 6 min. bei  $40 \times g$  im Ausschwingrotor einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die intakten Protoplasten sammeln sich am Boden des Röhrchens.
13. Die Überstände werden abgesaugt.
14. Das Pellet wird zweimal in 10ml Pufferlösung 1 suspendiert und unter denselben

Bedingungen zentrifugiert.

15. Das Pellet wird zur Bestimmung des Titers, zur Einschätzung der zweikernigen Protoplasten und zur Abschätzung der Vitalität in 1 ml 0,5 M Mannit-Lösung suspendiert.

16. Die Fusionsprodukte werden in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml kultiviert.

### 5.2.3.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Protoplastenfusion

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Protoplastenfusion zu untersuchen, wurde in einem Vorversuch mit zwei Wiederholungen der pH-Wert der PEG-Lösung PEG1 vor und nach dem Autoklavieren gemessen. Dabei wurden zunächst zu jeder 1 ml PEG-Probe jeweils gleiche Volumen der Lösung PS1 (pH-Wert: 5,6) zugegeben und die pH-Werte der Proben gemessen. Nach Zugabe von 1 ml PV1 (pH-Wert: 10) wurden die pH-Werte der Proben wieder abgemessen.

Danach wurden in einem Versuch mit zwei Wiederholungen drei Varianten der PEG-Lösungen zubereitet und die pH-Werte der Varianten nach dem Autoklavieren und der Zugabe des gleichen Volumens von PS1 beobachtet. Die Varianten werden in folgender Tabelle (Tab. 5.2) dargestellt:

**Tabelle 5.2:** Varianten der PEG-Lösung PEG1

Variante	pH-Wert vor Autoklavieren	HEPES	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
A	5,8	0	8 mM
B	5,8	50 mM	8 mM
C	5,8	100 mM	8 mM

Weiterhin wurden die isolierten Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* U08 (s. 3.2.1) und *Streptocarpus* (*S. caulescens*) mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Pps / ml in PS1 suspendiert und in einem Verhältnis von 1 zu 1 gemischt. Danach wurden die Protoplasten nach Protokoll P1 fusioniert. Nach der PEG-Behandlung (Variante B) wurden drei Fusionseinheiten mit PV1 mit niedrigem pH-Wert (5,6) und drei weitere Fusionseinheiten mit PV1 mit hohem pH-Wert (9,5) verdünnt. Bei der Wiederholung wurden die Fusionen in acht Fusionseinheiten durchgeführt, davon wurde eine Hälfte mit niedrigem und eine Hälfte mit hohem pH-Wert behandelt. Nach den Fusionen wurden die gleich behandelten Fusionseinheiten miteinander gemischt und wie in Protokoll P1 beschrieben gereinigt. Danach wurden davon Proben für die Vitalitätsbestimmung und die Ermittlung des Anteils zweikerniger Protoplasten entnommen.

### 5.2.3.3 Einfluss der PEG-Behandlungszeit auf die Vitalität der Protoplasten

Die Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* U08 (s. 3.2.1) und *Streptocarpus* S3 (*S. caulescens*) wurden wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben fusioniert. Dabei wurde die im vorherigen Kapitel beschriebene PEG-Lösung (s. 5.2.3.2, Tab. 5.2, Variante B) verwendet. Als Nachbehandlungslösung wurde zunächst jeweils 1 ml der Lösung PV1 verwendet. Bei diesem Versuch wurde die Zeit der PEG-Behandlung mit 10, 20, 30, 40 und 50 min. variiert. Für jede Variante wurden zwei Ansätze in Glasröhrchen und zwei Ansätze in Petrischalen verwendet. Dabei wurden bei den Glasröhrchen zunächst jeweils 0,5 ml PEG-Lösung in jedes Glas pipettiert und danach 0,5 ml Protoplastensuspension darauf überschichtet. Anschließend wurde die Vitalität der Protoplasten durch Anfärbung mit FDA (s. 2.2.8.1) eingeschätzt. Nach der Fusion wurden die Protoplasten nach Protokoll P1 gereinigt, in Alginatfilme eingebettet und im Medium 8pm7 kultiviert. Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt.

### 5.2.3.4 Einfluss des Zentrifugierens auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten nach der Fusion

Die Protoplasten der zwei *Streptocarpus*-Arten S3 (*S. caulescens*) und S12 (*S. glandulosissimus*) wurden nach dem Protokoll P1 fusioniert. Die Fusionen wurden in Glasröhrchen durchgeführt, dabei wurde die PEG-Lösung wie in Kapitel 5.2.3.2 beschrieben (s. Tab. 5.2, Variante B) verwendet. Als Nachbehandlungslösung wurde nach der PEG-Behandlung jeweils 1 ml PV1 mit hohem pH-Wert (9,5) verwendet. Bei den ersten drei Ansätzen wurden nach der Fusion jeweils 8 ml Pufferlösung 1 mit MES dazu gegeben und die Zentrifugenröhrchen für 5 min. bei 40 x g (500 rpm) zentrifugiert, damit die Protoplasten auf dem Boden der Röhrchen pelletierten. Die Überstände wurden abgesaugt und das Waschen der Protoplasten nach Entnahme einer Probe für die Bestimmung von Dichte und Vitalität durch erneute Zugabe von 8 ml Pufferlösung 1 unter denselben Bedingungen wiederholt.

Bei den weiteren drei Ansätzen wurde der Inhalt der Glasröhrchen nach der PEG-Behandlung und Verdünnung durch PV1 mit hohem pH-Wert (9,5) in Gefäße mit Durchmessern von 3 cm, deren Böden aus 5 µm Sieben bestanden, gefüllt. Diese Gefäße befanden sich dabei in Plastikpetrischalen mit 6 cm Durchmesser. Darauf folgten das Waschen und jeweils die allmähliche Zugabe von 8 ml Pufferlösung 1 mit MES, gefolgt von Pufferlösung 1. Die Flüssigkeiten, die sich nach dem Auswaschen der Protoplasten durch die Siebe in der Petrischale gesammelt hatten, wurden mehrmals abgesaugt und beseitigt. Danach wurden 10 ml 0,4 M autoklavierte Mannit-Lösung in die Petrischale gegeben. Anschließend wurden die in Mannit suspendierten Protoplasten mit Hilfe einer Pipette mit weiter Öffnung von den

Gefäßen abgesaugt und in ein steriles Glaszentrifugenröhrchen transportiert.

Danach wurden die Protoplasten von allen Ansätzen in 0,4 M Mannit-Lösung suspendiert. Nach Entnahme von Proben für die Vitalitätsbetimmung und die Ermittlung der Anzahl der Protoplasten wurden die Fusionsprodukte mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben im Medium 8pm7C kultiviert. Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt.

### **5.2.3.5 Einfluss der Anreicherung der Protoplastensuspensionslösung und der PEG-Lösung auf die Vitalität der Protoplasten nach der Fusion**

In diesem Versuch wurden die Protoplasten von *Streptocarpus caulensis* (S3) und *Saintpaulia ionantha* (U03) fusioniert.

Um die Lebensfähigkeit der Protoplasten während der Fusion zu verbessern, wurde eine Hälfte der Protoplasten beider Fusionspartner in der PS1-Lösung im Verhältnis 1:1 suspendiert. Die andere Hälfte wurde nach KAO UND MICHAYLUK (1974) in einer Lösung mit 0,4 M Glukose, 3,5 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  und 0,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (PS6) im Verhältnis 1:1 suspendiert.

Die drei Ansätze in PS1-Lösung wurden durch die modifizierte PEG-Lösung (s Tab. 5.2, Variante F) und die drei Ansätze in PS6-Lösung durch die gleiche PEG-Lösung, die aber zusätzlich 0,2 M Glukose enthielt, fusioniert. Nach der PEG-Behandlung wurde allen Röhrchen jeweils 1 ml Medium BNE 9 mit hohem pH-Wert (9,5) zugegeben. Anschließend wurden die Produkte nach der Entnahme von Proben für die Bestimmung der Vitalität wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben gereinigt und im Medium 8pmC kultiviert.

Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt.

### **5.2.3.6 Einfluss der Floatierungsbehandlung mit Saccharoselösung nach der Fusion auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten**

Die Ergebnisse mehrerer eigener Untersuchungen zeigten, dass die bei der Fusion geplatzen Protoplasten stark toxisch auf die weitere Entwicklung der intakten Protoplasten wirkten. Daher wurde der folgende Versuch mit zwei Wiederholungen zur Entfernung der geplatzen Protoplasten aus den Fusionsprodukten durchgeführt:

Die Protoplasten der zwei *Streptocarpus*-Arten *S. caulescens* (S3) und *S. glandulosissimus* (S12) wurden in sechs Ansätzen nach Protokoll P6 fusioniert. Nach der Fusion wurde eine Hälfte der Ansätze nach P1, die andere Hälfte nach P6 mit 20%iger Saccharoselösung gereinigt. Anschließend wurden jeweils die Anzahl der Protoplasten, die Anzahl der

zweikernigen Protoplasten (mittels Ethidiumbromid) und die Vitalität der Protoplasten (durch FDA) wie in Kapitel 5.2.10 beschrieben eingeschätzt und zwischen beiden Gruppen verglichen. Nach den Behandlungen wurden die Protoplasten in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben in Alginatfilme eingebettet und im Medium 8pm7C kultiviert.

#### **5.2.4 Vergleich der Fusionsprotokolle**

Aufgrund der Menge der Protoplasten und zu erwartender Probleme während der Protoplastenfusionen wurde dieser Versuch an zwei Tagen durchgeführt. Die Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* U03 und U08 (s. 3.2.1) und *Streptocarpus* (S3 und S12) wurden wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben isoliert. Am ersten Tag wurden die Protoplasten nach den Protokollen P1, P3, P4 und P5, am zweiten Tag nach den Protokollen P2 und P6 fusioniert. Für jede Variante wurden zwei Ansätze verwendet, wobei die Vitalität und der Anteil zweikerniger Protoplasten durch die Betrachtung von 500 Protoplasten bei jedem Ansatz untersucht wurden. Die Aggregatbildungen bei der PEG-Behandlung sowie Dichte, Vitalität und Kernanzahl der Protoplasten nach den Fusionen wurden eingeschätzt und verglichen. Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt. Bei der ersten Wiederholung wurden die Protoplasten von S3 und U03, bei der zweiten Wiederholung die Protoplasten von S12 und U08 verwendet.

#### **5.2.5 Versuche zur chemischen Fusion der Protoplasten**

##### **5.2.5.1 Versuche zur Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten**

Die Protoplasten von zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten und fünf *Streptocarpus*-Arten (s. 5.2.1) wurden nach Protokoll P6 fusioniert. Bei den Usambaraveilchen wurden Protoplasten aus jungen Sprossen, die an Blattexplantaten in Dunkelheit regeneriert worden waren (s. 3.2.8), verwendet. Die Protoplasten von S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*), S2 (*S. saxorum*) und S3 (*S. caulescens*) stammten aus Mesophyllzellen, die aus Blättern von in flüssigem Medium kultivierten Pflanzen entnommen worden waren. Bei S12 (*S. glandulosissimus*) und S25 (*S. caulescens* v. *pallens*) wurden die Protoplasten aus Stängeln von Pflanzen, die in vitro auf festem Medium kultiviert worden waren, isoliert. Bei der Reinigung der Protoplasten wurde auf die letzte Auswaschung der Protoplasten verzichtet und bei jedem Versuch eine Probe von 0,5 ml Protoplastensuspension als Kontrolle ohne PEG-Behandlung entnommen. Tabelle 5.3 stellt die verschiedenen Kombinationen zwischen *Saintpaulia ionantha*-Sorten

und *Streptocarpus*-Arten bei drei Wiederholungen dar. In Tabelle 5.3 werden einige Experimente aus zahlreichen Versuchen vorgestellt, bei denen in der Kontrolle Zellteilungen beobachtet und die Kulturen nicht aufgrund von Kontamination eliminiert wurden.

**Tabelle 5.3:** Versuche zu Fusionen zwischen *Saintpaulia ionantha*-Sorten und *Streptocarpus*-Arten

Versuch Nr.	Fusionspartner	Anzahl der Ansätze bei drei Wiederholungen	Anzahl der Petrischalen bei drei Wiederholungen
1	S1 x U03	6	14
2	S2 x U03	8	21
3	S3 x U03	11	22
4	S12 x U03	10	24
5	S25 x U03	7	15
6	S1 x U08	13	31
7	S2 x U08	9	20
8	S3 x U08	9	17
9	S12 x U08	8	15
10	S25 x U08	9	17

#### 5.2.5.2 Versuche zur Protoplastenfusion zwischen *Streptocarpus*-Arten

Die Protoplasten von fünf *Streptocarpus*-Arten (s. 5.2.1) wurden nach Protokoll P6 miteinander fusioniert. Da weder bei S12 noch bei S25 Kallusse gebildet wurden (s. 4), wurde auf die Fusion S12 x S25 verzichtet. Die Protoplasten wurden wie im vorherigen Kapitel beschrieben isoliert. Auch hier wurde bei der Reinigung der Protoplasten auf das letzte Auswaschen der Protoplasten verzichtet und bei jedem Versuch eine Probe von 0,5 ml Protoplastensuspension als Kontrolle ohne PEG-Behandlung kultiviert. Tabelle 5.4 stellt die verschiedenen Kombinationen innerhalb von *Streptocarpus*-Arten bei zwei Wiederholungen dar:

**Tabelle 5.4:** Versuche zu Fusionen innerhalb der *Streptocarpus*-Arten

Versuch	Fusionspartner	Anzahl der Ansätze bei zwei Wiederholungen	Anzahl der Petrischalen bei zwei Wiederholungen
A	S1 x S2	6	22
B	S1 x S3	4	9
C	S1 x S12	7	15
D	S1 x S25	9	26
E	S2 x S3	4	14
F	S2 x S12	4	12
G	S2 x S25	4	11
H	S3 x S12	8	27
I	S3 x S25	5	16

## 5.2.6 Versuche zur elektrischen Fusion der Protoplasten

### 5.2.6.1 Versuche zur Ermittlung geeigneter Parameter für die elektrische Fusion der Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*

Um ein geeignetes Protokoll für die elektrische Fusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus* zu finden, wurden zwei Versuche durchgeführt. Die Protoplasten von U08 (s. 3.2.1) und *S. caulescens* wurden wie in den vorherigen Kapiteln (3 und 4) beschrieben isoliert. Danach wurden die Protoplasten von beiden Fusionspartnern im Verhältnis 1 zu 1 gemischt. Die Mischung wurde in einem 10 ml-Glaszentrifugenröhrchen in 8 ml Fusionslösung I (0,4 M Mannit, 1,0 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, pH-Wert: 5,6; filtersterilisiert) suspendiert und für 5 min. bei 40 x g zentrifugiert. Kurz vor der Fusion wurde der Überstand abgesaugt, und die Protoplasten wurden in geeignete Volumina der Fusionslösung II (0,4 M Mannit in deionisiertem Wasser; pH-Wert: 5,6; autoklaviert) suspendiert, so dass sie in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  / ml vorlagen. Anschließend wurden an der Werkbank unter sterilen Bedingungen jeweils 250 µl der Suspension mit Hilfe einer Pipette mit abgeschnittenen Spitzen in die Kammer eines High-Voltage-Cell-Processors (Science Products Trading GmbH) aufgefüllt und folgende Versuche durchgeführt (Tab. 5.5 und 5.6):

Beim ersten Versuch wurden die Anzahlen intakter Protoplasten nach den verschiedenen Behandlungen gezählt und miteinander verglichen. Beim zweiten Versuch wurden die Protoplasten nach der Fusion in Hinsicht auf Intaktheit, Vitalität und Anteil zweikerniger Zellen überprüft. Der erste Versuch wurde in einer, der zweite in zwei Wiederholungen durchgeführt.

**Tabelle 5.5:** Verschiedene Behandlungen bei der Elektrofusion zwischen den Protoplasten von U08 und S3 beim Versuch 1

Beh.	Hochfrequenzdauer H. Sec	AC- Spannung	S. ms	DC- Spannung	# DC- Spannung Pulse
A1	3	70	40	300	1
A2	3	70	40	300	2
A3	3	70	30	300	1
A4	3	70	30	300	2
A5	6	70	40	300	1
A6	6	70	40	300	2
A7	6	70	30	300	1
A8	6	70	30	300	2
B1	6	70	30	750	1
B2	6	70	30	750	2
B3	6	70	20	750	1
B4	6	70	20	750	2
B5	9	100	30	750	1
B6	9	100	30	750	2
B7	9	100	20	750	1
B8	9	100	20	750	2
C1	9	150	20	1250	1
C2	9	150	20	1250	2
C3	9	150	10	1250	1
C4	9	150	10	1250	2
D1	9	200	10	1500	1
D2	9	200	10	1500	2

AC -Spannung: Spannungshöhe [V]

S. ms [microsec]: Spannungspulsdauer

DC-Spannung: Spannungshöhe [V]

**Tabelle 5.6:** Verschiedene Behandlungen bei der Elektrofusion zwischen den Protoplasten von U08 und S3 beim Versuch 2

Beh.	Hochfrequenzdauer H. Sec	AC- Spannung	S. ms	DC- Spannung	# DC- Spannung Pulse
a	3	70	10	300	1
b	3	70	20	300	1
c	6	70	10	750	1
d	6	70	20	750	1
e	6	70	10	1000	1
f	6	70	20	1000	1

AC -Spannung: Spannungshöhe [V]

S. ms [microsec]: Spannungspulsdauer

DC -Spannung: Spannungshöhe [V]

### **5.2.6.2 Versuche zur Elektrofusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus***

Die Protoplasten von U08 (s. 3.2.1) und *S. caulescens* wurden isoliert und nach Variante d (s. 5.2.6.1, Tab. 5.6) fusioniert. Insgesamt wurden bei der ersten Wiederholung 16 und bei der zweiten Wiederholung 24 Ansätze fusioniert. Bei beiden Wiederholungen wurde jeweils die Hälfte der Fusionsprodukte direkt wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml kultiviert. Die andere Hälfte der Fusionsprodukte wurde zunächst wie in Kapitel 5.2.4 beschrieben (P6) durch Zugabe desselben Volumens autoklavierter 20%iger Saccharoselösung erneut gereinigt und danach wie die erste Gruppe in Alginatfilm eingebettet und im Medium 8pm7C kultiviert.

### **5.2.7 Kultur der Protoplasten nach der Fusion**

Die Kultur der Protoplasten und der Kallusse, die aus Protoplasten entstanden, wurde in den Kapiteln 3.2.9 und 3.2.10 ausführlich beschrieben. Zur Sprossregeneration wurde ein Versuch wie in Kapitel 4.2.11 beschrieben mit sämtlichen Fusionsvarianten durchgeführt.

### **5.2.8 Bestimmung der Ploidiestufe der Kallusse aus Fusionsversuchen und somatischen Hybriden**

Die Ploidiestufe der Kallusse und Blätter wurde durch DNA-Gehaltsanalyse mit Hilfe eines Partec-Durchfluscytometers (Partec Cystain UV Precise P) folgendermaßen bestimmt: Ungefähr  $1 \text{ cm}^2$  Proben aus Blattspreiten oder ca. 10-30 mg Proben aus Kallussen wurden entnommen und in Plastikpetrischalen, die ca. 400  $\mu\text{l}$  Lösung A (Nuclei Extraction Buffer) des High Resolution Kit for plant ploidy level analysis (Partec) enthielten, mit einer Rasierklinge auf Eis zerkleinert. Danach wurde der Inhalt der Petrischale durch ein Polyester-Siebgewebe mit 50  $\mu\text{m}$  filtriert und mit 1600  $\mu\text{l}$  der Lösung B (Stain Buffer Nr. 05-5002), die den DNA-Farbstoff DAPI enthielt, gemischt und nach 2 min. Inkubation bei Raumtemperatur im Durchfluscytometer analysiert. DAPI als Fluoreszenzfarbstoff bindet bevorzugt an adeninreiche Regionen der DNA an. Die ermittelten Ploidiestufen wurden mit Hilfe der DPAC-Software der Firma Partec verarbeitet und dargestellt.

### **5.2.9 Identifizierung der Kallusse aus Fusionsversuchen und der somatischen Hybriden durch molekulare Marker**

Die Extraktion der DNA und die Identifizierung von Kallussen und Pflanzen, die aus Protoplastenfusionen entstanden waren, anhand molekularer Marker (RAPDs) wurde wie bei den Hybriden aus Kreuzungen (s. 2.2.15) durchgeführt.

### 5.2.10 Bonituren und Auswertungen

Die Anzahl der Protoplasten, die Teilungsfrequenzen, die Vitalität der Protoplasten und die Regenerationsraten wurden wie in Kapitel 3.2.14 beschrieben bonitiert und berechnet.

Zur Einschätzung der Aggregation der Protoplasten wurden alle Protoplasten, auch die nicht aggregierten, in fünf Gesichtsfeldern gezählt, und die Anzahl der aggregierten Protoplasten wurde durch die Gesamtzahl der Protoplasten geteilt.

$$[\%] \text{Aggregation der Protoplasten} = \frac{\text{Anzahl aggregierter Protoplasten}}{\text{Gesamtzahl erfasster Protoplasten}} \times 100$$

Eine weitere Bonitur bezog die Größe der Aggregate ein, so dass die Verhältnisse zwischen den Aggregaten aus zwei und den Aggregaten aus mehreren Protoplasten dargestellt wurden.

Die Kernanzahl der Protoplasten wurde durch ein Protokoll nach YE und EARLE (1991), leicht verändert von WINKELMANN (1994), mit Anfärbung durch Ethidiumbromid sowie durch DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ausgewertet.

Zur Behandlung mit Ethidiumbromid wurden die Protoplasten nach dem ersten Pellettieren in der Pufferlösung 1 oder in 0,5 M Mannit resuspendiert. Danach wurden 0,5 ml der Protoplastensuspension in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt, 0,5 ml Färbelösung nach YE und EARLE (0,5 M Sorbitol, 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O und 5 mM MES) zugegeben und gut gemischt. Die Färbelösung wurde aus einer Mischung aus 5 V.T. YE und EARLE-Lösung, 3 V.T. Ethanol und 2 V.T. Ethidiumbromid hergestellt. Nach 30-minütiger Einwirkungszeit wurde das Gefäß für 5 min. bei 5000 rpm. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in der YE und EARLE-Lösung suspendiert. Danach wurden die Protoplasten unter einem Zeiss-Mikroskop III RS bei 125-facher Vergrößerung im Fluoreszenzlicht mit der Filterkombination BP 450-490, FT 510, LP 520 betrachtet. Die Kernanzahl der Protoplasten wurde in fünf Gesichtsfeldern an jeweils ca. 100 Protoplasten gezählt, indem die Anzahl der Protoplasten mit ein, zwei, drei und mehr Kernen auf die Gesamtzahl bezogen wurde.

Für die Bestimmung der Kernanzahl der Protoplasten durch DAPI wurden nach FOWKE ET AL. (1990) von jedem Ansatz ca. 0,1 ml der suspendierten Protoplasten entnommen, mit demselben Volumen DAPI-Lösung (1 µg / ml DAPI, 100 mM PIPES, 10 mM EGTA, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 9 % Mannitol; pH-Wert: 6,9) gemischt und nach kurzer Einwirkungszeit wie bei der Behandlung mit Ethidiumbromid unter dem Mikroskop ausgewertet.

$$[\%] \text{Zweikernige Protoplasten} = \frac{\text{Anzahl Protoplasten mit zwei Kernen}}{\text{Gesamtzahl erfasster Protoplasten}} \times 100$$

## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 Optimierung des Protokolls für die Protoplastenfusion

#### 5.3.1.1 Einfluss des pH-Werts auf die Protoplastenfusion

Da die PEG-Lösung eine ungepufferte Lösung war, schwankte ihr pH-Wert nach dem Autoklavieren stark. Die folgende Tabelle (Tab. 5.7) zeigt die Änderungen des pH-Wertes von verschiedenen PEG-Lösungen vor und nach dem Autoklavieren und nach der Zugabe von PV1.

**Tabelle 5.7:** Vergleich der pH-Werte bei den verschiedenen PEG-Lösungen vor dem Autoklavieren, nach dem Autoklavieren und nach Zugabe des gleichen Volumens von PS1 mit einem pH-Wert von 5,6 und sowie von PV1 mit einem pH-Wert von 10

Varianten	pH-Wert vor dem Autoklavieren	pH-Wert nach Autoklavieren	pH-Wert nach der Zugabe PS1
1	5	3,7	4,62
2	5,8	4,02	4,8
3	7,8	4,56	5,4
4	8	5,1	5,4
5	8,5	4,98	5,35
6	9	5,03	5,5
7	9,5	5,25	5,35
8	9,8	5,25	5,45
9	10	5,3	5,6
10	10,5	5,3	5,5

Tabelle 5.7 zeigt, dass die Erhöhung des pH-Wertes der PEG-Lösung vor dem Autoklavieren keine entsprechenden pH-Werte nach dem Autoklavieren oder nach der Zugabe von PS1 hervorrief. Die höchsten pH-Werte nach dem Autoklavieren (5,3) wurden bei den Varianten 9 und 10 mit anfänglichen pH-Werten von 10 bzw. 10,5 beobachtet. Diese sind nicht für die Protoplastenfusion geeignet. Auch nach Zugabe von PS1 stiegen die pH-Werte der PEG-Lösungen nicht wesentlich und sicher.

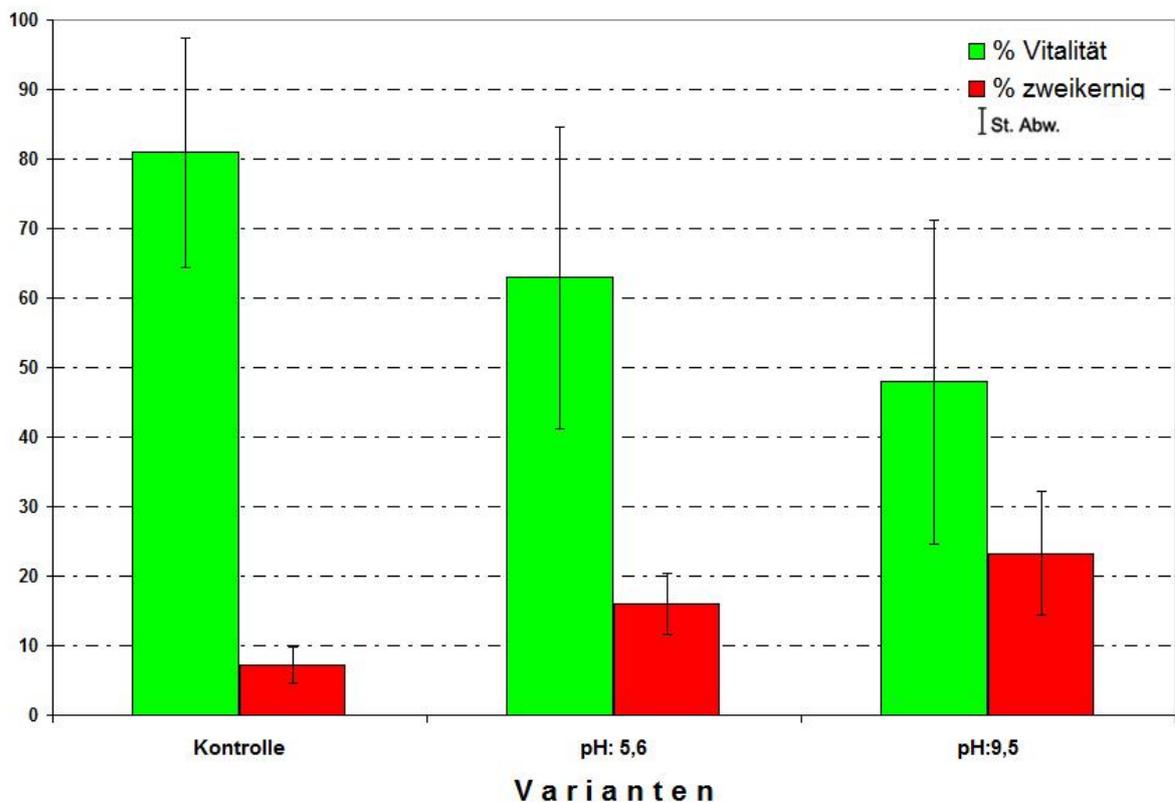
Nur durch die Anwendung von HEPES könnte eine Stabilität des pH-Wertes in der PEG-Lösung erreicht werden (Tab. 5.8).

Der Tabelle 5.8 zeigt, dass der pH-Wert der PEG-Lösung bei der Variante A nach dem Autoklavieren instabil war. Bei Variante B (50 mM HEPES) wurde eine geringfügige Absenkung des pH-Wertes um 0,1 beobachtet. Bei Variante C (100 mM HEPES) wurde keine Änderung des pH-Wertes nach dem Autoklavieren festgestellt.

**Tabelle 5.8:** Vergleich der pH-Werte bei den verschiedenen PEG-Lösungen vor und nach dem Autoklavieren

Variante	Mittelwert vor dem Autoklavieren	Mittelwert nach dem Autoklavieren
A	5,8	3,9
B	5,8	5,7
C	5,8	5,8

Um die Einflüsse des pH-Wertes auf die Protoplasten während der Fusion zu testen, wurden die Protoplasten von S3 und U08 unter zwei verschiedenen pH-Werten fusioniert und die Vitalität der Protoplasten sowie die Bildung von zweikernigen Zellen nach der Fusion untersucht und mit der Vitalität und dem Anteil zweikerniger Protoplasten vor der Fusion (Kontrolle) verglichen. Dabei wurden ausschließlich die Daten aus den beiden Wiederholungen nach der Fusion wie in Kapitel 5.2.10 beschrieben angewendet. Abb. 5.1 stellt den Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der Vitalität sowie dem Anteil zweikerniger Protoplasten nach der Fusion dar:

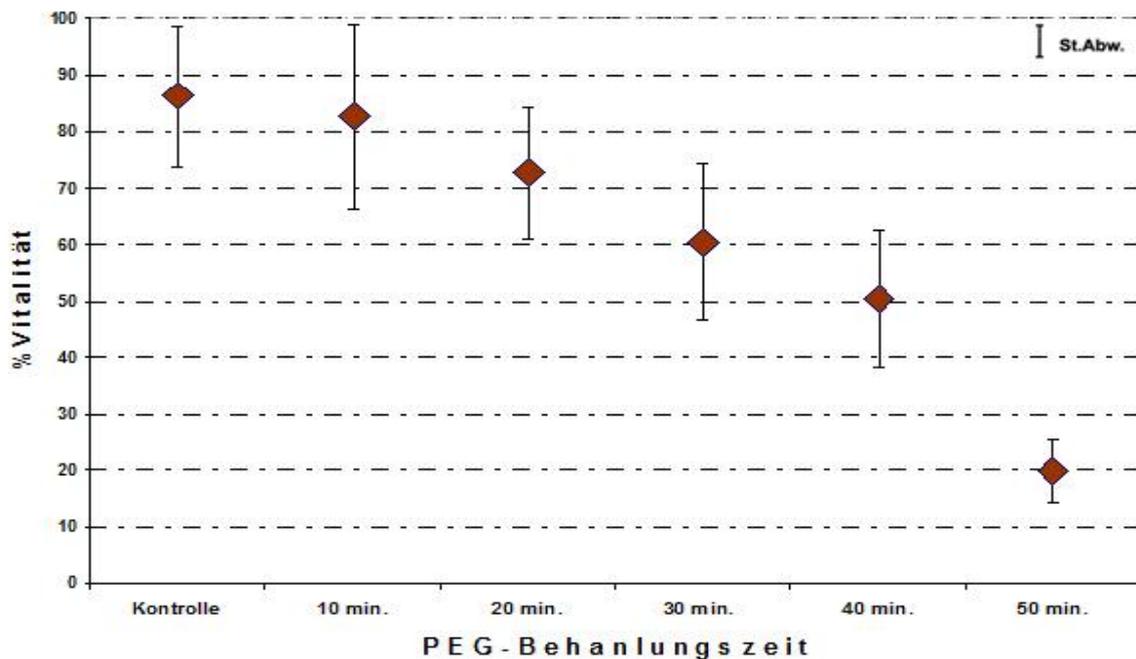


**Abbildung 5.1:** Vergleich von Vitalität und Anteil zweikerniger Protoplasten in Abhängigkeit von zwei verschiedenen pH-Werten bei der Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia ionantha* (U8) und *Streptocarpus* (S3). Die Vitalität und der Anteil zweikerniger Protoplasten vor den PEG-Behandlungen wurden als Kontrolle bezeichnet.

In Abbildung 5.1 ist zu erkennen, dass sich der Anteil zweikerniger Protoplasten bei einem pH-Wert von 5,6 im Vergleich zur Kontrolle deutlich von 7,2 % auf 16 % erhöhte, während die Vitalität der Protoplasten durch die PEG-Behandlung und den gleichen pH-Wert bei der Nachbehandlungslösung von 81 % auf 63 % sank. Mit Erhöhung des pH-Wertes der Nachbehandlungslösung von 5,6 auf 9,5 stieg der Anteil zweikerniger Protoplasten weiter auf 23,3 %, und die Vitalität der Protoplasten wurde nochmals auf 48 % herabgesetzt.

### 5.3.1.2 Einfluss der PEG-Behandlungsdauer auf die Vitalität der Protoplasten

Abbildung 5.2 stellt die Schädigung der Protoplasten in Abhängigkeit von der PEG-Behandlungszeit dar. Der Grafik zeigt, dass die Vitalität der Protoplasten durch eine PEG-Behandlung von 10 min. leicht herabgesetzt wurde. Bei 20 bis 40 min. Behandlungsdauer sank die Vitalität stetig. Sobald die PEG-Behandlung mehr als 40 min. dauerte, wurde die Vitalität stark beeinträchtigt.



**Abbildung 5.2:** Vergleich der Vitalität der Protoplasten in Abhängigkeit von der PEG-Behandlungszeit während der Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia ionantha* (U8) und *Streptocarpus* (S3)

Die Auswirkungen der PEG-Behandlungszeit auf die Protoplastenfusion (bezogen auf die Bildung von zweikernigen Protoplasten) waren bei beiden Wiederholungen sehr unterschiedlich und widersprüchlich. Tabelle 5.9 zeigt, dass sich der Anteil zweikerniger Protoplasten bei der ersten Wiederholung bei Behandlungsdauern von bis zu 40 min. erhöhte.

Jedoch war die Zunahme der Fusionen im Zusammenhang mit der Behandlungsdauer nicht einheitlich. Z.B. wurden bei Behandlungszeiten zwischen 10 und 20 min. keine deutlichen Änderungen bei der Fusion der Protoplasten beobachtet. 30 und 40 min. Behandlungsdauer führten zu einer Steigerung des Anteils zweikerniger Protoplasten auf 11,3 % bzw. 13,7 %.

**Tabelle 5.9:** Anteil zweikerniger Protoplasten in Abhängigkeit von der PEG-Behandlungsdauer bei zwei Wiederholungen

Behandlungsdauer	% zweikerniger Protoplasten	
	Wdh.1	Wdh.2
Kontrolle	4	8
10 min.	7	9
20 min.	7	15
30 min.	11	15
40 min.	13	14
50 min.	11	8

Bei der zweiten Wiederholung wurde eine Steigerung des Anteils zweikerniger Protoplasten bei Behandlungsdauern bis zu 20 min. beobachtet, aber die Unterschiede zwischen 20 und 30 min. Behandlungsdauer waren nicht erheblich. Im Gegensatz zur ersten Wiederholung führten 40 min. PEG-Behandlung zu einem Rückgang des Anteils zweikerniger Protoplasten. Bei beiden Wiederholungen wurden deutliche Verminderungen der Protoplastenfusion durch die PEG-Behandlung für 50 min. beobachtet (Tab. 5.9).

Durch visuelle Beobachtungen wurde festgestellt, dass die Zunahme der PEG-Behandlungsdauer zum Platzen der Protoplasten führte. Besonders bei einer Behandlung für mehr als 40 min. wurden in der Lösung zahlreiche Zellbestandteile vorgefunden.

Der Verlauf der Protoplastenfusionen konnte in Glasröhrchen visuell mit Hilfe einer Lupe verfolgt werden. Die suspendierten Protoplasten in der Lösung PS1 wurden zunächst auf die PEG-Lösung überschichtet. An der gemeinsamen Kontaktfläche beider Lösungen bildeten die Protoplasten Aggregate. Die Aggregate sanken langsam in der PEG-Lösung ab, so dass die nächste Schicht der Protoplastensuspension mit der PEG-Lösung in Kontakt kam und sich der Verlauf wiederholte. Durch diesen ständigen Prozess sanken in der Regel nach ca. 30 min. allmählich alle Protoplasten in der PEG-Lösung ab. Als die letzten Protoplasten in die PEG-Lösung eintraten, erreichten erste Ketten von Protoplasten den Boden des Röhrchens, da normalerweise die Protoplastensuspension und die PEG-Lösung gleiche Volumina hatten.

Dauerte die PEG-Behandlung länger, sammelten sich die Protoplasten am Boden des Glasröhrchens.

Es wurden keine deutlichen Unterschiede bei Vitalität und Bildung von zweikernigen

Protoplasten zwischen der Behandlung in Glasröhrchen und der Behandlung in Petrischalen beobachtet. Jedoch wiesen die in den Glasröhrchen fusionierten Protoplasten nach der Kultur bei beiden Wiederholungen einen in Bezug auf die Lebensdauer besseren Zustand auf. Die Anzahl intakter Protoplasten war bei den Proben aus den Röhrchen höher, und sie verbräunten später.

### 5.3.1.3 Einfluss des Zentrifugierens auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten nach der Fusion

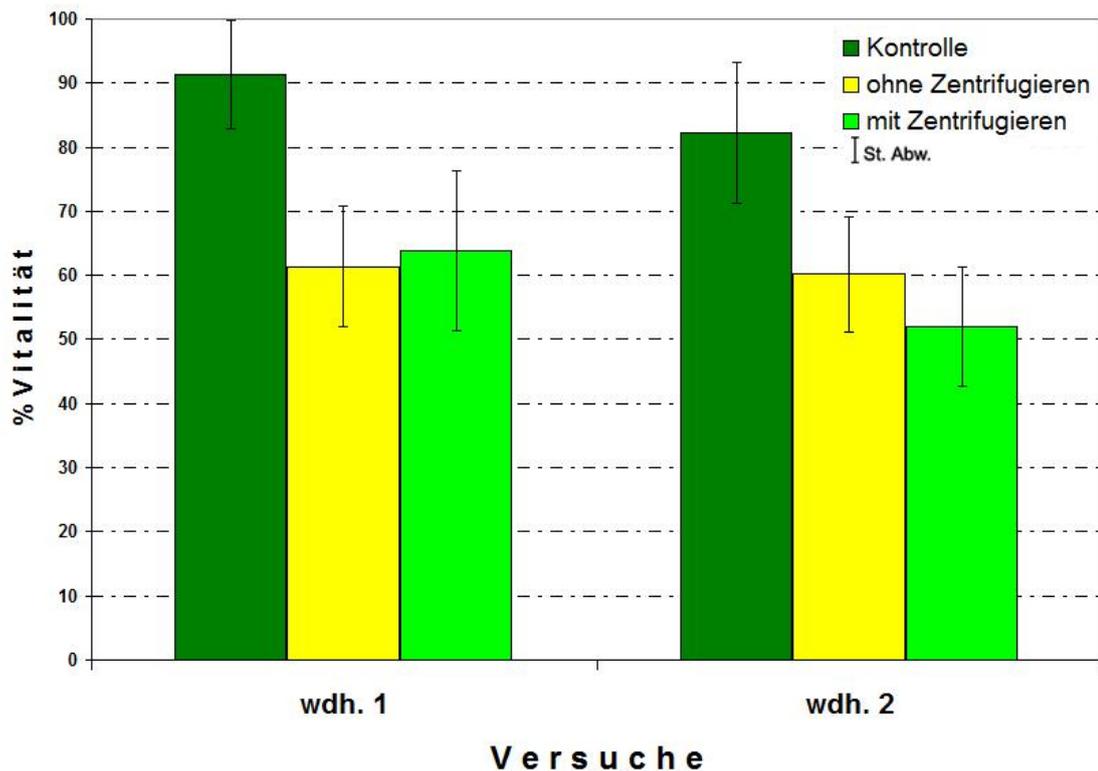
Um den Einfluss des Zentrifugierens der Protoplasten nach der Fusion auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten zu überprüfen, wurden die Protoplasten von zwei *Streptocarpus*-Arten (S3 und S12) fusioniert und zentrifugiert und anschließend Anzahl und Vitalität der Protoplasten mit nicht zentrifugierten Proben verglichen (s. 5.2.3.6). Die nach der Fusion gezählten Protoplasten werden durch folgende Tabelle (5.10) dargestellt:

**Tabelle 5.10:** Vergleich der Anzahl von Protoplasten nach der Fusion mit und ohne Zentrifugieren bei zwei Wiederholungen

Zentrifugieren		Anzahl der Protoplasten nach der Fusion [ $\times 10^5$ ]				% Verlust
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	$\Sigma$	
Wdh.1	ohne	3,3	2,5	3,4	9,2	38,7
	mit	2,5	2,7	2,0	7,1	52,6
Wdh.2	ohne	3,9	4,1	2,6	1,1	30
	mit	2,2	3,5	2,2	7,9	47,3

Da bei drei Ansätzen (3 x 0,5 ml Suspension)  $1,5 \times 10^6$  Protoplasten miteinander fusioniert wurden, entstanden laut den Ergebnissen Verluste durch Fusionen in Höhe von 38,7 % bei der ersten Wiederholung und 30 % bei der zweiten Wiederholung. Diese Verluste erhöhten sich durch den Zentrifugierungsschritt bei der Wiederholung 1 auf 52,6 % und bei der Wiederholung 2 auf 47,3 %. Diese Ergebnisse werden durch die Daten zur Vitalität ergänzt. Abbildung 5.3 zeigt, dass das Zentrifugieren keinen deutlichen Einfluss auf die Vitalität der Protoplasten hatte. Dabei wurde die Vitalität der Protoplasten vor den PEG-Behandlungen als Kontrolle betrachtet.

Der visuelle mikroskopische Vergleich der kultivierten Protoplasten aus beiden Wiederholungen zeigte, dass die Petrischalen mit nicht zentrifugierten Proben zahlreiche geplatze Protoplasten erhielten. Im Vergleich zu den zentrifugierten Proben starben sie schneller ab und verbräunten nach 2-3 Tagen, während in den Proben von zentrifugierten Protoplasten nach auch 10 Tagen viele intakte Protoplasten zu sehen waren.

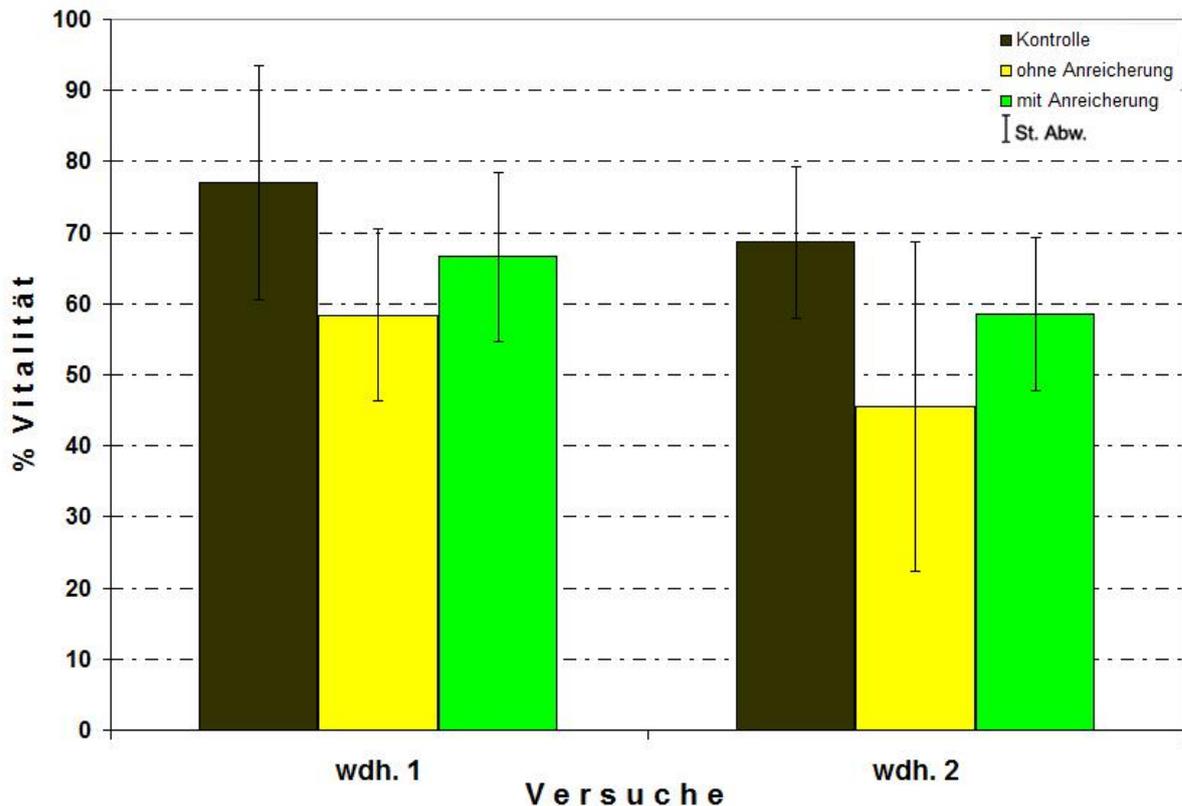


**Abbildung 5.3:** Vergleich der Vitalität der Protoplasten nach der Protoplastenfusion zwischen S3 und S12 mit und ohne Zentrifugieren bei zwei Wiederholungen. Die Vitalität der Protoplasten vor den Fusionen wurde als Kontrolle betrachtet.

#### 5.3.1.4 Einfluss der Anreicherung der Protoplastensuspensionslösung und der PEG-Lösung auf die Vitalität der Protoplasten nach der Fusion

Die Auswirkungen der Anreicherung (Tab. 5.1, PS6 und PEG6) auf die Vitalität der Protoplasten nach und während der Fusion von S3 und U03 wurde untersucht. Nach der Reinigung wurde die Vitalität der Protoplasten aus zwei Wiederholungen mittels FDA eingeschätzt und mit der Vitalität der Protoplasten vor den Fusionen (Kontrolle) verglichen (Abb. 5.4). Bei beiden Wiederholungen deutlich zu erkennen, dass die Anreicherung der Protoplasten zur Verbesserung der Vitalität führte. Die Vitalität der Protoplasten wurde durch die Anreicherung bei der ersten Wiederholung von 58 % auf 67 % und bei der zweiten Wiederholung von 46 % auf 59 % erhöht.

Die tägliche Beobachtung unter dem Mikroskop zeigte, dass die angereicherten Protoplasten in Hinsicht auf Lebensdauer und Verbräunung in einem besseren Zustand waren. Bei zwei Ansätzen aus Wiederholung 1 wurden in fünf Petrischalen nach 12 Tagen Zellteilungen beobachtet, die sich nur in einer Petrischale zur Bildung von 3 Mikrokallussen weiterentwickelt hatten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese Mikrokallusse aus Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* (U03) entstanden waren.



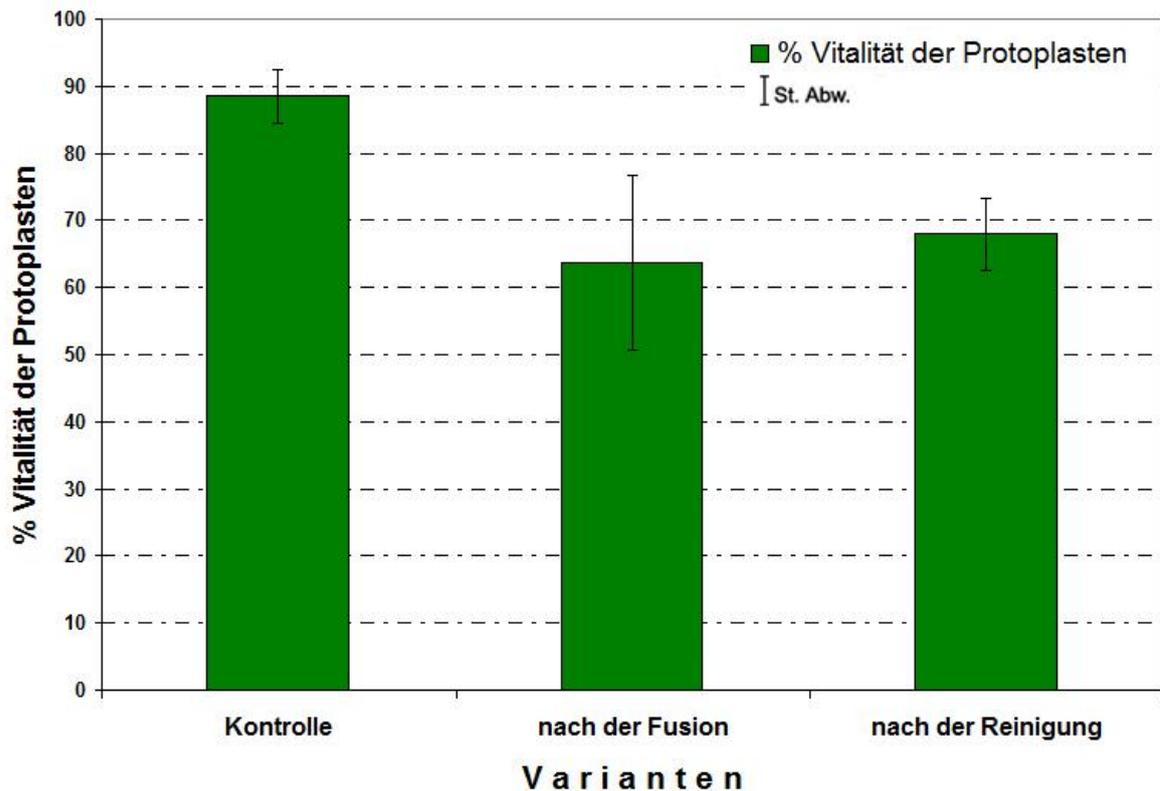
**Abbildung 5.4:** Vergleich der Vitalität der Protoplasten nach der Fusion mit und ohne Anreicherung der Protoplasten von S3 und U03 bei zwei Wiederholungen. Die Vitalität der Protoplasten vor den Fusionen wurde als Kontrolle betrachtet.

### 5.3.1.5 Einfluss der Floatierungsbehandlung mit Saccharoselösung nach der Fusion auf Anzahl und Vitalität der Protoplasten

In diesem Versuch wurden die Protoplasten nach der PEG-Behandlung durch Floatieren in 20%iger Saccharoselösung gereinigt, um die während der Fusion geplatzten Protoplasten aus den Fusionsprodukten zu entfernen. Die Daten aus zwei Wiederholungen wurden wie in 3.2.13 beschrieben berechnet.

Die Ergebnisse zeigten, dass 28,5 % der Protoplasten während der Fusion platzten. Durch die Reinigung gingen auch 18,5 % der intakten Protoplasten verloren. 53 % der Protoplasten konnten in Alginatfilme eingebettet werden.

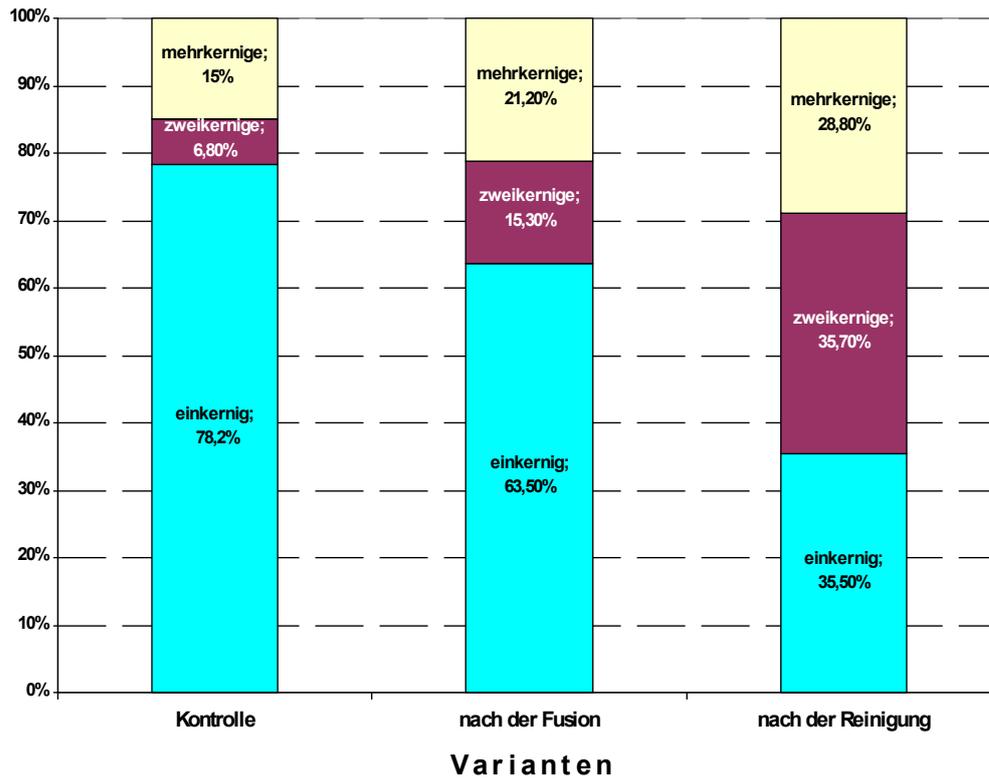
Die Vitalität der Protoplasten wurde nach der Fusion und nach der Reinigung durch Floatieren in der 20%igen Saccharoselösung mittels Anfärbung mit FDA eingeschätzt. Da die Vitalität der Kontrollen (Ausgangsprotoplasten) bei beiden Wiederholungen ähnlich war (86 % bei Wdh. 1 und 90 % bei Wdh. 2), werden die Daten von beiden Wiederholungen in folgender Grafik (Abb. 5.5) dargestellt.



**Abbildung 5.5:** Vergleich der Vitalität der Protoplasten nach der Fusion und nach der Reinigung durch Saccharoselösung bei der Protoplastenfusion zwischen zwei *Streptocarpus*-Arten (S3 x S12)

Abb. 5.5 zeigt, dass die Vitalität der Protoplasten durch die Fusion auf 64 % reduziert wurde. Nach Reinigung der Protoplasten durch 20%ige Saccharoselösung zeigten die Protoplasten eine auf 68 % erhöhte Vitalität, die jedoch niedriger als bei der Kontrolle war.

Die Anzahl der Kerne der Protoplasten wurde durch Ethidiumbromidfärbung bestimmt. Abbildung 5.6 stellt die Anteile ein-, zwei- und mehrkerniger Protoplasten bei den Ausgangsprotoplasten und den Protoplasten nach der Fusion und nach der Reinigung durch 20%ige Saccharoselösung dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Anzahl einkerniger Protoplasten nach der Fusion sowie nochmals nach der Reinigung mit 20%iger Saccharose reduzierte und gleichzeitig die Anzahl der fusionierten Protoplasten zunahm, so dass der Anteil fusionierter Protoplasten nach der Reinigung bei 64 % lag.



**Abbildung 5.6:** Kernanzahl der Protoplasten nach der Fusion und nach der Reinigung bei der Protoplastenfusion zwischen zwei *Streptocarpus*-Arten (S3 x S12)

### 5.3.2 Vergleich der Fusionsprotokolle

Für einen aussagekräftigen Vergleich der sechs Methoden zur Fusion der Protoplasten wurden die Protoplasten aus S3 und S12 mit den Protoplasten von U03 und U08 durch verschiedene Protokolle fusioniert (s. 5.2.2). Bei allen Protokollen bildeten sich nach einigen Minuten Aggregate in unterschiedlicher Anzahl und Größe.

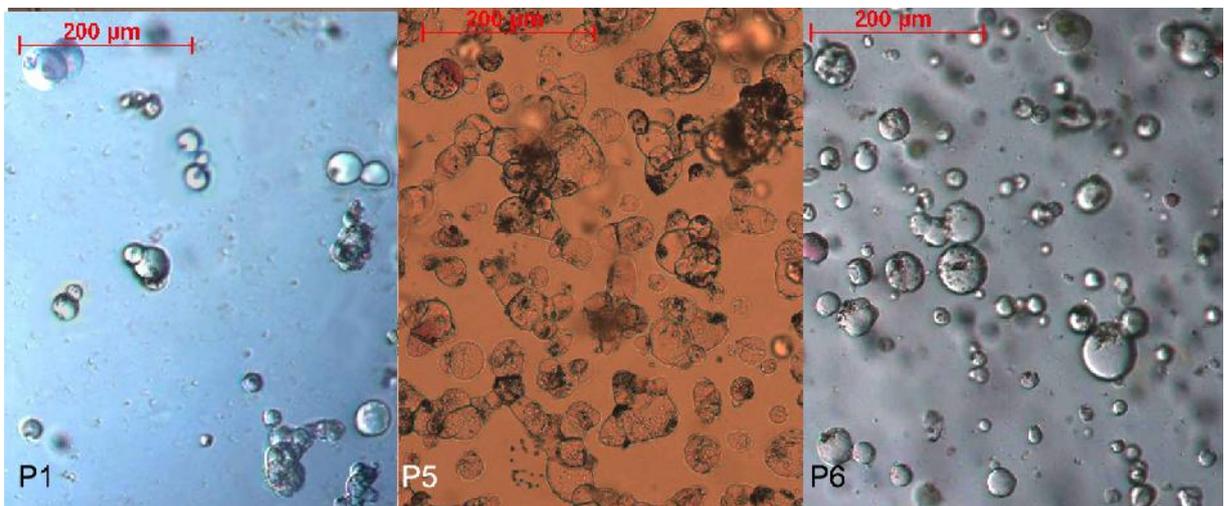
Folgende Tabelle (5.11) stellt die Aggregation der Protoplasten nach 20 Minuten bei unterschiedlichen Protokollen dar:

**Tabelle 5.11:** Aggregatbildung der Protoplasten von S3 x U08 durch PEG-Behandlung bei verschiedenen Protokollen nach 20 Minuten

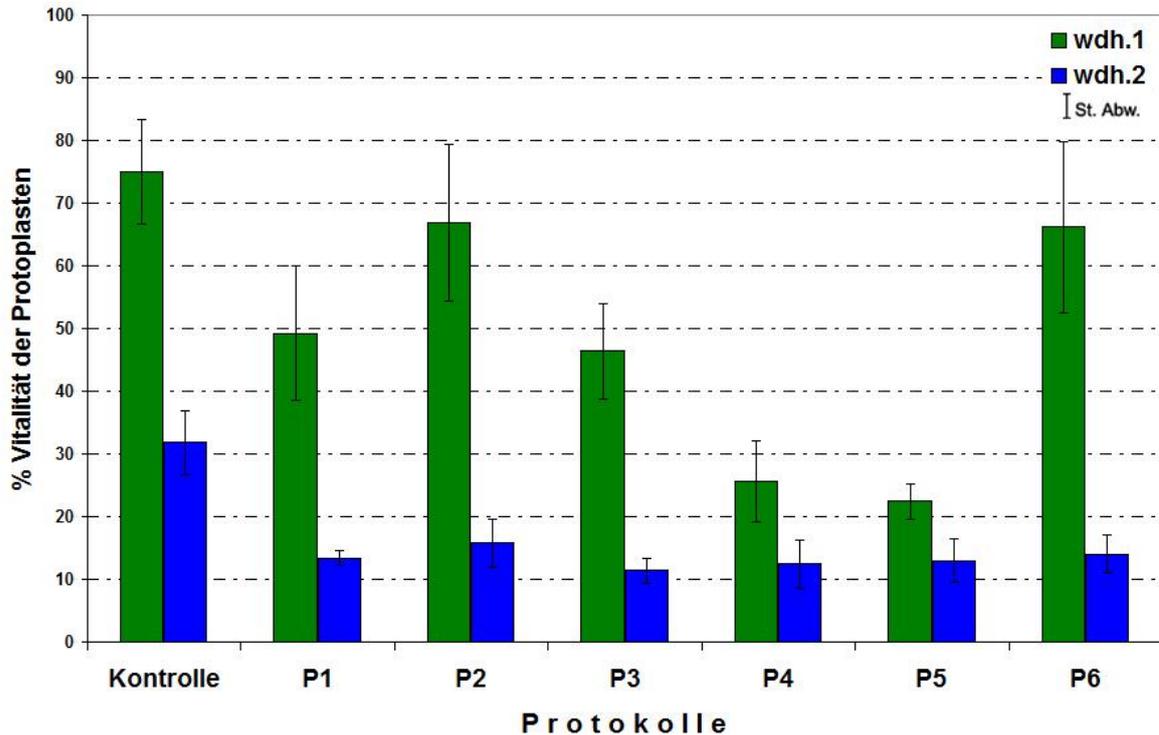
Protokoll	Anzahl der Ansätze	PEG-Konzentration	Aggregation der Protoplasten	St.Abw	Aggregation von zwei Protoplasten	St.Abw
P1	2	30 %	68 %	11,5	31 %	4,8
P2	2	30 %	71 %	12,7	28 %	6,1
P3	2	20 %	48 %	12,2	25 %	4,1
P4	2	40 %	83 %	4,2	11 %	2,8
P5	2	50 %	88 %	7,3	6 %	1,6
P6	2	30 %	71 %	10,5	30 %	3,3

Tabelle 5.11 zeigt, dass sich die Aggregation der Protoplasten mit Zunahme der PEG-Konzentration allgemein erhöhte. Jedoch führte die Erhöhung der PEG-Konzentration zur Reduzierung des Anteils der Aggregate aus zwei Protoplasten. Abbildung 5.7 stellt die Aggregation der Protoplasten durch die PEG-Behandlung bei drei Protokollen dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass teilweise schon während der PEG-Behandlung Fusionen zwischen den Protoplasten stattfanden. Besonders wenn die PEG-Lösung pH-Werte von 5,6 oder mehr aufwies (P6), waren bei einigen Aggregaten keine Begrenzungen zwischen den Zellen erkennbar.

Nach der Aggregation sanken die Protoplasten allmählich an die Böden der Petrischalen oder Röhrchen ab. Mit der Zugabe von Nachbehandlungslösungen wurde die Aggregation beendet, und in den Lösungen waren viele geplatze Protoplasten zu sehen. Die Lebensfähigkeit der Protoplasten wurde durch Anfärbung mit FDA eingeschätzt. Weil die Vitalität der Protoplasten bei der zweiten Wiederholung gering war, wurden für den Vergleich der Protokolle nur die Daten aus der ersten Wiederholung betrachtet. Der Einfluss der PEG-Behandlung auf die Lebensfähigkeit der Protoplasten bei verschiedenen Protokollen wird in Abb. 5.8 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Vitalität der Protoplasten durch die PEG-Behandlung beeinträchtigt wurde. Jedoch waren die Beeinträchtigungen der Lebensfähigkeit der Protoplasten bei den verschiedenen Methoden unterschiedlich.



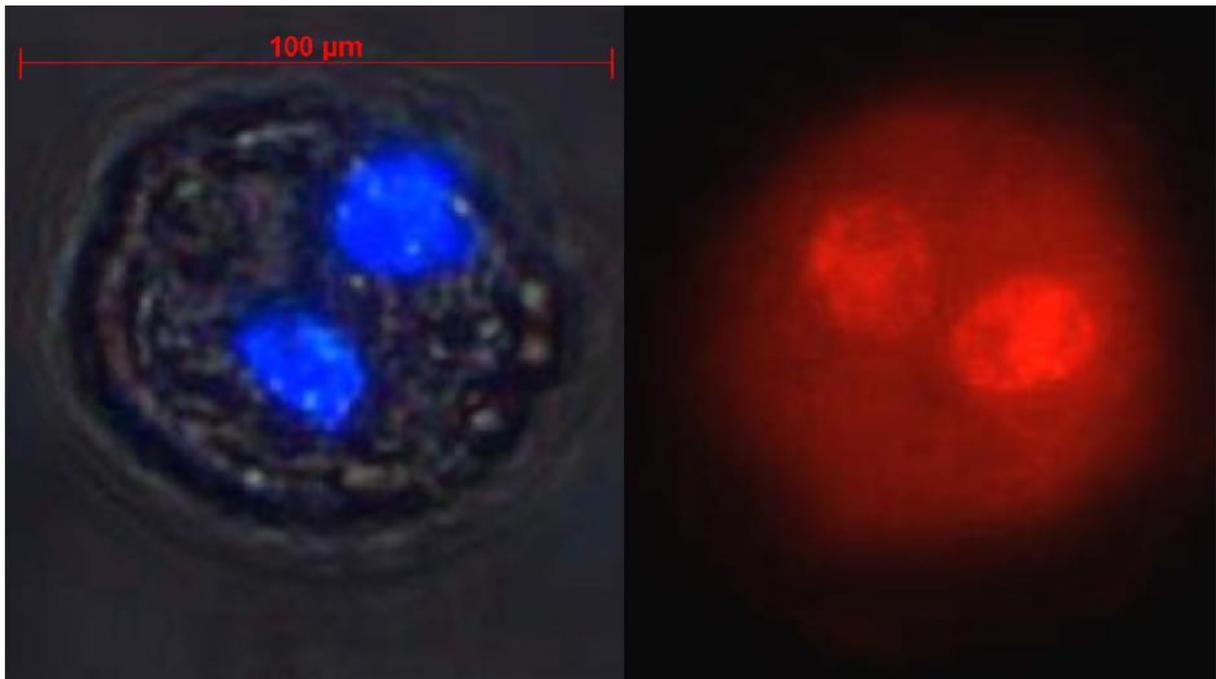
**Abbildung 5.7:** Die Aggregation der Protoplasten ca. eine min. nach der PEG-Behandlung bei den Protokollen P1 (S3 x U03), P5 (S3 x S12) und P6 (S3 x U03).



**Abbildung 5.8:** Die Vitalität der Protoplasten nach der Fusion bei verschiedenen Protokollen

Im Vergleich zur Kontrolle mit einer Vitalität von 75 % zeigte die Behandlung mit Protokoll P5 mit 23 % die niedrigste Lebensfähigkeit der Protoplasten. Die Behandlung mit den Protokollen P1 und P6 führte zu Vitalitäten von 48 bzw. 65 %. Das Protokoll P2 wies mit einer Vitalität von 66 % den geringsten Schaden für die Lebensfähigkeit der Protoplasten auf. Die schädigende Wirkung der eingesetzten Protokolle auf die Vitalität der Protoplasten spiegelte sich auch in der Verbräunung der Protoplasten nach der Kultur in Alginatfilm wider. Bei P4 und P5 verbräunten die kultivierten Protoplasten nach drei Tagen. Bei den Protoplasten von P3 und P1 geschah dies nach einer Woche. Nach 12 Tagen konnten bei P2 und P6 noch intakte Protoplasten festgestellt werden, aber im Gegensatz zur Kontrolle wurde bei keiner der fusionierten Varianten Zellteilung beobachtet.

Die Ermittlung des Anteils zweikerniger Protoplasten kann durch Anfärbung mit Ethidiumbromid oder DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) erfolgen. Beide Methoden erwiesen sich als für diese Untersuchung geeignet (Abb. 5.9). Aufgrund der geringeren Kosten wurde die Anzahl zweikerniger Protoplasten nach den Fusionen für den Vergleich zwischen den sechs Protokollen durch Anfärbung mit Ethidiumbromid bestimmt (s. 5.2.11) und mit der Kontrolle verglichen (Tab. 5.12).



**Abbildung 5.9:** Zweikernige Protoplasten nach der Fusion zwischen S3 (*Streptocarpus caulescens*) und U03 (*Saintpaulia ionantha* 'Rokoko Rose') nach der Anfärbung durch DAPI (links) und Ethidiumbromid (rechts)

**Tabelle 5.12:** Vergleich des Anteils zweikerniger Protoplasten nach der Fusion zwischen S3 (*Streptocarpus caulescens*) und U03 (*Saintpaulia ionantha* 'Rokoko Rose'), ermittelt durch Anfärbung mit Ethidiumbromid

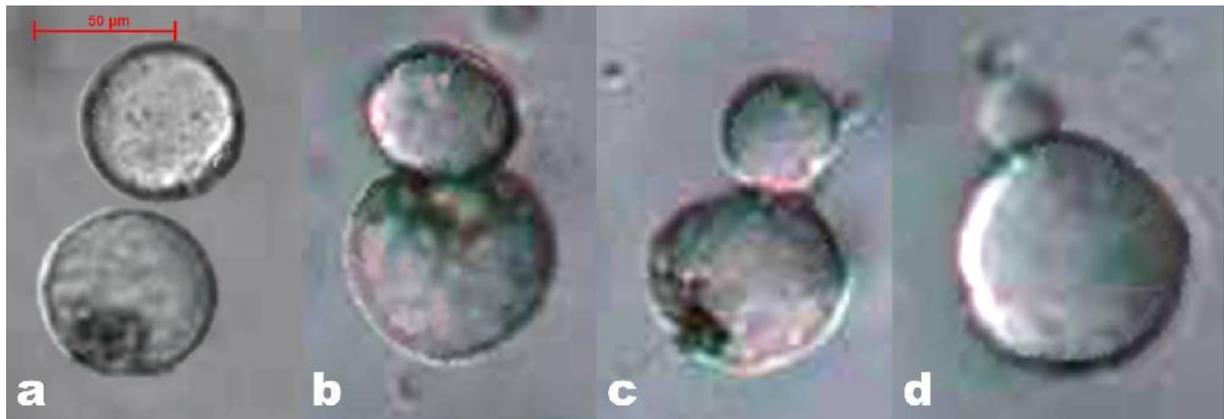
Protokoll	Gezählte Protoplasten n	% zweikerniger Protoplasten	St.Abw
k	10 <sup>3</sup>	5	1,9
p1	10 <sup>3</sup>	14	2
p2	10 <sup>3</sup>	11	2,9
p3	10 <sup>3</sup>	11	1,7
p4	10 <sup>3</sup>	22	2,3
p5	10 <sup>3</sup>	22	2,3
p6	10 <sup>3</sup>	18	2,4

Tabelle 5.12 zeigt, dass im Vergleich zur Kontrolle mit den Protokollen P4 und P5 die höchsten Anteile zweikerniger Protoplasten erzielt wurden. An zweiter Stelle folgte das Protokoll P6, an vierter Stelle das Protokoll P1.

Nach Betrachtung aller oben genannten Aspekte wie Vitalität, Erhöhung des Anteils zweikerniger Protoplasten und Verbräunung der Protoplasten nach der Kultur erwies sich das Protokoll P6 als für die Protoplastenfusion zwischen *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia ionantha*-Sorten sowie innerhalb von *Streptocarpus*-Arten am geeignetsten.

### 5.3.3 Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten

Die Protoplasten von zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten und fünf *Streptocarpus*-Arten (s. 5.2.6.1) wurden nach Protokoll P6 fusioniert. Abbildung 5.10 stellt die Fusionschritte zwischen Protoplasten aus Fusionen zwischen *Streptocarpus caulescens* und *Saintpaulia ionantha* 'Rokoko Rose' dar:



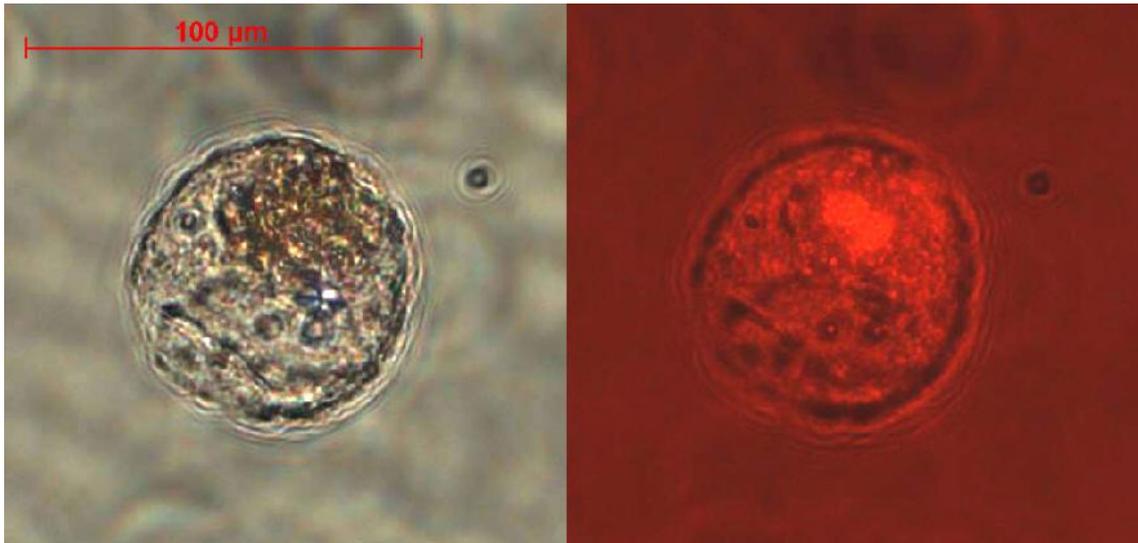
**Abbildung 5.10:** Protoplasten, vermutlich von *Saintpaulia ionantha* 'Rokoko Rose' und *Streptocarpus caulescens*, in der PS6-Lösung (a), nach PEG-Behandlung (b) und nach Zugabe von BNE 9 mit einem pH-Wert von 9,5 (c und d)

Aus Abbildung 5.10 sind die Schritte zur Protoplastenfusion deutlich zu erkennen.

Nach der PEG-Behandlung lagerten sich die Protoplasten von *Streptocarpus caulescens* (chlorophyllhaltig aus Mesophyllzellen) und vermutlich *Saintpaulia ionantha* 'Rokoko Rose' (chlorophyllfrei aus Sprosskultur in Dunkelheit) aneinander, und nach Zugabe des Mediums BNE 9 mit hohem pH-Wert ging der Inhalt des *Saintpaulia ionantha*-Protoplasten in den *Streptocarpus*-Protoplasten über.

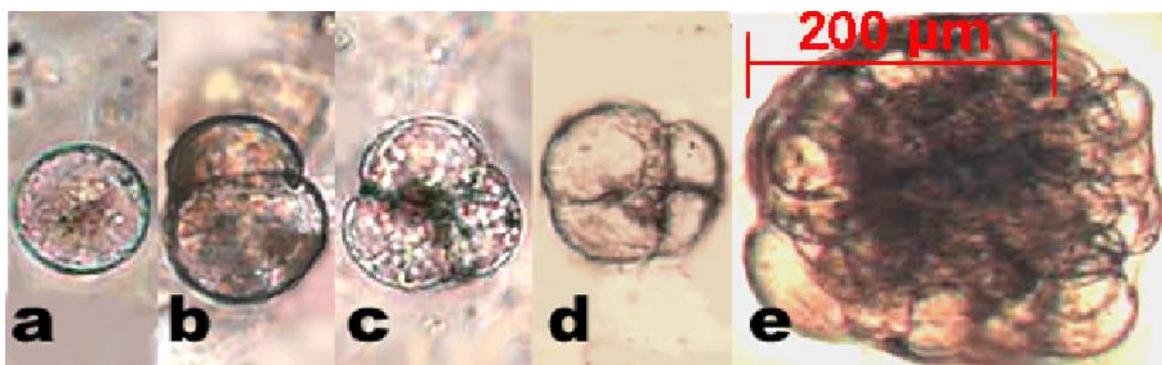
Nach der Reinigung waren die Protoplasten rund oder oval, und die fusionierten Protoplasten waren nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter dem Mikroskop erkennbar.

Abbildung 5.11 stellt fusionierte Protoplasten, die aus Fusionen zwischen *Streptocarpus caulescens* und *Saintpaulia ionantha* (U03) erzeugt wurden, dar:



**Abbildung 5.11:** Zweikerniger Protoplast aus der Fusion zwischen Protoplasten von *Streptocarpus caulescens* und *Saintpaulia ionantha*-Sorte 'Rokoko Rose'

Während der Kultur der Protoplasten mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  in Alginatfilmen wurden, wie in Kapitel 4.3.7 beschrieben, nach 10-12 Tagen in einigen Petrischalen Zellteilungen beobachtet. Die Entwicklung der Protoplasten von der Zellteilung bis zur Mikrokallusbildung wird in Abbildung 5.12 dargestellt. In den Protoplastenkulturen wurden wie bei *Saintpaulia* und *Streptocarpus* Plasmastränge erkennbar. Die Teilung fand meistens symmetrisch statt (Abb. 5.12, a und b). Manchmal teilte sich nach der ersten Zellteilung nur eine der Tochterzellen, so dass eine Gruppe aus drei Zellen entstand (c). Bei den meisten Zellen fand nach einer horizontalen Zellteilung eine vertikale Teilung statt, die zur Bildung einer Gruppe aus vier Zellen führte (d). Durch weitere Zellteilung entwickelten sich Mikrokallusse (e).



**Abbildung 5.12:** Entwicklung von Protoplasten aus der Fusion zwischen *Streptocarpus caulescens* und *Saintpaulia ionantha* (U08) 12 Tage bis zwei Monate nach der Fusion. 11 Tage nach der Fusion konnte der Anfang der Zellteilung beobachtet werden (a), nach 14 Tagen waren einige Zellen vollständig geteilt (b). 28 Tage nach der Fusion konnte bei einigen Zellen auch die zweite Zellteilung (vertikal) beobachtet werden (c und d). Nach zwei Monaten wurden die Mikrokallusse visuell als kleine Punkte im Alginatfilm sichtbar (e)

Die Ergebnisse der Protoplastenfusionen zwischen fünf *Streptocarpus*-Arten und zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten werden in folgender Tabelle 5.13 aufgelistet. Die Fusionen zwischen S12 und S25 mit *Saintpaulia ionantha* (Versuchen 4, 5, 9 und 10) wiesen bei allen Wiederholungen keine Zellteilungen auf. Nach der Fusion von S2 mit zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten wurden nur bei Versuch 2, Wiederholung 2, Zellteilungen in geringer Frequenz beobachtet. Bei den anderen Versuchen wurden bei mindestens einer Wiederholung Zellteilungen festgestellt und Kallusse gewonnen.

Die höchste Anzahl von Kallussen wurde bei der ersten Wiederholung von Versuch 8 (S3 x U08) gewonnen.

Als einige Kallusse Durchmesser von ca. 1 mm erreicht hatten, wurden diese mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Alginatfilm herausgelöst und auf das feste Kalluswachstumsmedium KF2 übertragen. Die im Alginatfilm verbliebenen Kallusse wurden für weitere zwei Wochen in frischem flüssigem KF2 belassen.

Ungefähr acht Wochen nach der Protoplastenfusion wurden die Alginatfilme in Kalium-Citrat-Lösung aufgelöst und jeweils neun Mikrokallusse nach dem Auswaschen mit flüssigen Medium KF2 auf festem KF2 kultiviert. Während der Subkultur auf dem Kalluswachstumsmedium KF2 bildeten die Kallusse zumeist Wurzeln.

**Tabelle 5.13:** Die Ergebnisse von Protoplastenfusionen zwischen fünf *Streptocarpus*-Arten und zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten, die nach Protokoll 6 fusioniert wurden

Versuch	Fusionspartner	Wiederholung 1						Wiederholung 2						Wiederholung 3					
		Anzahl der Ansätze	Anzahl der Petrischalen	# P.S. mit Zellteilung	% Teilungsfrequenzen nach 14 / 28 Tagen	Anzahl der Mikrocallusse	Anzahl der Kallusse	Anzahl der Ansätze	Anzahl der Petrischalen	# P.S. mit Zellteilung	% Teilungsfrequenzen nach 14 / 28 Tagen	Anzahl der Mikrocallusse	Anzahl der Kallusse	Anzahl der Ansätze	Anzahl der Petrischalen	# P.S. mit Zellteilung	% Teilungsfrequenzen nach 14 / 28 Tagen	Anzahl der Mikrocallusse	Anzahl der Kallusse
1	S1 x U03	2	6	4	0,7 / 2,5	3	3	3	5	4	1,2 / 3,5	12	10	1	3	0	0	0	0
2	S2 x U03	1	3	0	0	0	0	4	10	2	0,5 / 1,2	0	0	3	8	3	0	0	0
3	S3 x U03	4	8	8	1,2 / 5,5	18	18	2	3	0	0	0	0	5	11	0	0	0	0
4	S12 x U03	2	6	1	0	0	0	4	7	0	0	0	0	4	11	0	0	0	0
5	S25 x U03	3	5	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0
6	S1 x U08	3	7	4	0	0	0	6	14	5	2,2 / 10,7	12	12	4	10	0	0	0	0
7	S2 x U08	2	3	1	0	0	0	4	10	0	0	0	0	3	7	0	0	0	0
8	S3 x U08	4	7	5	3,4 / 20,2	400	342	3	6	6	4 / 12	105	92	2	4	4	2,9 / 9,8	9	9
9	S12 x U08	2	3	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	3	7	0	0	0	0
10	S25 x U08	3	7	0	0	0	0	4	10	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0

### 5.3.3.1 Kalluskultur

Die Kultur der Kallusse wurde ein- bis zweimal auf dem Medium KF2 wiederholt. Als die Kallusse Größen von 3-5 mm erreicht hatten, wurden sie auf das Medium KR10 umgesetzt. Nach ein- bis zweimaligem Umsetzen auf frisches Medium bildeten sich bei der ersten Wiederholung von Variante 1 und bei der dritten Wiederholung von Variante 8 Sprosse auf den Kallussen. Bei den anderen Kallussen waren keine Sprosse zu erkennen.

Die Subkultur von Kallussen auf den Medien KR10 und B5 mit verschiedenen Kombinationen von Hormonen führte nicht zur Sprossbildung, und die Ergebnisse entsprachen den mit Kallussen von *Streptocarpus* erzielten, die im vorherigen Kapitel (4.3.8) ausführlich beschrieben wurden.

### 5.3.3.2 Bestimmung der Ploidiestufen der Kallusse aus Protoplastenfusionen zwischen *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia ionantha*-Sorten

Die Ploidiestufe der Kallusse wurde durch DNA-Gehaltanalyse mit Hilfe eines Patrec-Durchflusscytometers unter der Anleitung von Dr. Aloma Ewald im Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau (Erfurt) bestimmt.

Weil die Ploidiestufen der Kallusse unbekannt waren, wurde zunächst die Ploidiestufe von Blättern aus In-vitro-Kultur gemessen. Abbildung 5.13 stellt die durchflusscytometrisch ermittelten Häufigkeitsverteilungen für zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten. Die *Saintpaulia*-Genotypen zeigten „Peaks“ bei Kanal 55 für U03 und bei Kanal 48 für U08. Diese Fluoreszenzintensitäten entsprachen den DNA-Gehalten diploider Kerne (jedes Chromosom lag in der Zelle somit in doppelter Zahl vor).

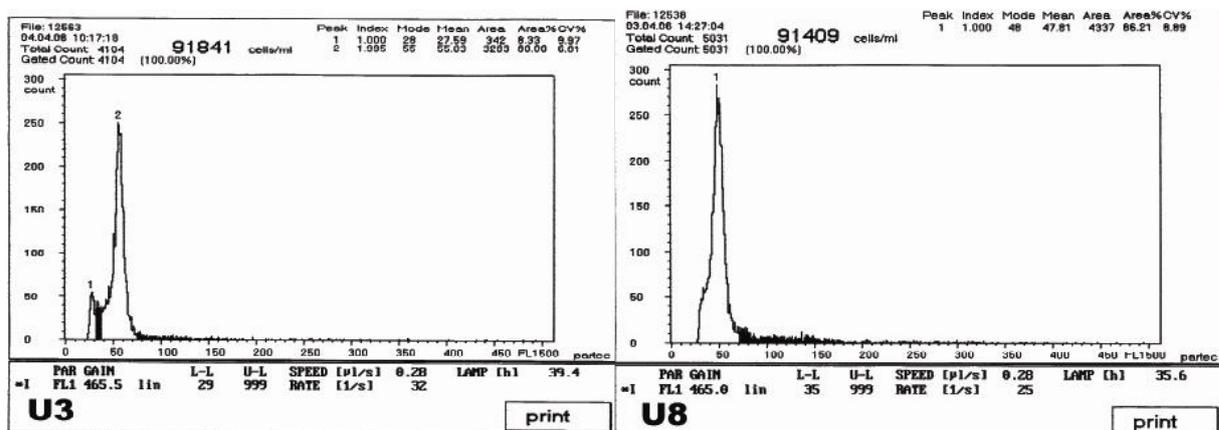


Abbildung 5.13: Durchflusscytometrische Histogramme von Blättern zweier *Saintpaulia ionantha*-Sorten

Die vergleichbaren „Peaks“ für die zwei *Streptocarpus*-Arten S1 und S3 waren bei den Kanälen 48 und 54 (Abb.14).

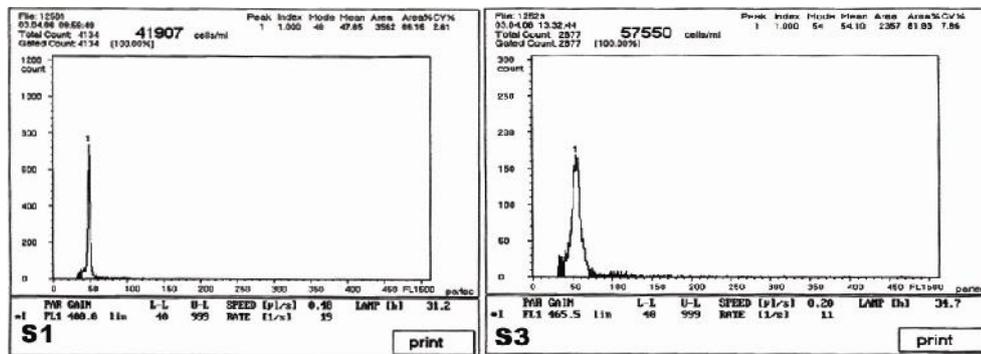


Abbildung 5.14: Durchflusszytometrische Histogramme von Blättern zweier *Streptocarpus*-Arten

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die diploiden Kallusse aller Genotypen nicht in jeder Probe gleiche Peaks aufwiesen. Beispielsweise wurde bei Kallussen aus U08 ein Spektrum von Fluoreszenzintensitäten zwischen 37 und 51 beobachtet. Jedoch waren Gruppierungen der Ploidiestufen möglich. Wegen des ähnlichen DNA-Gehalts von *Saintpaulia ionantha*-Sorten und *Streptocarpus*-Arten konnten die Unterschiede zwischen homo- und heterofusionierten Kallussen nicht festgestellt werden.

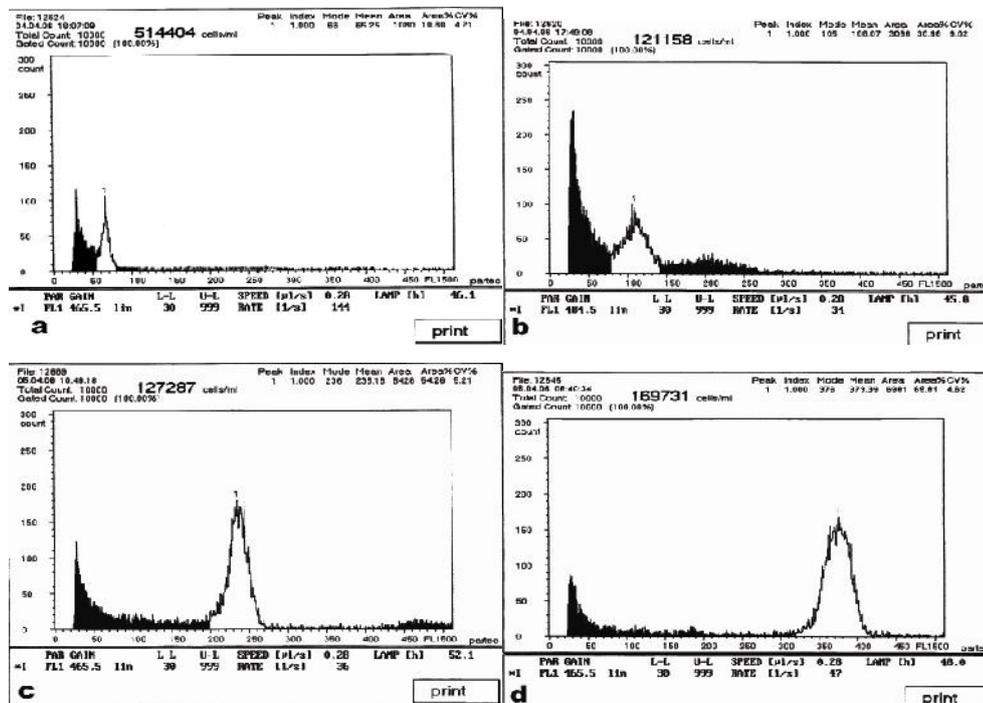
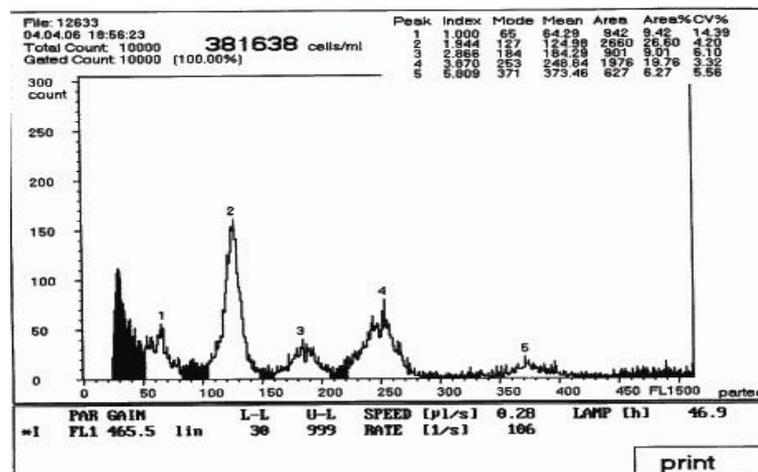


Abbildung 5.15: Ploidiestufenbestimmung durch durchflusszytometrische Histogramme von Kallussen aus der Fusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*: diploid (a), tetraploid (b), oktoploid (c) und hekaideka (d)

Abbildung 5.15 stellt die durchflusscytometrisch ermittelten Häufigkeitsverteilungen der Ploidiestufen von vier Kallussen aus der ersten Wiederholung von Versuch 8 (S3 x U08) mit unterschiedlichen Ploidiestufen dar. Grafik a repräsentiert mit einem Mode von 66 und einem CV-Wert von 4,21 einen diploiden Kallus. Grafik b zeigt mit einem „Peak“ bei Kanal 105 und einem CV-Wert von 9,2 das Histogramm eines tetraploiden Kallus. Die entsprechenden „Peaks“ von c und d liegen bei den Kanälen 236 bzw. 376 und repräsentieren Kallusse mit höheren Ploidiestufen.

Manche Kallusse waren mixoploid, so dass bei ihrer durchflusscytometrisch ermittelten Häufigkeitsverteilung mehrere „Peaks“ von zwei bis fünf auftraten. In Abbildung 5.16 ist deutlich zu erkennen, dass der Kallus mehrere Ploidiestufen bzw. „Peaks“ enthielt. Der erste „Peak“ bei Kanal 65 beweist diploide Zellen. Zusätzliche „Peaks“ bei den Kanälen 127, 184, 253 und 371 stellen tetraploide, hexaploide, oktaploide und dekaploide Chromosomensätze dar.



**Abbildung 5.16:** Durchflusscytometrisches Histogramm eines Kallus aus der Fusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens* (Versuch 8)

Visuelle Beobachtungen während der Kalluskultur zeigten, dass die Entwicklung von Kallussen mit höheren Ploidiestufen im Vergleich zu diploiden Kallussen langsamer war.

Um einen Überblick über die Ploidiestufen der Kallusse aus den Fusionen zu ermitteln, wurden die Ergebnisse der durchflusscytometrischen Untersuchungen aus zufällig ausgewählten Kallussen in folgender Tabelle 5.14 dargestellt. Dabei wurden sowohl Kallusse mit zwei „Peaks“ als auch Kallusse mit einem „Peak“ gezählt, wenn der zweite „Peak“ in einem Bereich (Area) von weniger als 50 % des ersten „Peaks“ war, weil der zweite „Peak“ bei solchen Histogrammen durch die Zellteilung bzw. die Verdoppelung der DNA während der Zellteilung auftreten könnte.

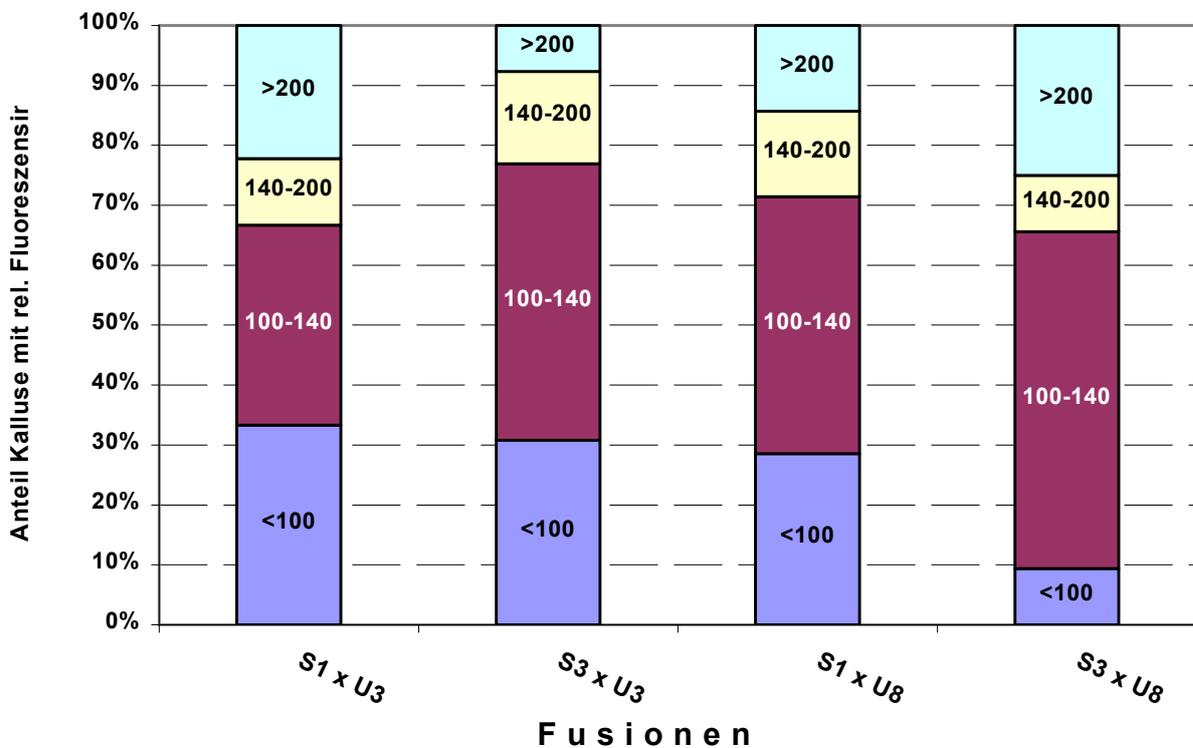
**Tabelle 5.14:** Die durchflusscytometrischen Ergebnisse von zufällig untersuchten Kallussen aus Fusionensexperimenten zwischen *Streptocarpus* und *Saintpaulia ionantha*

Vers. Nr.	Wdh.	Fusion	Anzahl untersuchter Kallusse	Kallusse mit einem „Peak“	Kallusse mit mehreren „Peaks“	Kallusse mit mehreren „Peaks“ [%]
1	2	S1 x U03	10	9	1	10
3	1	S3 x U03	18	13	5	28
6	2	S1 x U08	12	7	5	42
8	1 & 2	S3 x U08	107	32	75	70

Die Tabelle zeigt, dass der Anteil der Kallusse mit mehreren Ploidiestufen von 0 % bei Versuch 1 bis 70 % bei Versuch 8 variierten.

Da die Kallusse mit mehreren „Peaks“ bei der Fusion zwischen den Protoplasten von *Streptocarpus* und *Saintpaulia ionantha* durch verschiedene Ursachen entstanden sein könnten und Hybridisierungen schwer zu identifizieren waren, wurden die Proben mit mehreren „Peaks“ aussortiert und nur Kallusse mit einem „Hauptpeak“ für weitere Untersuchungen verwendet.

Folgendes Diagramm (Abb. 5.17) stellt die Anteile verschiedener Fluoreszenzintensitäten von Kallussen mit einem „Hauptpeak“ bei vier Versuchen dar:



**Abbildung 5.17:** Die prozentuale Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von Kallussen mit einem Hauptpeak aus vier Fusionen zwischen *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia ionantha*. (n: Tab. 5.14)

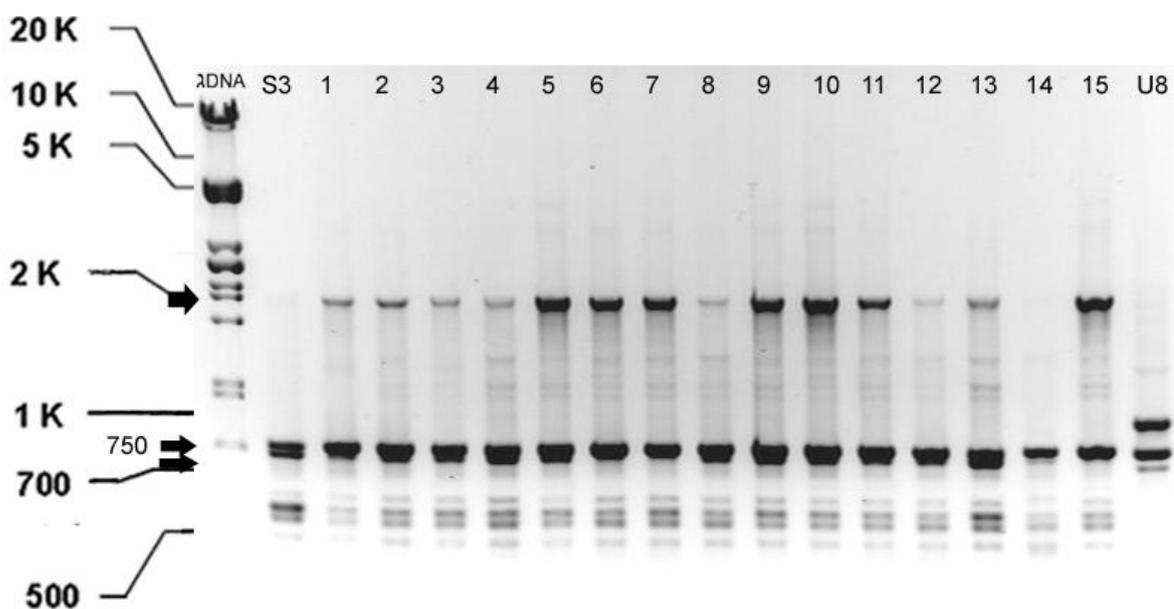
Aus der Achsenskalierung in Abbildung 5.17 ist zu erkennen, dass insgesamt mehr als 30 % der Kallusse aus Fusionen polyploid waren. Bei der Variante S3 x U08, bei der die höchste Anzahl von Kallussen untersucht wurde (s. Tab. 5.14), war der Anteil von Kallussen mit einer Fluoreszenzintensität von weniger als 100 am geringsten (15,6 %).

### 5.3.3.3 Identifizierung der Kallusse aus den Fusionen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*

Weil die untersuchten Blätter aus diploiden Pflanzen meistens Spektren von Fluoreszenzintensitäten zwischen 47 und 69 zeigten, wies ein „Peak“ im Bereich von 100-140 wahrscheinlich auf Kallusse aus Fusionen zwischen nur zwei Protoplasten hin, was zur Bildung tetraploider Zellen (Zellen mit vier Chromosomensätzen) führte. Für weitere Untersuchungen mit genetischen Markern wurden daher einige Kallusse aus dieser Gruppe ausgewählt.

Die DNA der Kallusse wurde wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben isoliert und quantifiziert (s. 2.3.8.1) und mit zwei Primern (Tab. 2.3; A09 und A15) für die Identifizierung des Genotyps untersucht.

Der Primer A09 (Abb. 5.18) zeigte bei 2 k bp eine Bande, die bei sieben Kallussen (5, 6, 7, 9, 10, 11 und 15) stark und bei sechs Kallussen (1, 2, 3, 4, 8 und 13) schwach ausgeprägt war. Dennoch war diese Bande bei beiden Fusionspartnern (S3 und U08) und zwei Kallussen (12 und 14) nicht ausgeprägt. Eine doppelte Bande bei 750 bp war bei allen Kallussen und Eltern ausgeprägt, bei den Kallussen 14 und 15 war sie jedoch zu einer einzelnen Bande reduziert.

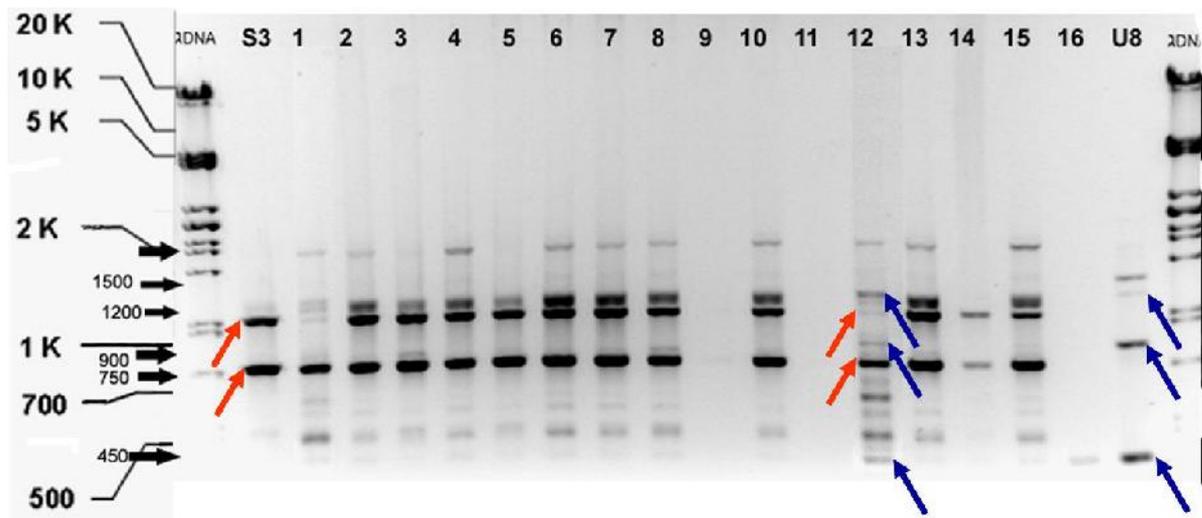


**Abbildung 5.18:** Vergleich von S3 (*Streptocarpus caulescens*), U08 (*Saintpaulia ionantha*) und 15 Kallussen aus der Fusion von S3 und U08 anhand des Primers A09

Zusätzlich wurden bei mehreren Kallussen zwischen diesen beiden deutlichen Mustern mehrere schwache Bandenmuster gebildet, die bei keinem der Fusionspartner zu sehen waren.

Außerdem war bei U08 eine Bande (ca. 900 bp) deutlich ausgeprägt, die bei S3 nicht erkennbar war. Diese wurde bei keinem der Kallusse ausgeprägt.

Die RAPD-Untersuchung anhand des Primers A15 wird in Abbildung 5.19 dargestellt:



**Abbildung 5.19:** Vergleich von S3 (*Streptocarpus caulescens*), U08 (*Saintpaulia ionantha*) und 15 Kallussen aus der Fusion von S3 und U08 anhand des Primers A15

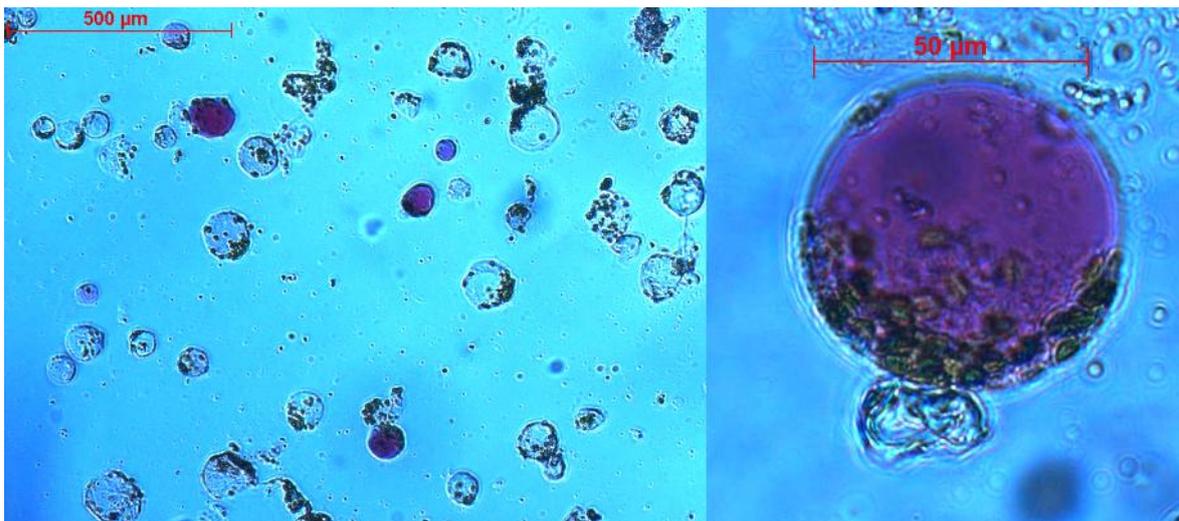
Der Primer A15 bildete sehr viele Banden. Bei ca. 2 k bp wurde bei 10 Kallussen (1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13 und 15) eine schwache Bande gebildet, die bei den anderen Kallussen sowie bei den Fusionspartnern nicht ausgeprägt wurde. Eine deutliche Bande bei ca. 1200 bp unterschied *S. caulescens* von *Saintpaulia ionantha*. Diese Bande wurde bei Kallus 14 gebildet und zeigte dessen Ähnlichkeit mit S3. Jedoch war diese Bande bei mehreren Kallussen zusammen mit einer größeren Bande bei ca. 1300 bp als doppelte Bande ausgeprägt. Eine Bande bei ca. 750 bp war bei S3 und fast allen Kallussen (außer 9, 11 und 16, wahrscheinlich wegen Ausfalls) erkennbar und bei den Kallussen 3, 7, 8, und 13 als doppelte Bande ausgeprägt. Bei 650 bp war eine deutliche Bande bei Kallus 12 ausgeprägt, die bei den anderen Kallussen sowie den Fusionspartnern nicht vorhanden war. Bei 500 bp war auch eine neue schwache Bande zu sehen, die bei allen Kallussen erkennbar war. Drei Bandenmustern bei 450 bp, 900 bp und 1200 bp von *Saintpaulia ionantha* (U08) wurden bei Kallus 12 ausgeprägt.

### 5.3.4 Protoplastenfusion innerhalb von *Streptocarpus*-Arten

Die Protoplasten von fünf *Streptocarpus*-Arten wurden nach Protokoll 6 miteinander fusioniert (Tab. 5.4). Fusionsabläufe und Kultur der Protoplasten nach der Fusion waren bei *Streptocarpus*-Arten ähnlich wie bei den Fusionen zwischen *Streptocarpus* und *Saintpaulia*, die im vorherigen Kapitel (5.3.3) ausführlich beschrieben wurden.

Aufgrund der chlorophyllhaltigen Protoplasten beider Partner konnten Heterofusionen meist nicht von Homofusionen unterschieden werden. Nur bei Fusionen, bei denen S12 beteiligt war, konnten aufgrund der chlorophyllfreien Protoplasten und besonders wegen der dunkelvioletten Protoplasten der Epidermis der Stängel Heterofusionen unter dem Mikroskop nachvollzogen werden. Bei den anderen Fusionen waren die Unterschiede zwischen Homo- und Heterofusionen nicht zu sehen, weil alle Protoplasten aus Mesophyllzellen, auch die Protoplasten von S25 (aus Stängeln), Chloroplasten enthielten und gleich aussahen.

Folgende Abbildung (Abb. 5.20) stellt den letzten Schritt der Fusion zwischen S1 und S12 dar:



**Abbildung 5.20:** Fusion zwischen Protoplasten aus S1 (Blätter aus in Dunkelheit im flüssigen Medium kultivierten Pflanzen) und S12 (Stängel aus unter Licht auf dem festen Medium kultivierten Pflanzen) nach Zugabe des Mediums BNE 9 mit einem pH-Wert von 9,5

Auf der linken Seite von Abbildung 5.20 sind deutlich mehrere Homo- und Heterofusionen zu erkennen. Dabei sind auch einige durch Fusion geplatze Protoplasten zu sehen. Auf der rechten Seite zeigt die Abbildung, dass eine Mesophyllzelle von S1 mit einer Epidermiszelle von S12 fusionierte, so dass Inhalt und Chloroplasten der Mesophyllzelle in der Epidermiszelle deutlich erkennbar sind.

Nach den Fusionen der Protoplasten, wie in Tabelle 5.4 aufgelistet, wurden diese in

Alginatfilme eingebettet und im Medium 8pm7C kultiviert. 14 und 28 Tage nach der Kultur wurden die Zellteilungsfrequenzen wie in Kapitel 3.2.14 beschrieben bonitiert und berechnet. Die Ergebnisse der Protoplastenfusionen zwischen fünf *Streptocarpus*-Arten werden in folgender Tabelle 5.15 aufgelistet. Diese zeigt, dass bei sechs Varianten aus neun Versuchen Zellteilungen beobachtet wurden und sich die Protoplasten bei fünf interspezifischen Fusionen bis zur Bildung von Kallussen entwickelten.

Bei Variante A brach die Entwicklung von Protoplasten bei beiden Wiederholungen nach der Zellteilung durch Kontamination ab. Daher wurden aus dieser Fusion keine Kallusse gewonnen. Bei Variante E wurde in den Proben aus der ersten Wiederholung nach neun Tagen eine Kontamination festgestellt.

Die Zellteilungsfrequenzen waren bei einigen Fusionsansätzen sogar höher als die der Kontrolle. Beispielsweise lagen die Zellteilungsraten 14 Tage nach den Fusionen bei den Varianten D und I bei 8,9 % bzw. 9,5 %, während sie bei den entsprechenden Kontrollen bei 3,7 % bzw. 7,2 % lagen.

#### **5.3.4.1 Kalluskultur**

Ungefähr zwei Monate nach den Fusionen wurden die Alginatfilme in Kalium-Citrat-Lösung aufgelöst und die Mikrokallusse auf das feste KF2-Medium umgesetzt. Nach der Übertragung der Kallusse auf das Medium KR10 und mehrmaliger Subkultur wurden keine Sprossbildungen bei den Kallussen beobachtet. Wie bei den *Streptocarpus*-Arten (s. 4.3.8) bildeten sich bei Teilen der Kallusse auf den Medien KF2 und KR10 Wurzeln.

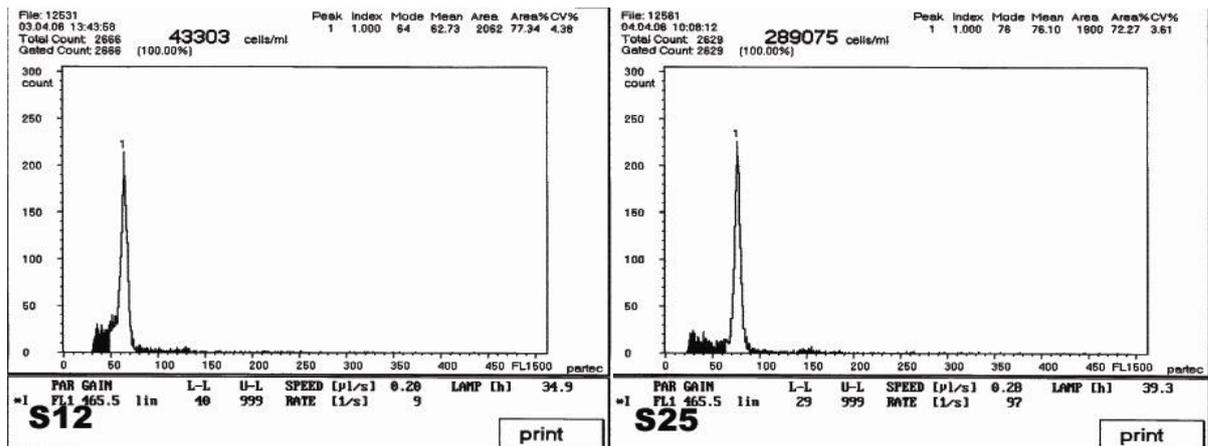
#### **5.3.4.2 Bestimmung der Ploidiestufe der Kallusse**

Die Ploidiestufe der Kallusse wurde durch DNA-Gehaltsanalyse mit Hilfe eines Partec-Durchflusscytometers, wie in Kapitel 5.3.2.2 beschrieben, bestimmt. Abbildung 5.21 stellt die durchflusscytometrisch ermittelten Häufigkeitsverteilungen für Blätter aus zwei weiteren *Streptocarpus*-Arten S12 und S25 dar und ergänzt die Grafiken, die in Abbildung 5.14 gezeigt wurden.

**Tabelle 5.15:** Die Ergebnisse aus neun Fusionen innerhalb von *Streptocarpus*-Arten

Versuch	Fusionspartner	Wiederholung 1						Wiederholung 2					
		Anzahl der Ansätze	Anzahl der Petrischalen	# P.S. mit Zellteilung	% Teilungsfrequenz nach 14 / 28 Tagen	Anzahl der Mikrocallusse	Anzahl der Kallusse	Anzahl der Ansätze	Anzahl der Petrischalen	# P.S. mit Zellteilung	% Teilungsfrequenz nach 14 / 28 Tagen	Anzahl der Mikrocallusse	Anzahl der Kallusse
A	S1 x S2	3	12	9	4,5 / -		*	3	10	4	7,7 / 15,8	*	
B	S1 x S3	2	5	4	3,8 / 11,2	183	148	2	4	0			
C	S1 x S12	3	6	6	4,7 / 15,3	265	207	4	9	3	2,8 / 9,9	95	58
D	S1 x S25	4	11	7	8,9, / 27,3	320	275	5	15	12	5,3 / 12	180	137
E	S2 x S3	2	8	*				2	6	0			
F	S2 x S12	2	6	0				2	6	0			
G	S2 x S25	2	5	0				2	6	0			
H	S3 x S12	3	10	3	1,7 / 4,8	32	21	5	17	0			
I	S3 x S25	3	10	6	9,5 / 14,6	180	145	2	6	6	5,5 / 19	256	240

\* Durch Kontamination abgestorben



**Abbildung 5.21:** Durchflusscytometrische Histogramme für Blätter der zwei *Streptocarpus*-Arten *Streptocarpus glandulosissimus* (links) und *Streptocarpus caulescens* v. *pallens* (rechts)

In Abbildung 5.21 ist zu sehen, dass das Blatt von S12 einen „Peak“ bei Kanal 64 und das Blatt von S25 einen „Peak“ bei Kanal 78 hatte. Dies entspricht den DNA-Gehalten diploider Kerne.

Die Ploidiestufe der Kalluse aus Protoplastenfusionen zwischen den *Streptocarpus*-Arten wurden durchflusscytometrisch untersucht. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben (5.3.3.2), zeigten die Histogramme unterschiedliche Ploidiestufen mit einem oder mehreren „Peaks“ (s. Abb. 5.16). Tabelle 5.16 zeigt eine Zusammenfassung aus zufällig ausgewählten Kallussen, die untersucht wurden.

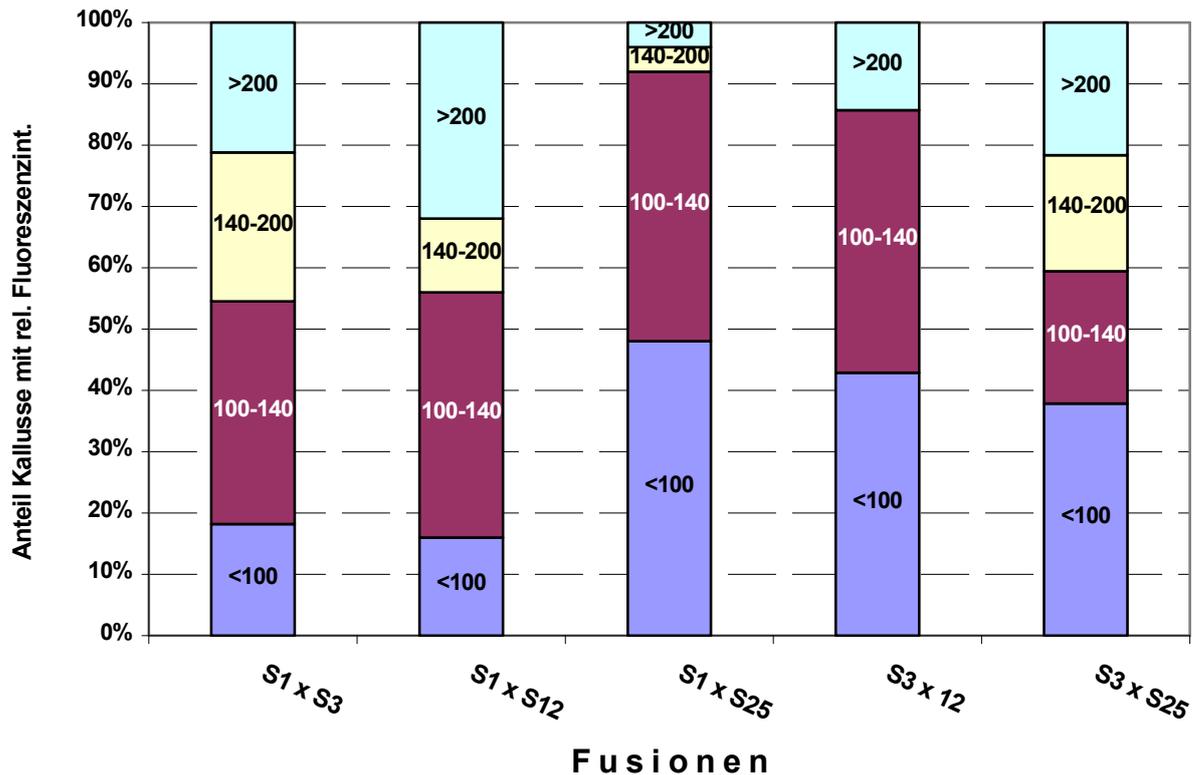
**Tabelle 5.16:** Ergebnisse von durchflusscytometrischen Untersuchungen zufällig ausgewählter Kalluse aus Fusionen zwischen *Streptocarpus*-Arten

Versuch	Wdh.	Fusion	Anzahl der untersuchten Kalluse	Kalluse mit einem "Peak"	Kalluse mit mehreren "Peaks"	Kalluse mit mehreren "Peaks"[%]
B	1	S1 x S3	50	33	17	34
C	1	S1 x S12	48	25	23	48
D	1 & 2	S1 x S25	61	25	36	59
H	1	S3 x S12	12	7	5	42
I	1 & 2	S3 x S25	56	37	19	34

Die Tabelle zeigt, dass der Anteil von Kallussen mit mehreren Ploidiestufen zwischen 34 % bei den Versuchen B und I und 59 % bei Versuch D variierte.

Wie im vorherigen Kapitel wurden auch hier die mixoploiden Kalluse aussortiert und nur die Kalluse mit einem „Hauptpeak“ für weitere Untersuchungen verwendet.

Abbildung 5.21 stellt die prozentuale Verteilung verschiedener Ploidiestufen von Kallussen mit einem „Peak“ bei allen Versuchen dar:



**Abbildung 5.22:** Die prozentuale Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von Kallussen mit einem „Hauptpeak“ aus Fusionen zwischen *Streptocarpus*-Arten

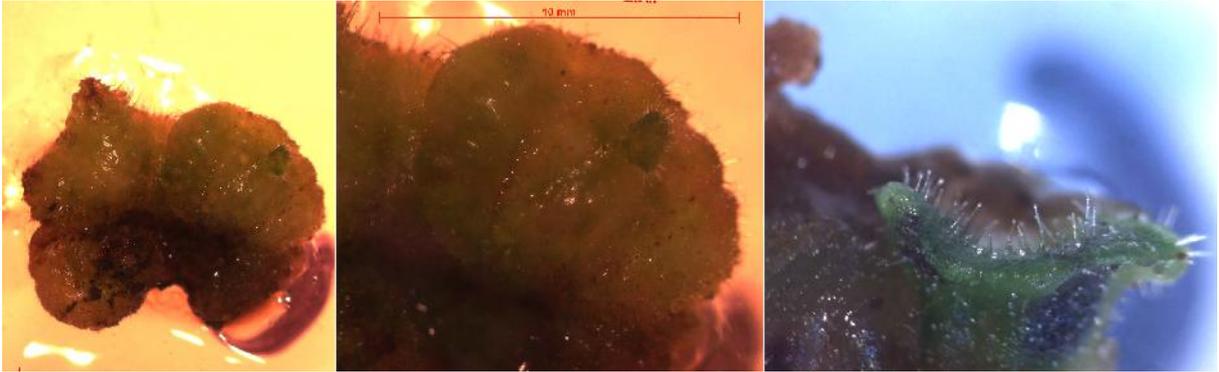
In Abbildung 5.22 ist deutlich zu erkennen, dass zwischen 52 % und 82 % der Kallusse aus den Fusionen mit einem „Hauptpeak“ polyploid waren. Der Anteil von Kallussen mit Fluoreszenzintensitäten zwischen 100 und 140 variierte bei den verschiedenen Versuchen zwischen 22 % und 36 %.

### 5.3.4.3 Versuche zur Sprossbildung

Da sich auf den Kallussen auf dem Medium KR10 keine Sprosse bildeten, wurden die Kallusse auf verschiedene Medien mit unterschiedlichen Zugaben (s. 4.2.9, Tab. 4.3) umgesetzt.

Die Ergebnisse waren ähnlich wie bei den Kallussen aus Protoplastenkultur bei *Streptocarpus*-Arten, und meistens wurde Wurzelbildung beobachtet (s. 4.3.8). Jedoch bildeten sich auf einem Kallus aus Fusion C (S1 x S12) auf dem Medium B5, Variante C (0,5 mg / l IAA, 4 mg / l 2iP und 2 mg / l Metatopolin) nach zwei Monaten Sprosse.

Abbildung 5.23 zeigt die Entwicklung der Sprosse auf dem entsprechenden Kallus.



**Abbildung 5.23:** Die Entwicklung von Sprossen auf einem Kallus aus der Protoplastenfusion zwischen S1 x S12 auf dem Medium B5, Variante C

Danach wurde der Kallus auf das Sprossregenerationsmedium 9.1 (s. 3.2.2) umgesetzt und in Schwachlichtbedingung überführt. Die Sprosse ergrünten innerhalb weniger Tage.

Als die Sprosse auf Größen zwischen 0,5 und 1 cm herangewachsen waren, wurden sie vom Kallus abgeschnitten und zur Bewurzelung auf hormonfreiem Medium 9.0 kultiviert. Nach zwei Monaten wurden die Pflanzen zur Akklimatisierung in das Gewächshaus gebracht und getopft (Abb. 5.24).



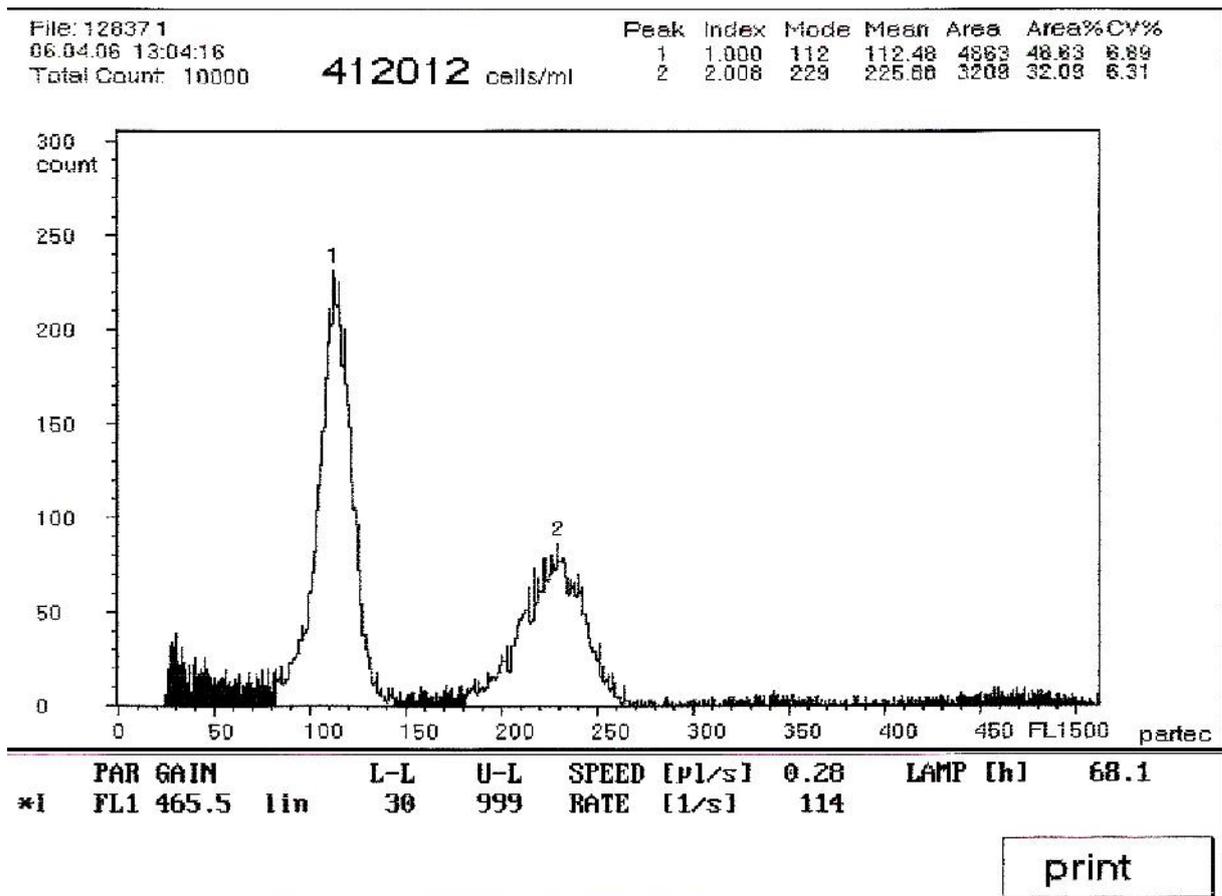
**Abbildung 5.24:** Links S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*), rechts S12 (*S. glandulosissimus*) und in der Mitte die Pflanze aus der Protoplastenfusion zwischen S1 und S12 im Gewächshaus

S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*) wies gestreckte Sprossachsen mit mittlerer Internodienlänge auf. Die Blätter waren bis zu 4 cm lang, schwach gezähnt und besaßen dunkelgrüne Kutikulaoberflächen. S1 bildete relativ viele violette Blüten, die zwischen 3 und 4 cm lang waren.

S12 (*S. glandulosissimus*) wies gestreckte Sprossachsen mit dunkelvioletter Epidermis auf. Die Blätter waren rund, lederartig, mit glattem Rand, und ihre Blattoberflächen waren glänzend. Die Internodien von S12 waren sehr lang. Die Blüten waren violett und ca. 2 bis 3 cm lang.

Die gewonnenen Pflanzen zeigten gestreckte, hängende Sprossachsen mit kurzen Internodien und violetter Epidermis. Die Blätter waren bis zu 4,5 cm lang, dick, relativ rund, mit langen Blattstielen, fleischig, schwach gezähnt und dunkelgrün. Sie blühten spät, und die Blüten sahen wie die Blüten von S1 aus.

Zur Identifizierung der Pflanze wurde im Kallusstadium eine Probe durchflusscytometrisch untersucht (Abb. 5.25).



**Abbildung 5.25:** Durchflusscytometrisches Histogramm des Kallus aus dem Versuch C, auf dem Sprosse regenerierten

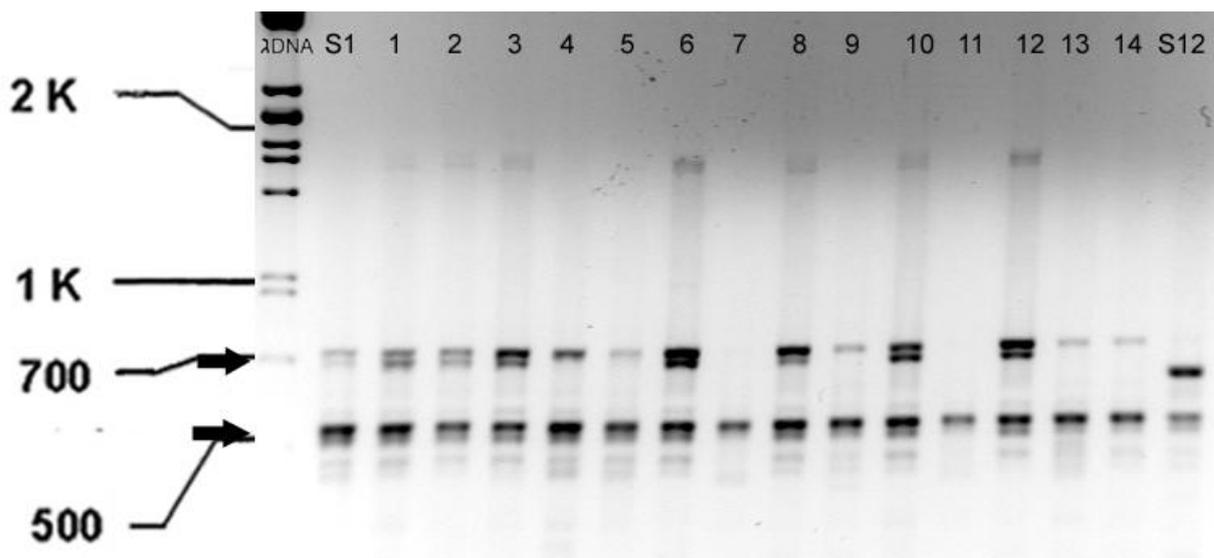
Der Kallus zeigte zwei „Peaks“ bei den Kanälen 112 und 229, was dem DNA-Gehalt tetraploider und oktaploider Kerne entsprach. Weil die „Peaks“ für diploide S1 und S12 aus den Mittelwerten von fünf Proben bei 46 bzw. 60 lagen, konnten die tetraploiden und oktaploiden Kerne sowohl durch Homo- als auch durch Heterofusionen, wie in der Tabelle 5.17 aufgelistet, entstanden sein.

**Tabelle 5.17:** Die vermuteten Häufigkeitsverteilungen für zwei *Streptocarpus*-Arten S1 und S12 bei Homo- und Heterofusionen

Variante	Ploidiestufe		
	diploid	tetraploid	oktaploid
S1	46	92	184
S12	64	128	256
S1 x S12	55	110	220

Ein Vergleich zwischen der Tabelle 5.17 und den entsprechenden „Peaks“ bei Abb. 5.24 (bei den Kanälen 112 und 129) zeigt, dass der DNA-Gehalt des Kallus einer Heterofusion zwischen S1 x S12 sehr nahe steht.

Die Überprüfung der Kallusse aus der Protoplastenfusion zwischen S1 und S12 erfolgte durch den Primer A09 (Abb. 5.26).

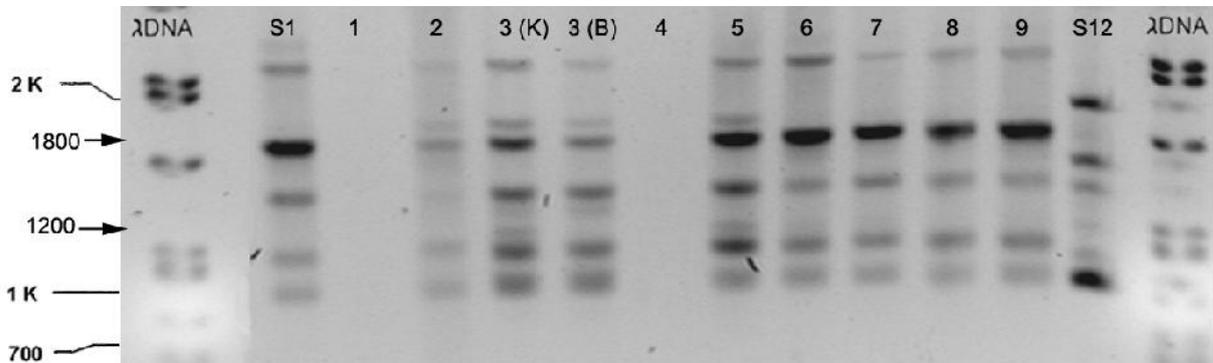


**Abbildung 5.26:** Vergleich von S1, S12 und 14 Kallussen aus der Fusion zwischen S1 x S12 (Versuch C) anhand des Primers A09

Der Primer zeigte bei ca. 700 bp eine doppelte, schwache Bande von S1, die bei fünf Kallussen (3, 6, 8, 10, 12) sehr stark und bei 2 Kallussen (1 und 2) schwach ausgeprägt war. Bei fünf Kallussen (4, 5, 9, 13 und 14) zeigte sich nur eine einzelne Bande, bei zwei Kallussen (7 und 11) war sie überhaupt nicht erkennbar. Eine deutliche Bande bei 500 bp, die bei S1 als starke Bande und bei S12 als schwache Bande erkennbar war, war bei allen Kallussen, auch bei 6, der als einziger Sprosse gebildet hatte, stark ausgeprägt.

Die Kallusse der Fusionsprodukte wurden auch mit dem Primer A04 getestet. Dabei wurde

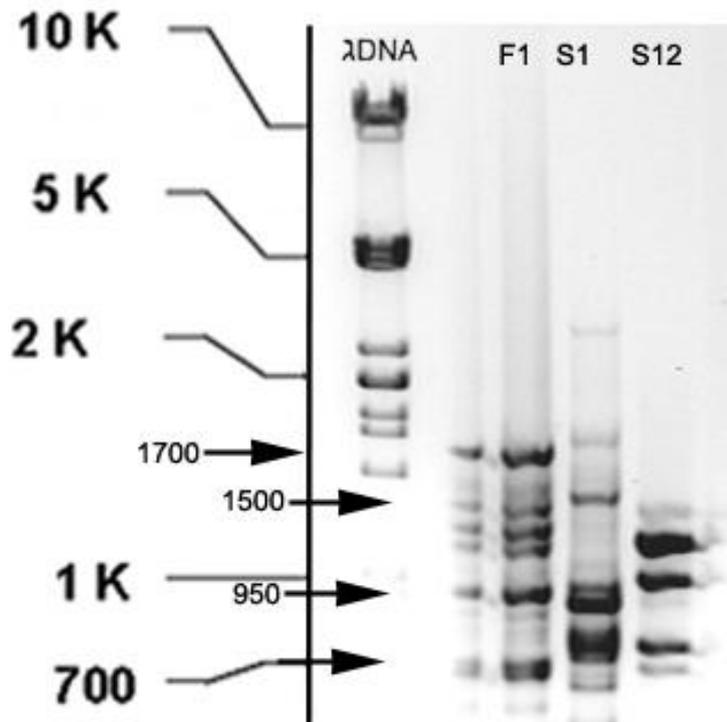
auch die DNA von Blättern von aus dem entsprechenden Kallus regenerierten Pflanzen aus der Fusion mit der DNA verwendet (Abb. 27).



**Abbildung 5.27:** Vergleich von S1, S12 und 9 Kallussen aus der Fusion zwischen S1 x S12 (Versuch C) anhand des Primers A04. 3 (K) repräsentiert die Probe aus dem Kallus und 3 (B) die Probe aus der regenerierten Pflanze

Durch den Primer A04 wurden bei den Kallussen die meisten Banden wie bei S1 ausgeprägt. Aber bei ca. 2500 k bp bildete sich bei allen zehn Proben eine schwache Bande, die bei den Fusionspartnern nicht ausgeprägt wurde. Eine starke Bande bei ca. 1800 von S1 konnte bei allen Fusionsprodukten identifiziert werden. Diese Bande trat bei vier Proben, darunter der Probe aus den Blättern der regenerierten Pflanze, gemeinsam mit einer schwachen Bande auf, die einer starken Bande bei S12 ähnelte. Eine schwache Bande bei ca. 800 bp wurde bei S12, Probe 3 (K) und Probe 10 ausgeprägt.

Die Überprüfung der DNA-Probe aus Blättern der aus der Fusion regenerierten Pflanze wurde auch durch Primer A20 durchgeführt (Abb. 28).

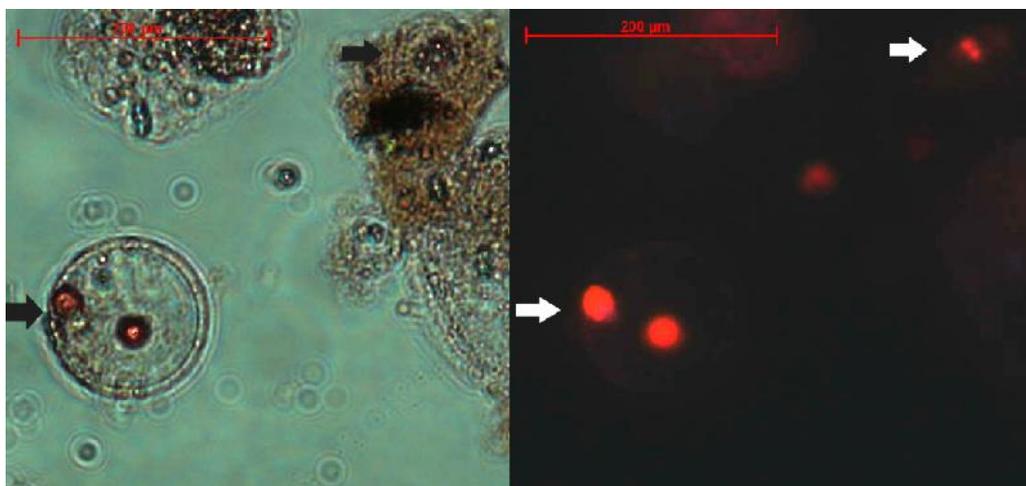


**Abbildung 5.28:** Vergleich von S1, S12 und der regenerierten Pflanze aus der Fusion zwischen S1 x S12 (Versuch C) anhand des Primers A20

Der Primer zeigte bei ca. 1700 bp eine starke Bande beim Fusionsprodukt, die bei keinem der Fusionspartner zu sehen war. Eine Bande bei 1500 bp wurde bei S1 stark ausgeprägt. Bei den Fusionsprodukten wurde sie ganz schwach gebildet. Eine Bande bei 950 bp war bei S1 und F1 deutlich erkennbar. Bei 700 bp wurde eine schwache Bande ausgeprägt, die bei den Fusionsprodukten deutlich zu sehen war.

### 5.3.5 Optimierung der Elektrofusion

Die verschiedenen Schritte während der Elektrofusionen der Protoplasten konnten mit dem vorhandenen Gerät, einem High-Voltage-Cell-Processor, nicht nachvollzogen werden. Erst nach der Fusion wurden die Proben unter dem Mikroskop überprüft.



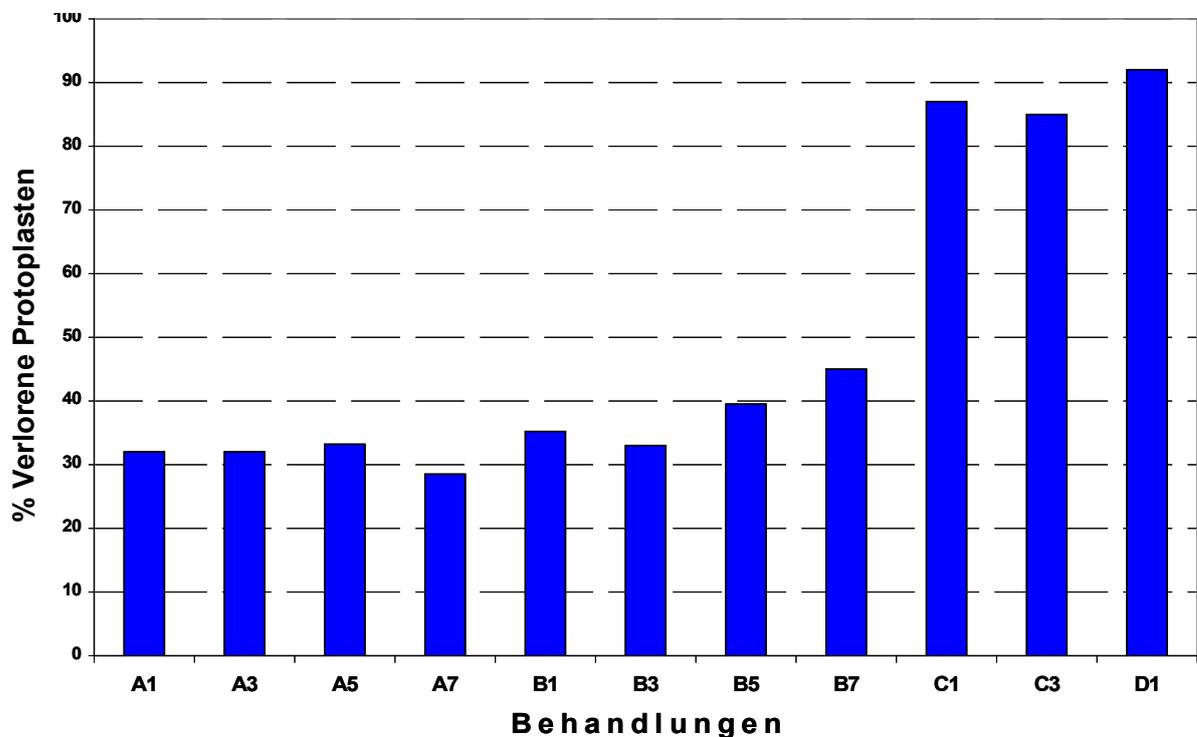
**Abbildung 5.29:** Zwei zweikernige Protoplasten nach der Elektrofusion zwischen S3 und U08

Abbildung 5.29 stellt zwei zweikernige Protoplasten, die durch Elektrofusion zwischen S3 (*Streptocarpus caulescens*) und U08 (*Saintpaulia ionantha*) bei einer Spannung von 750 Volt entstanden waren, dar. Dabei sind auch einige geplatzte Protoplasten zu sehen:

Die Ergebnisse der verschiedenen Behandlungen (Tab. 5.5) zur Elektrofusion zwischen U08 und S3 zeigten, dass die Varianten mit zwei DC-Hochspannungen (Pulsen) zur Zerstörung einer großen Anzahl von Protoplasten führen. Nach der Fusion mit zwei Pulsen waren in den Lösungen kaum noch intakte Protoplasten zu finden.

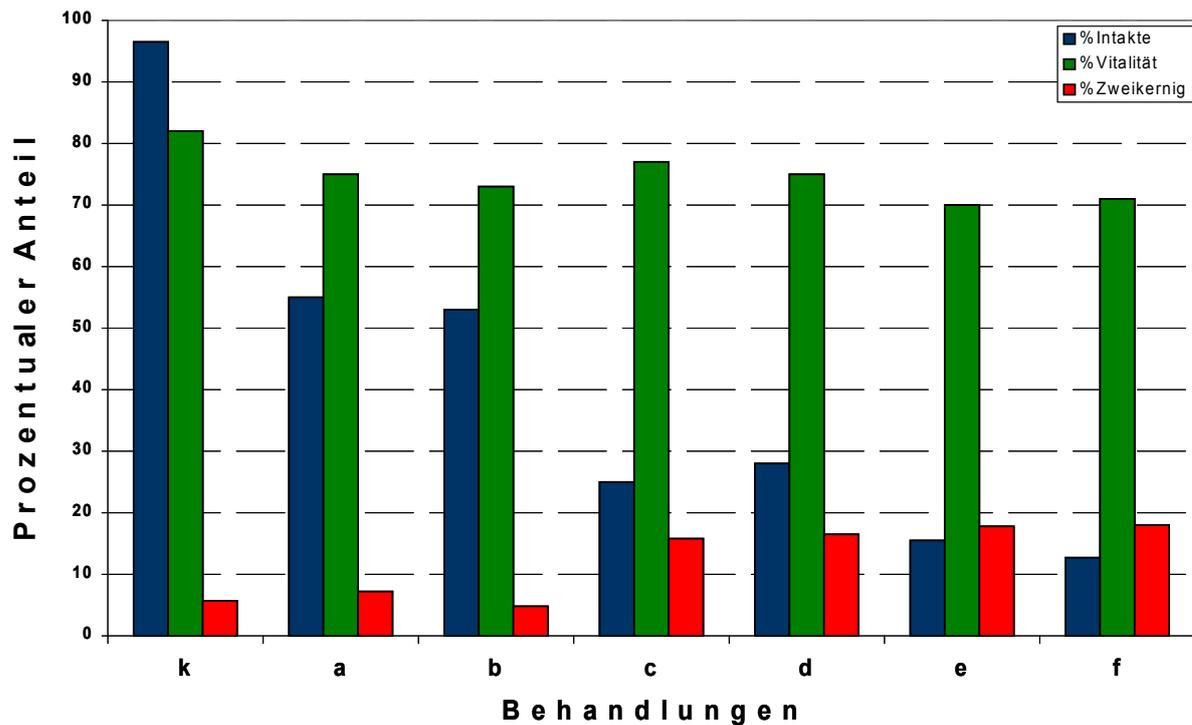
Bei den anderen Varianten wurde die Anzahl intakter Protoplasten in der Kammer gezählt und mit der Dichte der Protoplasten vor der Fusion ( $4 \times 10^4$ ) verglichen und der Anteil durch die Behandlungen geplatzter Protoplasten berechnet (Abb. 5. 30).

Aus der Grafik ist zu erkennen, dass AC-Hochspannungen von 1250 V (C) und 1500 V (D) zur Zerstörung der meisten Protoplasten führten. Bei Pulsen zu 1250 V platzten mehr als 85 % der Protoplasten, bei 1500 V Spannung gingen über 90 % verloren. Spannungen zwischen 300 (A) und 750 Volt (B) zeigten keine großen Unterschiede hinsichtlich der Schädigung der Protoplasten. Die Verluste bei Variante B waren nur geringfügig höher.



**Abbildung 5.30:** Vergleich der Verluste an Protoplasten während der Elektrofusion zwischen S3 und U8 bei verschiedenen Behandlungen (s. Tab. 5.5)

Die Ergebnisse des zweiten Vorversuches werden in folgender Abbildung (5. 31) dargestellt:



**Abbildung 5.31:** Einfluss verschiedener Behandlungen während der Elektrofusion auf Intaktheit, Vitalität und Zweikernigkeit der Protoplasten (s. Tab. 5.6)

In Abbildung 5.30 ist zu erkennen, dass mehr als 40 % der Protoplasten bei 300 Volt platzten; bei Erhöhung der Spannung auf 750 V gingen mehr als 70 % der Protoplasten verloren. Bei weiterer Erhöhung stieg der Anteil geplatzter Protoplasten auf über 80 %. Die Vitalität der Protoplasten wurde mit Zunahme der Spannung leicht beeinträchtigt. Beispielsweise nahm sie bei den Varianten a und b mit Pulsen von 300 V im Vergleich zur Kontrolle nur um 8, bei einer Spannung von 750 V (Varianten c und d) um 5 bzw. 10 % ab. Bei einer Spannung von 1000 V (Varianten e und f) sank sie um 12 bzw. 11 %. Dagegen nahm der Anteil zweikerniger Protoplasten mit Erhöhung der Spannung zu. Bei Pulse von 300 V erhöhte sich der Anteil zweikerniger Protoplasten durch 10 ms. um 1,5 % (Variante a). Bei Anwendung von 20 S. ms (Variante b) wurde der Anteil zweikerniger Zellen bei der ersten Wiederholung auf 7,6 % und bei der zweiten Wiederholung auf 2 % eingeschätzt. Damit lag der Mittelwert (4,8 %) niedriger als bei der Kontrolle. Bei 750 V Pulse war eine deutliche Steigerung des Anteils zweikerniger Protoplasten zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle stieg er bei 10 S. ms auf 15,8 % und bei 20 S. ms auf 16,5 %. Die weitere Erhöhung der Spannung auf 1000 V konnte bei entsprechender Dauer (10 bzw. 20 S. ms) den Anteil zweikerniger Protoplasten auf 17,8 % bzw. 18 % erhöhen.

Nach den Fusionen wurden die Fusionsprodukte in Alginatfilm eingebettet und im Medium 8pm7C kultiviert.

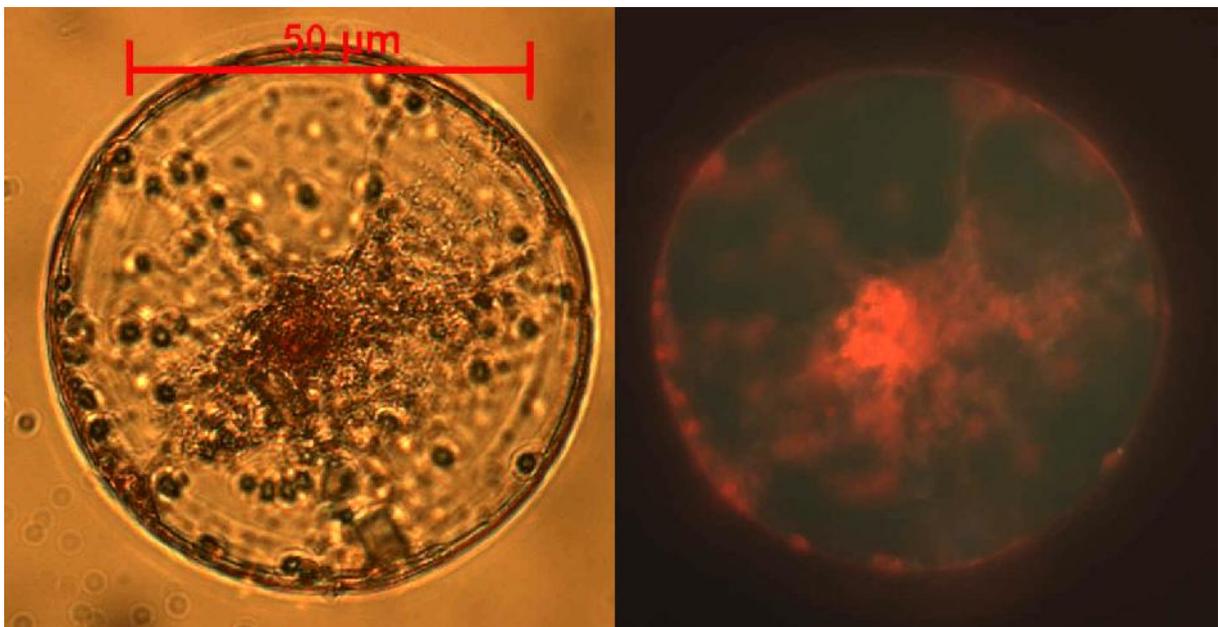
Die tägliche Beobachtung unter dem Mikroskop zeigte, dass die meisten Kulturen der Varianten e und f schnell verbräunten, so dass sie nach drei Tagen kaum noch intakte Protoplasten enthielten. Bei einigen der anderen Varianten verzögerte sich dieser Prozess um bis zu 15 Tage, aber es kam nicht zu Zellteilungen. Insgesamt waren Proben der Variante d im besten Zustand, gefolgt von den Varianten c und b. Für die im Folgenden dargestellten Versuche wurde Variante d angewendet.

### 5.3.6 Elektrofusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens*

Durch Elektrofusion zwischen den Protoplasten von U08 und S3 wurden bei der ersten Wiederholung bei acht Petrischalen, in denen Protoplasten nach der Fusion direkt, also ohne Floatierung in Saccharoselösung, kultiviert wurden, keine Zellteilungen beobachtet. Aber bei drei Petrischalen, die Protoplasten enthielten, die nach der Fusion zusätzlich mit 20%iger Saccharose gereinigt worden waren, kam es nach 12 Tagen zu Zellteilungen.

Bei der zweiten Wiederholung fanden keine Zellteilungen statt.

Abbildung 5.32 stellt einen zweikernigen Protoplasten aus der Fusion zwischen *Streptocarpus caulescens* (S3) und *Saintpaulia ionantha* (U08) dar:



**Abbildung 5.32:** Ein zweikerniger Protoplast nach der Elektrofusion zwischen S3 (*Streptocarpus caulescens*) und U08 (*Saintpaulia ionantha*) bei Variante d

Die Anzahl der Protoplasten wurde nach der Fusion und der Reinigung mit 20%iger Saccharoselösung gezählt. Das Ergebnis zeigte, dass 56 % der Protoplasten während der Elektrofusion verloren gingen. Durch Reinigung der Protoplasten mit Saccharoselösung

gingen weitere 22 % der intakten Protoplasten verloren, und nur 23 % der Protoplasten konnten kultiviert werden

Die Zellteilungen wurden wie in Kapitel 5.3.2 ausführlich beschrieben nach zwei Wochen und nach vier Wochen bonitiert. Insgesamt betrug die durchschnittlichen Teilungsfrequenzen nach zwei Wochen bei drei Petrischalen 11 %; nach weiteren zwei Wochen stieg sie auf 26 %. Nach zwei Monaten waren Mikrokallusse sichtbar, jedoch starben sie kurz vor der Übertragung auf das feste Medium KF2 aus unbekannter Ursache ab.

#### 5.4 Diskussion

Die Vitalität und die Reinigung der Protoplasten von den Bruchstücken nach den Fusionen waren die bedeutendsten Faktoren, die die weitere Entwicklung der Fusionsprodukte aus chemischen und elektrischen Fusionen beeinflussten. Die Vitalität der Protoplasten ging vor allem auf das Ausgangsmaterial zurück (s. 4.4). Aber auch durch die Fusion wurde die Vitalität der Protoplasten durch mehrere Faktoren mehr oder weniger beeinträchtigt.

Manche Protoplasten fusionierten während der Enzymbehandlung oder der Isolierung, wahrscheinlich aber nach der Mischung der Protoplasten miteinander. YE UND EARLE (1991) berichteten, dass die spontane Fusion auf Art und Herkunft der eingesetzten Enzymlösung zurückging. Spontane Protoplastenfusionen würden vermutlich durch die Expansion und die darauf folgenden plasmodesmatalen Verbindungen zwischen den Protoplasten verursacht (WITHERS UND COCKING 1972). Auch Art und Konzentration des osmotischen Stabilisators beeinflussten deutlich das Fusionssystem. Wurde die Konzentration von Mannitol von 0,4 M auf 0,7 M erhöht, reduzierten sich Aggregation und Fusion bei Protoplasten von Kartoffeln (KELLER UND MELCHERS 1973). Als die Konzentration von Mannitol auf 0,1 M gesenkt wurde, wurden die Protoplasten instabil und platzten. Die Rate für diese „spontane Fusion“ betrug bei unserer Untersuchung weniger als 10 % (s. Abbildungen 5.1, 5.6, 5.8, Tabellen 5.9, 5.12). Gezielte Fusionen wurden durch Chemikalien, vor allem PEG, oder elektrische Spannung erreicht.

Die Vitalität der Protoplasten wurde durch die PEG-Behandlung beeinträchtigt. In Hinblick auf die Beschädigung der Protoplasten durch PEG spielten Behandlungsdauer und PEG-Konzentration die wesentlichen Rollen. Bei einer Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens* wurde die negative Auswirkung von PEG auf die Vitalität der Protoplasten durch Anfärbung mit FDA eingeschätzt (s. 5.3.1.2). Nach einer zehnminütigen PEG-Behandlung war die Vitalität der Protoplasten leicht herabgesetzt. Mit Verlängerung der Behandlungsdauer auf bis zu 40 min. wurde ein stetiges Absinken der

Vitalität um bis zu ca. 35 % beobachtet, bei 50 min. Behandlungsdauer ging die Vitalität der Protoplasten um ca. 65 % zurück (Abb. 5.2). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Autoren wie ERIKSSON (1965), die keine toxischen Auswirkungen von PEG auf die Protoplasten feststellten, und stimmt mit den Ergebnissen von Autoren überein, die toxische Effekte von PEG auf die Protoplasten fanden. BHOJWANI UND RAZDAN (1996) vertraten die Auffassung, dass PEG auf die Protoplasten einiger Arten toxische Nachwirkungen hatte. KAO UND MICHAYLUK (1974) berichteten bei einem Versuch zur Fusion zwischen *Vicia hajastana* und *Pisum sativum*, dass eine längere PEG-Behandlung zur Reduzierung der Protoplastenfusionsrate und der Vitalität der Protoplasten führte. Beispielweise lagen die Frequenzen der Protoplastenfusionen nach 45 min. PEG-Behandlung bei 5,5 %; als die Inkubation der Protoplasten in der PEG-Lösung auf 16 Stunden verlängert wurde, reduzierten sich die Frequenzen der Protoplastenfusionen auf 2,8 %, und viele Protoplasten starben ab. ASSANI ET AL. (2005) kamen bei der Protoplastenfusion von *Musa* zu dem Ergebnis, dass eine PEG-Konzentration über 50 % und eine PEG-Behandlungszeit von mehr als 30 min. zur Schädigung der Protoplasten führte. Toxische Wirkungen von PEG stellten auch DE FILIPPIS ET AL. (2000) in einem Vergleichstest fest. Sie fusionierten die Protoplasten aus Mesophyllzellen von *Pisum sativum* durch Elektrofusion und 30%iges PEG (1500) und schätzten nach den Fusionen die Vitalität der Protoplasten durch Anfärbung mit FDA ein. Sie berichteten, dass durch PEG-Behandlung mehr als 50 % der Protoplasten verloren gingen und sich die Vitalität der verbliebenen Protoplasten um mehr als 30 % reduzierte. Bei der Elektrofusion blieben im Vergleich zur Kontrolle trotz doppelter Fusionsfrequenzen mehr als 80 % der Protoplasten intakt, und die Vitalität der verbliebenen Protoplasten wurde nur um 10 % reduziert. GÜREL ET AL. (2002) berichteten, dass die geringste Toxizität von PEG auf die Protoplasten von *Beta vulgaris* bei 20%iger PEG-Lösung und 25 min. Behandlungsdauer erreicht wurde. Bei der Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus* sowie zwischen *Streptocarpus*-Arten ist die Schädigung der Vitalität der Protoplasten durch PEG noch höher einzuschätzen, weil während der PEG-Behandlung zahlreiche Protoplasten verloren gingen, was bei der Einschätzung der Vitalität nicht berücksichtigt werden konnte. Die genaue Bewertung der toxischen Auswirkungen von PEG auf die Vitalität der Protoplasten war den Untersuchungen zur hier vorliegenden Arbeit jedoch problematisch, weil während der Fusionen zwischen den Protoplasten mehrere Faktoren wie Ausgangsmaterial, pH-Wert und Kalzium-Ionen bei den PEG- und Nachbehandlungslösungen, Dauer der PEG-Behandlung und Fusionsmethode wirkten. Jeder Faktor sowie die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren konnten die

Vitalität der Protoplasten beeinflussen. In jedem Fall, sowohl laut der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit als auch laut der Literaturangaben, ist festzustellen, dass PEG negative Wirkungen auf die Vitalität der Protoplasten hat. Die Erklärung für die toxischen Wirkungen von PEG geht wahrscheinlich auf die Verunreinigung des PEG während der Produktion zurück. Verunreinigungen durch zusätzliche Antioxidanten, Aldehyde, Ketone, Säure und oxidierte Abbauprodukte der Ausgangsmaterialien verursachen während der Produktion toxische Wirkungen von PEG auf Protoplasten (HAMBURGER ET AL. 1975; CHAND ET AL. 1998).

MENCZEL UND WOLFE (1984) konnten bei der Protoplastenfusion zwischen *Brassica napus* und *Brassica campestris* nachweisen, dass DMSO toxische Effekte auf Protoplasten ausübte. Sie verwendeten verschiedene DMSO-Konzentrationen von 3 %, 6 % und 10 % bei einer schwachen PEG-Lösung mit hohem pH-Wert. Sie beobachteten, dass sich die Vitalität der Protoplasten durch die Erhöhung der DMSO-Konzentration in der PEG-Lösung verschlechterte.

KADISH UND WENS (1983) berichteten, dass PEG durch Licht, hohe Temperatur oder mit der Zeit oxidierte und dadurch hohe Karbonyl-Konzentrationen enthielt, die für die Vitalität der Protoplasten toxisch waren. Die Autoren schlugen vor, für die Protoplastenfusion karbonylarmes PEG zu verwenden oder den Karbonylgehalt durch Destillation des PEG mit karbonylfreiem Ethanol zu reduzieren. Zur Beseitigung von PEG aus der Protoplastenkultur nach der Fusion empfahlen OLIVARES-FUSTER ET AL. (2005), die Fusionsprodukte zwei- bis dreimal zu waschen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die toxischen Effekte von PEG auf die Protoplasten besteht darin, dass die Induzierung der Dehydrierung durch PEG während der Protoplastenfusion die Fähigkeit der Zellmembranen zum neuen Aufbau der Poren nach der Fusion beeinträchtigt (HAHN-HÄGERDAL ET AL. 1986; CHAND ET AL. 1998). In einem Vergleichstest bei Protoplasten aus *Musa* beobachteten ASSANI ET AL. (2005), dass die Zellteilungsfrequenzen nach der elektrischen Fusion 35 %, nach PEG-Behandlung jedoch 24 % betragen (ASSANI ET AL. 2005). MERCER UND SCHLEGEL (1979) und ASSANI ET AL. (2005) vertraten die Auffassung, dass PEG zur Störung der mitotischen Aktivität führte und dadurch toxische Wirkungen auf Protoplasten ausübte. Dies kann erklären, dass in einigen Fällen, z.B. bei der Zuckerrübe (GÜREL ET AL. 2002), die Protoplasten nach der Fusion durch PEG abstarben.

Hohe pH-Werte schädigten die Vitalität der Protoplasten. In einem Versuch wurden Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens* (S3) mit zwei

verschiedenen pH-Werten (5,6 und 9,5) fusioniert und die Vitalität der Protoplasten nach der Fusion miteinander verglichen (s. 5.3.2.1, Abb. 5.1). Die mittels FDA-Färbung bestimmte Vitalität der Protoplasten verschlechterte sich bei Erhöhung des pH-Wertes von 5,6 auf 9,5 für 10 min. um 15 %. In mehreren unabhängigen Versuchen wurden die Protoplasten durch hohe pH-Werte geschädigt; besonders die Anzahl geplatzter bzw. verloreener Protoplasten stieg an (s. 5.3.1.2 und 5.3.1.3). KELLER UND MELCHERS (1973) stellten bei Protoplasten von Tabak fest, dass die Protoplasten bei einem pH-Wert über 11 nach 30 min. Schaden nahmen. Bei einer Untersuchung wurden Elektrofusion und Protoplastenfusion durch PEG bei *Pisum sativum* angewendet und die Vitalität der Protoplasten nach der Fusion verglichen (DE FILIPPIS ET AL. 2000). Die Autoren stellten fest, dass die Vitalität der Protoplasten bei einem pH-Wert von 8 nach 20 min. abnahm.

Um negative Effekte der Fusion auf die Vitalität der Protoplasten soweit wie möglich zu vermeiden, wurden die Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens* (S3) vor der Fusion in einer Lösung aus Glukose,  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  suspendiert und mit Hilfe einer PEG-Lösung, die ebenfalls diese Zusätze enthielt, fusioniert. Als Nachbehandlungsmittel wurde das Medium BNE9 mit einem pH-Wert von 9,5 verwendet.

Die prozentuale Einschätzung der Vitalität mittels FDA nach Reinigung der Protoplasten aus zwei Wiederholungen zeigte, dass die Vitalität der Protoplasten durch Anreicherung der Protoplasten vor, während und nach der PEG-Behandlung um acht bis 13 % verbessert wurde (Abb. 5.4). Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von KAO UND MICHAYLUK (1974) überein, die beobachteten, dass die Protoplasten aus Blättern von Erbsen manchmal nach der PEG-Behandlung abstarben; durch die Anreicherung war die Vitalität der Protoplasten nach der PEG-Behandlung jedoch genauso gut wie bei der Kontrolle.

Die positive Wirkung der Anreicherung der Protoplasten auf die Vitalität der fusionierten Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens* führte bei den Protoplasten nach der Fusion zu Zellteilung und Mikrokallusbildung (s. 5.3.1.4).

Obwohl ein hoher pH-Wert in den PEG- und Nachbehandlungslösungen die Vitalität der Protoplasten herabsetzte, wurde die Fusion der Protoplasten durch den hohen pH-Wert gefördert. Bei einem pH-Wert von 5,6 in den PEG- und Nachbehandlungslösungen steigerte sich der Anteil zweikerniger Protoplasten während der Fusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens* um bis zu 9,5 % im Vergleich zur Kontrolle mit einem pH-Wert zu 5,6. Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes auf bis zu 9,5 bei der Nachbehandlungslösung stieg die Anzahl der zweikernigen Protoplasten um weitere 6,2 % an (Abb. 5.1). Durch mehrere unabhängige Versuche wurde deutlich, dass bei pH-Werten

zwischen 5,6 und 5,8 in den PEG-Lösungen Protoplasten miteinander fusionierten (s. 5.3.1, 5.3.2, Abbildungen 5.1, 5.7, 5.10). Diese Ergebnisse stimmten mit der Beobachtung von KADISH UND WENS (1983) überein, die Fusion und Erzeugung von somatischen Hybriden bei einem pH-Wert von 5,8 erreichten. Meistens wurden für die Zugabe der Nachbehandlungslösung bei Protoplastenfusionen jedoch hohe pH-Werte zwischen 9 und 10,5 verwendet (BHOJWANI UND RAZDAN 1996). KELLER UND MELCHERS (1973) beobachteten bei der Protoplastenfusion von Tabaksorten, dass die Protoplasten bei pH-Werten zwischen 8,5 und 9 geringe Aggregation und Fusionraten zeigten, diese aber durch Erhöhung des pH-Wertes auf 9,5 bis 10,5 wesentlich zunahmen. Ab einem pH-Wert von über 11 wurden die Protoplasten nach 30 min geschädigt. Sie vermuteten, dass intramembrane Lysophospholipide wie Lysolecithin und Lysophosphatidylethanolamine unter hohem pH-Wert umgeordnet wurden und die Fusion durch intramembranes Lysolecithin induziert wurde, da bei Tierzellen die Induktion der Fusion durch Lysolecithin festgestellt worden war.

Der pH-Wert des PEG hängt von seiner Polymerisation ab und liegt zwischen 4,6 und 6,8 (MEYER 1952). Weil PEG keine puffernden Wirkungen hat, sank der pH-Wert nach dem Autoklavieren ab und blieb dann unter 5,6. In einem Vergleichstest wurden die Fusionsverfahren (s. 5.2.3.2) in Hinblick auf die Änderungen der pH-Werte untersucht. Durch Messung der pH-Werte bei jedem Fusionsschritt wurde festgestellt, dass der pH-Wert der Fusionslösung nach dem Autoklavieren und auch nach Zugabe der Suspensionslösung PS1, die einen pH-Wert von 5,6 hatte, kaum auf 5,6 anstieg (Tab. 5.7). Nur durch die Zugabe von HEPES-Puffer könnte eine Stabilität des pH-Wertes in der PEG-Lösung erreicht werden (Tab. 5.8). Da HEPES negative Wirkungen auf die Protoplasten hinterlässt, sollte die geringste wirksame Menge verwendet werden. Bei 100 mM HEPES wurde der pH-Wert stabilisiert, bei 50 mM HEPES wurden leichte Schwankungen beobachtet: Wenn der pH-Wert vor dem Autoklavieren auf 6 eingerichtet wurde, lag er nach dem Autoklavieren zwischen 5,7 und 5,9, was für die Fusion der Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten geeignet war (s. 5.3.1.1, Tab. 5.8). Bereits KAO UND MICHAYLUK (1974) berichteten vom positiven Einfluss von 50 mM HEPES auf die Stabilität des pH-Wertes bzw. auf die Protoplastenfusion. DE FILIPPIS ET AL. (2000) erreichten die Stabilität des pH-Wertes in der PEG-Lösung mit der Zugabe von 75 mM HEPES.

PEG-Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 induzieren Adhäsion und Fusion zwischen den Protoplasten. In der Regel wurde zur Protoplastenfusion PEG mit Molekulargewichten zwischen 1500 und 6000 bei Konzentrationen zwischen 15 und 45 % verwendet (BHOJWANI UND RAZDAN 1996). Bei den vorliegenden Untersuchungen der

Fusionsergebnisse zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus* durch verschiedene Protokolle wurde beobachtet, dass nach der Zugabe der Protoplastensuspensionen auf die PEG-Lösung Aggregate von Protoplasten auftraten. Die Aggregation der Protoplasten hing von der PEG-Konzentration auf der einen und dem Molekulargewicht des PEG auf der anderen Seite ab. Je höher die Konzentration von PEG war, desto mehr nahm die Aggregation der Protoplasten zu. Gleichzeitig reduzierte sich die Anzahl die Aggregate aus zwei Protoplasten bei Konzentrationen von 40 % und 50 %, trotz Erhöhung der Aggregation (Tab. 5.11). Bei einer Konzentration von 30 % PEG 6000 wurde die höchste Aggregation der Protoplasten aus zwei Zellen beobachtet (Abb. 5.7). Nach der Aggregation sanken die Protoplasten allmählich an die Böden der Petrischalen oder Röhrchen ab. Mit der Zugabe der Verdünnungslösung wurde die Aggregation beendet, und in den Lösungen waren, besonders bei den Protokollen P4 und P5, viele geplatze Protoplasten zu erkennen.

KAO UND MICHAYLUK (1974) stellten während ihrer Experimente mit PEG und verschiedenen Molekulargewichten fest, dass PEG mit einem Molekulargewicht von 6000 am effektivsten war.

PEG kann bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und hohem pH-Wert Fusionen zwischen den Protoplasten induzieren (BHOJWANI UND RAZDAN 1996). Bei der Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia ionantha* (U08) und *Streptocarpus caulescens* nach P1 (s. 5.3.1) wurden durch PEG-Behandlung Aggregationen beobachtet, wobei die Begrenzungen zwischen den Zellen oft vor der Zugabe der Nachbehandlungslösung und damit vor der Erhöhung der Kalzium-Konzentration und des pH-Wertes erkennbar blieben (Abb. 5.7, P1). Diese Betrachtung stimmt mit den Experimenten von NAUMANN (1994) überein, die bei Protoplastenfusionen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Begrenzungen zwischen den Zellen während der PEG-Behandlung erfasste. Bei Fusionen nach Protokoll P6 wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch bei der PEG-Behandlung teilweise sowohl Aggregationen als auch Fusionen beobachtet (Abb. 5.7, P6); nach Zugabe des Mediums 8pm7 mit hohem pH-Wert als Nachbehandlungslösung stieg die Anzahl der Fusionen. Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor von KAO UND MICHAYLUK (1974) dokumentiert, die während der PEG-Behandlung einige Protoplastenfusionen zwischen *Vicia hajanstana* und *Pisum* festgestellt hatten. Sie berichteten, dass nach der Zugabe des Kulturmediums mit hohem pH-Wert mehr Fusionen beobachtet wurden.

Neben dem pH-Wert berichten mehrere Autoren von positiven Auswirkungen von Kalzium-Ionen auf Aggregation und Protoplastenfusion. Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Suspensionslösung PS1 und die PEG-Lösung mit 3,5 mM bzw. 8 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

angereichert.

KAO UND MICHAYLUK (1974) fusionierten Protoplasten von *Pisum* (p) und *Vicia* (q) mit zwei PEG-Lösungen mit und ohne  $\text{Ca}^{+2}$ . Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Adhäsion zwischen ungleichartigen Protoplasten bei der PEG-Lösung mit  $\text{Ca}^{+2}$  mit 331:475:185 höher war, als nach der Formel  $p^2:2pq:q^2$  erwartet wurde.

KELLER UND MELCHERS (1973) testeten bei Protoplastenfusionen zwischen Tabaksorten verschiedene Kalziumkonzentrationen in den PEG-Lösungen. Sie berichteten, dass bei niedriger Konzentration von  $\text{CaCl}_2$  nur sehr geringe Aggregation stattfand; bei Erhöhung der Kalziumchloridkonzentration nahmen Aggregation und Fusion der Protoplasten zu.

GRIMES UND WEDY (1985) behandelten bei einem Vergleichstest embryogene und nicht embryogene Zellen aus *Daucus carota* mit verschiedenen Kalziumkonzentrationen und maßen die  $\text{Ca}^{+2}$ -Aufnahme der Zellen. Sie stellten fest, dass die Protoplasten unterschiedliche intrazelluläre  $\text{Ca}^{+2}$ -Gehalte aufgebaut hatten und die Protoplasten mit niedrigeren interzellulären Kalziumkonzentrationen ein geringeres Potential zur Fusion aufwiesen.

Durch den Vergleich der verschiedenen Protokolle (s. 5.3.1) wurde festgestellt, dass PEG eine verstärkte Adhäsion der Protoplasten bewirkte und die Aggregation zwischen den Protoplasten mit Erhöhung der PEG-Konzentration anstieg. Jedoch war der Anteil von Aggregaten aus zwei Protoplasten, die für die Protoplastenfusion erwünscht waren, bei 30%igen PEG-Lösungen am höchsten (s. Tab. 5.9, Abb. 5.11).

Die Aggregatbildung durch PEG ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die beiden Seiten der PEG-Moleküle leicht negativ geladen sind und an Wasser, Eiweiß und Kohlenhydrate durch deren positiv geladene Seiten in Form von Wasserstoffbrückenbindungen gebunden werden können. Im Gegensatz zu tierischen Zellen beruht die Oberflächenladung von Pflanzenprotoplasten jedoch nicht auf Sialinsäureresten, sondern wird durch Phosphatgruppen bedingt, und beträgt je nach Art zwischen -10 und -30 mV (BHOJWANI UND RAZDAN 1996). Aus diesem Grund stoßen sich die Protoplasten in der Suspension normalerweise gegenseitig ab. Durch Kalzium-Ionen und höhere pH-Werte werden die Oberflächen der Protoplasten neutralisiert und können sich einander nähern (MELCHERS 1977). Wenn die PEG-Moleküle lang genug sind, können sich zwischen den Oberflächen von Protoplasten, die einander nah sind (weniger als 10 Å), Molekülbrücken bilden, was zur Adhäsion der Protoplasten führt (KAO UND MICHAYLUK 1974; ZIMMERMANN UND SCHEURICH 1981). Wenn die Konzentration von PEG niedrig ist, findet keine Adhäsion statt, möglicherweise weil die Zucker in der PEG-Lösung oder in der Suspension mit den Protoplasten um die Bindung an die negative Seite der PEG-Moleküle konkurrieren.

In der vorliegenden Untersuchung fanden durch die PEG-Behandlung teilweise Fusionen zwischen den Protoplasten von *Saintpaulia* und *Streptocarpus* statt. Besonders wenn die PEG-Lösung einen pH-Wert von 5,6 oder mehr hatte (P6), blieben bei einigen Aggregaten keine Begrenzungen zwischen den Zellen erkennbar (Abb. 5.7). Der tatsächliche Mechanismus von PEG bei der Fusionsinduzierung ist nicht klar (BHOJWANI UND RAZDAN 1996). KAO UND WETTER (1977) vermuten, dass sich PEG auch an Kationen wie  $\text{Ca}^{+2}$  binden kann, indem die Kalzium-Ionen Brücken zwischen negativ geladenen Eiweißmolekülen und PEG bauen. Möglicherweise lösen sich die PEG-Moleküle durch Verdünnung und Reinigung von den Oberflächen der Protoplasten, an die sie direkt oder durch  $\text{Ca}^{+2}$  gebunden sind, was zu einer Störung der elektrischen Ladungen führt. Wenn die Protoplasten durch eine breite Oberfläche miteinander in Kontakt sind, können sich möglicherweise manche Protoplasten mit positiver Ladung an Protoplasten mit negativer Ladung binden, was zur Protoplastenfusion führt.

Biomembranen dienen als Trennungsschicht zwischen den Zellen oder zwischen verschiedenen Bereichen innerhalb einer Zelle. Sie sind Strukturen aus Lipiden (Doppelschicht) und Proteinen, die durch nichtkovalente Bindungen zu einer dünnen Schicht verbunden werden. In einer Membran schwankt das Verhältnis von Lipid zu Protein je nach Typ der Zellmembran (Plasmamembran, endoplasmatisches Retikulum oder Golgi-Apparat), der Art des Organismus (Bakterie, Pflanze oder Tier) oder des Zelltyps (Muskel oder Leber). Membrane enthalten auch Kohlehydrate, die an Lipiden oder Proteinen hängen (KARP 2005). Das Flüssigmosaikmodell für Membrane nach SINGER UND NICOLSON (1974) stellt Struktur und Anordnung der Membranproteine als ein Mosaik aus einzelnen Partikeln dar, die sich durch die Membranschicht ziehen (JAUSSI 2005). Zellmembrane werden im Flüssigmosaikmodell als dynamische Strukturen angesehen, deren Elemente sich bewegen und zusammenfinden können (KARP 2005), was die Stabilität der Membrane sichert. Die Plasmamembran umhüllt die gesamte Zelle.

Der Wiederaufbau der Membran nach der Fusion ist ein komplizierter physikalischer und chemischer Prozess, der durch mehrere Faktoren wie pH-Wert, Konzentration von Ionen, osmotischer Druck in der Lösung, Temperatur, Typ der Zellmembran, Art des Organismus und Wechselwirkungen zwischen diesen Faktoren gesteuert wird. Bei der Elektrofusion beeinflussen zusätzlich das externe elektrische Feld und die Pulsdauer für die Fusion den Wiederaufbau der Plasmamembran. Durch mehrere Untersuchungen wurde der Wiederaufbau der Membrane nach der Fusion teilweise erforscht.

Während der Protoplastenfusion durch PEG oder der Elektrofusion werden in den Membranen Poren gebildet, die einen Austausch von Ionen und Molekülen ermöglichen. Bei der Elektrofusion werden Poren nur an der Kontaktfläche der Protoplasten gebildet, aber PEG induziert Poren zufällig an der gesamten Oberfläche der Membrane (DE FILIPPIS ET AL. 2000). Die meisten dieser metastabilen Poren schließen sich schnell zu, aber einige können mehrere Stunden nach der Fusion überdauern und ermöglichen den Austausch und das Eindringen flüssiger Stoffe (GLASER UND DONATH 1988; KELL UND GLASER 1993). Bei der Protoplastenfusion zwischen *Nicotiana tabacum* und *Avena sativa* dauerte die Verschließung der Poren ca. 100-120 $\mu$ s (WERNER ET AL. 1990).

Bei einer Untersuchung wurde der Einfluss des elektrischen Feldes auf die Membranen von menschlichen Blutkörperchen nach Vorbehandlungen mit Lösungen mit verschiedenen Ionenkonzentrationen getestet (SERPERSU ET AL. 1985). Die Autoren stellten fest, dass eine Verschließung der Poren der Membrane nur in einem Medium mit balanciertem osmotischem Druck möglich war, und bei niedrigerer Temperatur dieser Prozess sehr langsam stattfand. Sie beobachteten, dass die Porengröße durch verschiedene Faktoren wie Pulsdauer und Ionenkonzentration des Suspensionsmediums beeinflusst wurde.

Die Induktion von Poren in den Membranen durch ein elektrisches Feld oder durch PEG-Behandlung während der Fusion ist mit den Änderungen der Leitungsfähigkeit und der Diffusionsfähigkeit der Membranen verbunden, die die ionischen Transportmechanismen beeinträchtigen. Daher werden durch die Zugabe einer Lösung mit hoher  $\text{Ca}^{+2}$ -Konzentration sowohl die Fusion als auch weitere Prozesse zum Wiederaufbau der Membrane unterstützt (ZOREC UND TESTER 1992; HOMANN 1998; DE FILIPPIS ET AL. 2000).

PEG-Lösungen mit hoher Osmolarität und elektrische Felder erzeugen inneren Stress bei den Protoplasten, indem sie Wasser zwischen den Lipiddoppelschichten der Membrane entfernen (KANCHANAPOOM UND BOSS 1986).

GORDON-KAMM UND STEPONKUS (1984) untersuchten den Einfluss der Osmolarität auf die Plasmamembran von Protoplasten aus Roggen. Sie beobachteten, dass die Oberfläche der Protoplasten bei einer Osmolarität von 1 Osmol / kg  $\text{H}_2\text{O}$  in der Lösung glatt war; bei Zunahme des osmotischen Drucks auf 2,5 Osmol / kg  $\text{H}_2\text{O}$  wurden jedoch zahlreiche Beulen auf den Plasmamembranen gesichtet.

TAKEBE ET AL. (1973) beobachteten auf der Oberfläche von Membranen von Tabak-Protoplasten einige Vesikel (Bläschen), die sie „osmiophilic bodies“ nannten. Vermutlich handelte es sich dabei um abgerissene Bereiche der Lipid-Protein-Matrix von Plasmamembranen, die während des Wiederaufbaus der Membranen durch die

Wiederanordnung von Lipiden und Proteinen auftraten (WEBB UND WILLIAMS, 1984).

Durch den Fusionsprozess wurde Deformation bzw. Vesikelbildung bei den benachbarten Biomembranen auch in den Protoplasten (endoplasmatisches Retikulum oder Golgi-Apparate) beobachtet (HAHN-HÄRGEDAL ET AL. 1986; GORDON-KAMM UND STEPONKUS 1984).

Der Prozess, der zur Vesikelbildung führt, ist noch nicht geklärt (ZOREC UND TESTER 1992), aber weil sich diese Vesikel besonders an der Kontaktfläche der Membran von Protoplasten bilden, wird vermutet, dass auch sie durch die Wiederordnung der Plasmamembran auftreten (VIENKEN ET AL. 1983; SUGAR ET AL. 1987; KELL UND GLASER 1993). Nach der Fusion wurden die Bestandteile der Membran durch die oben genannten Verfahren wieder rekombiniert.

FRYE UND EDIDIN (1970) fusionierten Mäuse- und Menschenzellen. Sie präparierten Antikörper gegen Mäuse- und Menschenproteintypen und verknüpften sie kovalent mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen (fluorescein-labelled goat anti-mouse IgG und tetramethyl-rhodamine-labelled goat anti-rabbit IgG(Fc)), so dass unter dem Fluoreszenzmikroskop die Mäuseproteine grün und die Menschenproteine rot fluoreszierten. Sie verfolgten die Bewegungen spezieller Proteine in der Plasmamembran, nachdem beide Membrane vereinigt waren. Sie beobachteten, dass die Plasmamembran zum Zeitpunkt der Fusion halb vom Mensch und halb von der Maus abstammte schien. Die beiden Proteintypen befanden sich noch in ihrer jeweiligen Hälfte. Mit zunehmender Zeit nach der Fusion wanderten die Membranproteine durch Seitwärtsbewegungen in der Membran in die jeweils andere Hälfte. Nach etwa 40 min. waren die Proteine beider Arten gleichmäßig über die gesamte Membran der Hybridzelle verteilt. Als man das Experiment mit niedrigerer Temperatur wiederholte, nahm die Viskosität der Lipiddoppelschicht zu, und die Mobilität der Membranproteine sank.

Beim Vergleich zwischen den Protokollen wurde festgestellt, dass sich die Lebensfähigkeit der Protoplasten trotz der Erhöhung der Fusionsraten durch PEG in Konzentrationen von 40 % und 50 % (Abb. 5.8), von 75 % bei Kontrolle auf 25 % bzw. 23 % reduzierte und die Protoplasten deformierten, während bei P6 mit 30%igem PEG eine geringere Reduzierung der Vitalität auf 65 % erfolgte. Durch die PEG-Behandlung bei Protokoll P6 wurden die geringste Schädigung der Lebensfähigkeit der Protoplasten und eine Erhöhung des Anteils fusionierter Protoplasten auf 13 % erreicht (Tab. 5.12). Fusionen wurden durch die Kernanzahleinschätzung der Protoplasten mittels Ethidiumbromid oder DAPI bestimmt (Abb. 5.9). Ethidiumbromid lagert sich zwischen den Basen von Nukleinsäuren ein, und DAPI lagert sich bevorzugt an Adenosintriphosphat. Dadurch kann die Fluoreszenz von angefärbter

Nukleinsäure unter ultravioletten Licht verstärkt und sichtbar werden. Wegen der hohen Toxizität von Ethidiumbromid hat die Anwendung von DAPI Priorität.

Jedoch konnten durch Ethidiumbromid nicht die Unterschiede zwischen hetero- und homofusionierten Protoplasten gezeigt werden, weil die Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus* keine visuell erkennbaren Unterschiede aufwiesen.

Durch die Auswaschung der Protoplasten nach der Fusion mit und ohne Zentrifugieren bei 40 g mittels Pufferlösung 1 wurde festgestellt, dass zwischen 13,9 % und 17,3 % der intakten Protoplasten während des Zentrifugierens verloren gingen (Tab. 5.10). Ein negativer Einfluss des Zentrifugierens auf die Vitalität der Protoplasten konnte jedoch nicht bestimmt werden. Im Gegenteil, bei der ersten Wiederholung des Fusionsversuches zwischen zwei *Streptocarpus*-Arten wurde kein deutlicher Unterschied zwischen zentrifugierten und nicht zentrifugierten Protoplasten in Bezug auf die Vitalität beobachtet; bei der zweiten Wiederholung zeigten die zentrifugierten Protoplasten eine um 8 % höhere Vitalität (Abb. 5.3). Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Ergebnisse liegt darin, dass während des Zentrifugierens möglicherweise mehr nicht vitale Protoplasten ausgewaschen wurden, so dass sich die Relation von vitalen zu nicht vitalen Protoplasten in der Endsuspension in Richtung der lebensfähigen Protoplasten verschob.

Im Vergleich zu den zentrifugierten Proben starben die Protoplasten in nicht zentrifugierten Ansätzen schneller ab und verbräunten nach zwei bis drei Tagen.

Neben der Vitalität war die Reinigung der Protoplasten von Bruchstücken, die durch Floatierungsbehandlung mit Saccharoselösung erreicht wurde, ein zweiter entscheidender Einflussfaktor auf die Zellteilung und die weitere Entwicklung der Protoplasten.

Aus mehreren unabhängigen Versuchen wurden nur bei einem Versuch durch einfache Auswaschung von fusionierten Protoplasten drei Kallusse gewonnen (s. 5.3.1.4).

Während der Fusionen wurden nach der PEG-Behandlung und auch nach der Erhöhung des pH-Wertes zahlreiche Protoplasten deformiert oder platzten; ihr Anteil wurde bei den verschiedenen Versuchen auf 28,5 %, 30 % und 38,7 % (s. 5.3.1.5 und Tab. 5.10) geschätzt.

DE FILIPPIS ET AL. (2000) stellten fest, dass 50 % der Protoplasten von *Pisum sativum* nach der Fusion mit PEG verloren gingen.

Ein großer Teil der zerstörten Protoplasten verblieb trotz Auswaschung mit der Pufferlösung in Form von kleinen Partikeln aus Chloroplasten und anderen Bestandteilen der Zellen in den Fusionsprodukten und auch nach der Kultur der Protoplasten in den Alginatfilmen. Wahrscheinlich wurden durch diese Bestandteile zerbrochener Zellen sekundäre Stoffe wie Phenole oder Ethylen produziert, die Zellteilungen und weitere Entwicklungen der

Protoplasten verhinderten. Von negativen Wirkungen der Bestandteile geplatzter und abgestorbener Protoplasten auf die kultivierten Protoplasten berichteten mehrere Autoren: *Pisum sativum* (KAO UND MICHAYLUK 1974), *Beta vulgaris* (GÜREL ET AL. 2002). Die geringe Vitalität bei *Lycopersicon pennellii* führte zur Produktion von toxischen Stoffen wie Ethylen und verursachte eine Erhöhung der Osmolarität im Medium, was möglicherweise Zellteilungen verhinderte (RETHMEIER ET AL. 1990).

Die Reinigung der Fusionsprodukte durch Floatierung in 20%iger Saccharoselösung ermöglichte das Beseitigen der deformierten Zellbestandteile und Partikel aus geplatzten Protoplasten sowie das Sammeln der intakten Protoplasten an der Interphase des Saccharose-Fusionslösungsgemisches und der übergeschichteten Waschlösung, während Zellbruchstücke pelletierten. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit für die Isolierung und Reinigung der Protoplasten bei *Saintpaulia ionantha* (WINKELMANN 1994) und für *Streptocarpus*-Arten verwendet.

Durch einen Vergleich zwischen den Versuchen 5.3.1.3 und 5.3.1.5 wurde festgestellt, dass die Reinigung der Fusionsprodukte durch 20%ige Saccharoselösung im Vergleich zur direkten Sedimentation der Fusionsprodukte in der Pufferlösung mehrere Vorteile hatte.

Durch die Reinigung der Fusionsprodukte mittels Pufferlösung ging eine ähnliche Anzahl von Protoplasten während der Auswaschung verloren (s. 5.3.1.5 und Tab. 5.10). Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass die Vitalität der verbliebenen Protoplasten durch die Reinigung mittels 20%iger Saccharose im Vergleich zur Vitalität der Protoplasten nach der Fusion um 6 % höher war. Dies kann durch die Beseitigung von nicht vitalen und geplatzten Protoplasten aus den Fusionsansätzen bei der Anwendung von 20%iger Saccharoselösung erklärt werden.

Der Anteil zweikerniger Protoplasten stieg nach der Reinigung auf 36 %, der Anteil mehrkerniger Protoplasten auf 29 % (Abb. 5.6). Dies bestätigt die positive Wirkung der Behandlung mit 20%iger Saccharoselösung nach der Fusion. Möglicherweise fusionierten Protoplasten während des Reinigens und Zentrifugierens. Einige Autoren vertreten die Auffassung, dass auch die Änderung der Osmolarität während der Reinigung eine Ursache für mehr Fusionen sein könnte (KAO UND MICHAYLUK 1974; ZIMMERMANN UND SCHEURLICH 1981).

Nach mehreren Versuchen wurde durch Optimierung des Protokolls P1 das Protokoll P6 entwickelt und für Fusionen der Protoplasten von *Saintpaulia* und *Streptocarpus* verwendet.

Die meisten Autoren führten Protoplastenfusionen in Petrischalen durch. Einige Autoren verwendeten jedoch Glasröhrchen: HARMS UND POTRYKUS (1978a, b) bei Getreide, MOTTLEY ET AL. (1996) bei Rosen, GÜREL ET AL. (2002) bei Zuckerrüben. Bei dem Protokoll P6 wurden

die Fusionen in Glasröhrchen durchgeführt, was im Vergleich zu Petrischalen große Vorteile hatte. Durch die Durchführung von Protoplastenfusionen in Glasröhrchen wurde das Problem, dass Protoplasten nach Beendigung der Fusionen an den Böden der Petrischalen hafteten, was zum Verlust von Teilen der Protoplasten führte, beseitigt. Der wichtigste Vorteil bestand in der Möglichkeit, bei der Nachbehandlung den pH-Wert in der Suspension von PEG und Protoplasten allmählich und langsam zu erhöhen. BHOJWANI UND RAZDAN (1996) schlugen vor, die Verdünnung von PEG allmählich durchzuführen, da eine drastische Elution zu weniger Heterofusionen und weniger intakten Protoplasten im Endprodukt führte.

NAUMANN (1994) vermutete, dass das Aufbrechen der Protoplasten bei der Protoplastenfusion zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Episcia spec.* nach Zugabe der Nachbehandlungslösung auf den starken Anstieg des pH-Werts zurückzuführen sein konnte, den die Protoplasten möglicherweise nicht vertrugen.

Bei Fusionen zwischen zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten und fünf *Streptocarpus*-Arten durch Protokoll P6 wurden bei fünf Kombinationen Zellteilungen beobachtet. Bei vier dieser Kombinationen fanden Entwicklungen bis zum Kallusstadium statt (Tabelle 5.13). Durch Fusionen innerhalb von *Streptocarpus*-Arten mit den gleichen Methoden wurden bei sechs von neun Kombinationen Zellteilungen und Kallusbildungen beobachtet (Tab. 5.15).

Durch mehrere unabhängige Versuche wurde die Anwendung elektrischer Protoplastenfusionen untersucht (s. 5.3.5 und 5.3.6).

Im Vergleich zur chemischen Protoplastenfusion wurde die Vitalität der Protoplasten bei der Elektrofusion weniger beeinträchtigt. Während sich die Lebensfähigkeit der Protoplasten durch Fusion mit 30%igem PEG beispielsweise um ca. 30 bis 40 % reduzierte (Abb. 5.4, 5.5, 5.8), lagen die Schäden für die Vitalität der Protoplasten bei optimierter Elektrofusion (Variante d) bei 5 bis 10 % (Abb. 5.27, 5.28). Die erhöhte Vitalität zeigte sich auch bei der Zellteilung der Protoplasten. Nach der Elektrofusion der Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* (U08) und *Streptocarpus caulescens* (S3) wurden Teilungsfrequenzen von 26 % erreicht. Im Vergleich dazu führte die chemische Fusion bei den gleichen Arten im höchsten Fall zu 6 % Teilungsfrequenz. Die Vorteile der elektrischen Fusion im Vergleich zur chemischen Fusion (PEG) in Bezug auf die Vitalität der Protoplasten wurden von mehreren Autoren dokumentiert. DE FILIPPIS ET AL. (2000) hatten in einem Vergleichstest die Protoplasten von *Pisum sativum* durch chemische und elektrische Verfahren fusioniert. Sie stellten fest, dass die Vitalität der Protoplasten durch chemische Fusion um mehr als 60 %

sank, während die Beeinträchtigung durch Elektrofusion nur zwischen 9 % und 20 % betrug. Auch ASSANI ET AL. (2005) berichteten, dass die Protoplasten von *Musa spp.* nach der Elektrofusion im Vergleich zur chemischen Fusion aufgrund besserer Vitalität höhere Teilungsfrequenzen aufwiesen.

Die höheren Zellteilungsraten durch Elektrofusion im Vergleich zur Protoplastenfusion durch PEG können nicht nur durch die toxische Wirkung von PEG oder den negativen Einfluss des pH-Wertes auf die Protoplasten erklärt werden. Eine mögliche weitere Erklärung für die höheren Zellteilungsraten bei Elektrofusion kann die Stimulierung der Zellteilungen durch hohe Pulse sein, die von mehreren Autoren dokumentiert wurde: *Medicago sativa* (DIJAK ET AL. 1986), *Trifolium subterraneum* (ZHONGYI ET AL. 1990), *Nicotiana tabacum* und *Avena sativa* (WERNER ET AL. 1990), Erbsen (DE FILIPPIS ET AL. 2000) *Citrus* (OLIVARES-FUSTER ET AL. 2005), Banane (ASSANI ET AL. 2005)

ASSANI ET AL. (2005) und DUTTA UND IBARAKI (2006) waren davon überzeugt, dass elektrische Felder die Bildung von somatischer Embryogenese bei Protoplasten von Bananen stimulierte.

Obwohl die Protoplasten bei den elektrischen Fusionen nicht durch toxische Auswirkungen durch PEG oder die Erhöhung des pH-Wertes während der Fusionen beeinträchtigt wurden, war die Anzahl der deformierten oder geplatzten Protoplasten meistens genauso hoch oder sogar höher als bei chemischen Fusionen (s. 5.3.1.5, Tab. 5.10 und Abb. 5.27, 5.28). Bei zwei Pulsen platzte ein Großteil der Protoplasten, so dass nach der Behandlung kaum intakte Protoplasten in der Suspension übrig blieben. Auch bei Anwendung von nur einem Puls ab 1250 V war der Anteil geplatzter Protoplasten sehr hoch (Abb. 5.27). OLIVARES-FUSTER ET AL. (2005) stellten bei elektrochemischen Fusionen zwischen *Citrus*-Arten durch statistische Verfahren eine negative Korrelation zwischen der Bildung von Heterofusionen und der Vitalität der Protoplasten bei höherer Spannung fest.

Beim Vergleich zwischen chemischer und elektrischer Protoplastenfusion in der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass der Anteil geplatzter Protoplasten bei der Elektrofusion fast zweimal höher als der Verlust von Protoplasten durch chemische Fusion war (s. 5.3.1.5 und 5.3.6). Diese Ergebnisse konnten nicht mit den Literaturangaben verglichen werden, weil solche Berichte nicht vorlagen.

Das beste getestete Protokoll für die Fusion zwischen den Protoplasten von *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens* wurde bei einer Hochfrequenzstärke von 70 V für 6 Sekunden, der ein Puls von 750 V für 20 Mikrosekunden folgte, ermittelt. Danach zeigten die Protoplasten eine Zellteilungsfrequenz von 26 % und entwickelten sich bis zu

Mikrokallussen.

Durch Elektrofusion konnten die Protoplasten von mehreren Arten erfolgreich fusioniert werden. Da bei der Elektrofusion verschiedene Faktoren wie Durchmesser der Protoplasten, Fusionslösung, Hochfrequenzdauer, Hochfrequenzstärke, Spannungspulsdauer, Spannungshöhe und Anzahl der Pulse beteiligt sind, die miteinander Wechselwirkungen haben und die Endprodukte der Fusionen beeinflussen, sind Vergleiche zwischen den Ergebnissen verschiedener Autoren mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schwierig. Insbesondere ist darauf hinzuweisen, dass die Fusionen bei der vorliegenden Arbeit in einer Kammer mit einem High-Voltage-Cell-Processor (Science Products Trading GmbH) durchgeführt wurden und die Schritte der Protoplastenfusion unter dem Mikroskop nicht beobachtet werden konnten. Außerdem konnte die Hochfrequenzstärke nicht unter 70 V und die Spannungspulsdauer nicht unter 10 Mikrosekunden eingestellt sowie die Zeit zwischen den Pulsen nicht gesteuert werden. Möglicherweise platzten die Protoplasten bei zwei Pulsen, weil die Dauer für die Aufladung der Spannung für den zweiten Puls zu lang war und die Protoplasten nach dem ersten Puls nicht mehr in Ketten angeordnet waren.

Tabelle 5.18 stellt beispielhaft erfolgreiche Elektrofusionen einiger Autoren dar. Aus ihr geht hervor, dass die Hochfrequenzstärke zwischen 20 Volt bei *Rudbeckia* (AL-ATABEE ET AL. 1990) und 1500 Volt bei *Lathyrus* (OCHATT ET AL. 2001) und die DC-Spannungshöhe zwischen 15 Volt bei *Vicia* (ZIMMERMANN UND SCHEURLICH 1981) und 1500 Volt bei *Citrus* (OLIVARES-FUSTER ET AL. 2005) variierte. Die Hochfrequenzdauer lag zwischen 5 Sec. bei *Vicia* (ZIMMERMANN UND SCHEURLICH 1981) und 120 Sec. bei *Pisum* (DE FILIPPIS ET AL. 2000), und es wurden Spannungspulsdauern von 1  $\mu$ s. für *Passiflora* (OTONI ET AL. 1995) bis 100  $\mu$ s für Protoplastenfusionen bei Bananen (KAZUMITSU ET AL. 2002) verwendet.

Die meisten Autoren zeigen sich davon überzeugt, dass durch Elektrofusion im Vergleich zur chemischen Fusion mehr heterofusionierte Protoplasten (*Dianthus* bei NAKANO ET AL. 1996; *Pisum sativum* bei DE FILIPPIS ET AL. 2000) oder mehr tetraploide Protoplasten (*Citrus* bei OLIVARES-FUSTER ET AL. 2005) erzeugt wurden. Dagegen erreichten einige Autoren wie ASSANI ET AL. (2005) mehr hetrofusionierte Protoplasten von Bananen durch chemische Fusion (PEG).

Leider starben die Kallusse aus Elektrofusionen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus caulescens* aus unbekannter Ursache kurz vor der Übertragung auf das feste Medium ab, was weitere Untersuchungen unmöglich machte.

**Tabelle 5.18:** Verschiedene Behandlungen bei der Elektrofusion zwischen Protoplasten verschiedener Arten

Autor	Art	HFS AC [V cm <sup>-1</sup> ]	Zeit HFS AC [s]	Puls DC [V cm <sup>-1</sup> ]	Spannungspuls- dauer [µs]	Anzahl Pulse
AL-ATABEE ET AL. 1990	<i>Rudbeckia</i>	20	*	300	2	2
ASSANI ET AL. 2005	<i>Musa</i>	50	20	1000	30	2
BARTH ET AL. 1993	<i>Helianthus</i>	70	20	1200	50	3
DE FILIPPIS ET AL. 2000	<i>Pisum</i>	100	120	1100	25	2
KAZUMITSU ET AL. 2002	<i>Musa</i>	200	10	1250	100	3
NAKANO ET AL. 1996	<i>Dianthus</i>	50	20	1000	30	2
OCHATT ET AL. 2001	<i>Lathyrus</i>	750-1500	20	1000	30	2
OLIVARES ET AL. 2005	<i>Citrus</i>	50-150	*	1500	*	2
OTONI ET AL. 1995	<i>Passiflora</i>	400	10	1200	1	2
SHIMIZU ET AL. 1990	<i>Iris</i>	100	*	1250	*	*
TAMURA ET AL. 2002	<i>Solanum</i>	200	70	750	15	3
THIEME ET AL. 1997	<i>Solanum</i>	200	2-5	270	5	1
ZIMMERMANN UND SCHEURLICH 1981	<i>Vicia</i>	5-10	*	15	50	1

HFS: Hochfrequenzstärke V [AC]

Sec: Hochfrequenzdauer

Pulse: DC-Spannungshöhe

\* Unbekannt

Durch chemische Fusionen zwischen zwei *Streptocarpus*-Arten und zwei *Saintpaulia ionantha*-Sorten (Tab. 5.13) sowie innerhalb von *Streptocarpus*-Arten (Tab. 5.15) wurden Kallusse gewonnen, die sich, auf den Medien B5 und BN9 mit verschiedenen Wachstumsregulatoren und Zusätzen kultiviert, bis zur Sprossbildung entwickelten. Jedoch konnten sich die Kallusse, wahrscheinlich aufgrund der verwendeten Pflanzenmaterialien für die Isolierung der Protoplasten, die in Kapitel 4 ausführlich diskutiert wurde, nicht zu vollständigen Pflanzen entwickeln. Nur aus einem Kallus von S1 x S12 wurde eine Pflanze gewonnen, die erfolgreich im Gewächshaus akklimatisiert wurde. Die ins Gewächshaus überführte Pflanze, die visuell den Habitus einer Hybride zeigte, entsprach mit verdickten Blättern, langsamem Wachstum, hängenden, schwachen Ästen und spätem Aufblühen den von mehreren Autoren beschriebenen Eigenschaften einer tetraploiden Pflanze (WINKELMANN 1994; KISAKA ET AL. 1994; GROSSER ET AL. 1996).

Die Sortierungen der Kallusse nach ihren Ploidiestufen wurden durch DNA-Gehaltsanalysen mit Hilfe eines Partec-Durchfluscytometers durchgeführt (s. 5.3.4.2 und 5.3.5.2). Dabei wurden aus jeder Fusionskombinationen einige Kallusse zufällig ausgewählt und untersucht.

Diese Methode wurde erstmals von HELLER (1973) bei *Vicia* verwendet. Inzwischen wird sie zur Ploidiebestimmung bei vielen Arten angewendet. Im Vergleich zu anderen Methoden wie Schließzelleneigenschaften und Chromosomenzählung beschreibt WINKELMANN (1994) die Durchflusscytometrie wegen des geringeren Arbeits- und Kostenaufwands, der Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit sowie der aufgrund der vielen kleinen Chromosomen besonders bei *Saintpaulia ionantha* besseren Anwendbarkeit als vorteilhaft.

Durch Durchflusscytometrie wurden bei manchen Kallussen gleichzeitig mehrere Ploidiestufen (Peaks) nachgewiesen (Tabellen 5.16 und 5.17), deren Anteil je nach Fusionsversuch zwischen 10 und 70 % variierte. Dies stimmt mit den Befunden von WINKELMANN (1994) überein, als sie bei Kallussen von *Saintpaulia ionantha* einen 20%igen Anteil von Kallussen mit mehreren Ploidiestufen feststellte. Als Ursache gab sie an, dass diese durch Endoreduplikation während des Kalluswachstums entstanden waren.

Diese Erklärung war auf die meisten Histogramme, die gleichzeitig mehrere Ploidiestufen zeigten, anwendbar. Aber für manche Kallusse, deren „Peaks“ nicht einer Verdoppelung der Chromosomensätze entsprachen, reichten sie als alleinige Erklärung nicht aus. Möglicherweise stammten diese aus Mischungen z.B. aus einem zweikernigen und einem dreikernigen Protoplasten (Abb. 5.16), die in ihren Frühstadien nah zueinander waren und zusammenwuchsen. Dies könnte auch während der Kalluskultur durch Störungen bei den Zellteilungen geschehen.

Visuelle Beobachtungen während der Kalluskultur zeigten, dass die Entwicklung von Kallussen mit höheren Ploidiestufen im Vergleich zu diploiden Kallussen langsamer verlief. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen einiger Autoren überein, die über ähnlich verzögerte Entwicklungen bei polyploiden Kallussen oder Pflanzen berichteten (WINKELMANN 1994; TAMURA ET AL. 2002), obwohl in einigen Fällen auch von schnellerem Wachstum von heterofusionierten Kallussen oder Pflanzen, beispielsweise bei *Dianthus* (NAKANO UND MII 1992) und *Rosa* (SQUIRREL ET AL. 2005) berichtet wurde, das durch den Hybrideffekt (Heterosis) erklärt werden kann.

Die aus der Fusion zwischen S1 und S12 gewonnenen Kallusse (s. 5.3.4.3) zeigten bei der Durchflusscytometrie zwei „Peaks“ bei den Kanälen 112 und 229, was dem DNA-Gehalt von tetraploiden und oktoploiden Kernen entsprach und fast mit der Summe der „Peaks“ der beiden Fusionspartner übereinstimmte (Abb. 5.23 bis 5.28 und Tab. 5.16). Die Unterschiede zwischen hetero- und homofusionierten Protoplasten konnten jedoch durch Durchflusscytometrie weder bei Fusionen zwischen *Saintpaulia ionantha* x *Streptocarpus* noch bei Fusionen innerhalb der *Streptocarpus*-Arten sicher festgestellt werden, weil alle

untersuchten Genotypen von *Saintpaulia ionantha*-Sorten und *Streptocarpus*-Arten die gleiche Anzahl von Chromosomen besaßen und bei der Durchflussscytometrie ähnliche „Peaks“ zeigten (außer S25, der bei keiner Fusion Kallusse bildete).

SCARANO ET AL. (2002) hatten somatische Hybriden aus *Citrus paradisi* Macfadyen x *C. deliciosa* Tenore und *Citrus paradisi* Macfadyen x *C. reticulata* Blanco mittels Durchflussscytometrie untersucht. Sie vertraten die Ansicht, dass Durchflussscytometrie nicht die Unterschiede zwischen homo- und heterofusionierten Pflanzen zeigen konnte. SCHMIDT-LEBUHN ET AL. (2008) kamen durch einen Vergleichstest mittels Durchflussscytometrie und histologischer Untersuchung bei zehn *Minthostachys*-Arten zu dem Ergebnis, dass die Ploidiestufen bei diesen Arten durch Durchflussscytometrie nicht ermittelt werden konnten.

Aus diesem Grund testeten mehreren Autoren die Kallusse oder Pflanzen aus Fusionen nach der Anwendung von Durchflussscytometrie auch mit molekularen Markern (NAKANO UND MII 1992; COSTICH ET AL. 1993; OTONI ET AL. 1995; THIEME ET AL. 1997; HANSEN 1998; DANSI ET AL. 2001; SCHMIDT-LEBUHN ET AL. 2008; GENOVESI, ET AL. 2009; VAN LAERE ET AL. 2009; GUAN ET AL. 2010).

Die Fusion zwischen *Streptocarpus caulescens* und *Saintpaulia ionantha* (U08) wurde bei 15 Kallussen mit dem Primer A09 und bei 16 Kallussen mit dem Primer A15 getestet (s. 5.3.3.3). Im Gegensatz zu der Erwartung, wie bei klassischen Kreuzungen (s. 2.3.6.2) Bandenmuster, die denen der beiden Fusionspartner ähnelten, vorzufinden, wurden bei beiden Primern Bandenmuster von jeweils einem Partner und mehrere neue Banden ausgebildet. Eine Gruppierung der Kallusse nach Bandenmustern war jedoch möglich. So konnten die Bandenmuster der Kallusse bei beiden Primern (Abb. 5.18 und 5.19) in jeweils drei Gruppen eingeteilt werden (Primer A09: I = 5, 6, 7, 9, 10, 11, 15 II = 1, 2, 3, 4, 8, 13. III = 12, 14 und Primer A15: I = 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15 II = 12 III = 14)

Besonders bei Kallus 12 bildeten sich Bande der beiden Elternteile zusammen mit mehreren neuen Banden, was die erfolgreiche Protoplastenfusion zwischen *Streptocarpus* und *Saintpaulia* wahrscheinlich bestätigte (Abb. 5.19).

Auch bei Fusionen innerhalb von *Streptocarpus*-Arten waren Gruppierungen der Kallusse nach den durch RAPD-Marker gebildeten Bandenmustern möglich. Obwohl bei den meisten Kallussen die Banden von *Streptocarpus caulescens* deutlicher ausgeprägt wurden, zeigten einige Kallusse Markerbanden von beiden Eltern sowie neue Banden. Besonders durch Primer A20 konnte die Hybridisierung der aus der Fusion regenerierten Pflanze mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigt wurden (Abb. 5.28).

Bei einigen somatischen Hybriden zeigten die Pflanzen aus Fusionen intermediäre Eigenschaften zwischen den beiden Fusionspartnern, und durch molekulare Marker wurden Banden von beiden Fusionspartnern bei heterofusionierten Kallussen oder Pflanzen festgestellt (HANSEN 1998; TAMURA ET AL. 2002; SCHUM ET AL. 2002), aber meistens repräsentierten Kallusse oder Pflanzen aus Fusionen komplizierte genotypische Eigenschaften.

KISAKA ET AL. (1994) berichteten, dass aus interfamiliären Hybriden zwischen Karotten und Reis Pflanzen hervorgingen, die Karotten ähnelten.

LIU ET AL. (2005) vertreten die Auffassung, dass bei somatischen Hybriden zwar manchmal Banden der beiden Fusionspartner, jedoch oft mit neuen Kombinationen und Translokationen von Chromosomen, festgestellt werden, die Chromosomen beider oder einer der Elternseite jedoch sehr häufig durch die Fusion eliminiert werden. LIU ET AL. (1999) untersuchten somatische Hybriden aus *Oryza sativa* und *Zizania latifolia* mit RAPDs und stellten fest, dass diese eine ähnliche Anzahl von Chromosomen wie Reis hatten und Bandenmuster auftraten, die sich keinem Elternteil zuordnen ließen. Die Autoren vermuteten, dass die Chromosomen von *Z. latifolia* eliminiert worden waren.

CABASSON ET AL. (2001) fusionierten die Protoplasten von *Citrus*-Arten. Von 22 Pflanzen aus Fusionen zwischen Orangen und Mandarinen sahen die Blätter von 12 Pflanzen morphologisch wie Orangen- und die Blätter von zehn Pflanzen wie Mandarinenblätter aus, und keine Pflanze zeigte einen intermediären Phänotyp. Die Autoren stellten durch Untersuchungen fest, dass alle 22 Pflanzen diploid waren, und die RFLP- und mtDNA-Analysen bewiesen, dass alle Pflanzen Genomanteile von beiden Fusionspartnern enthielten. Auch die somatischen Hybriden aus Protoplastenfusionen zwischen Mandarine und Grapefruit sahen morphologisch wie Grapefruit aus (CABASSON ET AL. 2001).

Bei der Untersuchung von Kallussen aus *Rosa x Rosa* und *Rosa x Prunus* stellten SQUIRREL ET AL. (2005) fest, dass bei einigen Kallussen neue RAPD-Banden gebildet wurden und andere Banden verschwanden. Die Autoren vermuteten, dass die Genome instabil waren und es dadurch zu Mutationen kam, die diese Phänomene verursachten. Dies entspricht auch den Befunden von DE FILIPPIS ET AL. (1996), die bei Untersuchungen von Tabak feststellten, dass bei somatischen Hybriden einige Banden erschienen, die bei den Eltern nicht beobachtet wurden, und umgekehrt einige Banden, die bei Proben der Eltern ausgeprägt wurden, bei Proben der somatischen Hybriden nicht zu sehen waren.

MOTTLEY ET AL. (1996) untersuchten somatische Hybriden von zwei Rosensorten ('Frensham' x 'Blackberry') durch Zählung von Chromosomen und RAPD-Markern. Sie

beobachteten, dass die Hybridpflanzen morphologisch mehr Ähnlichkeit zu einem Elternteil ('Frensham') hatten. Das Chromosom Nr. 21 der Hybride sah wie das entsprechende Chromosom von 'Frensham' aus. Auch die anschließenden Untersuchungen mit molekularen Markern bestätigten, dass die Chromosomen des anderen Elternteils während der Entwicklung der Hybride eliminiert worden waren. Die Autoren berichteten auch, dass die Blätter von homofusionierten Pflanzen im Vergleich zu Blättern von diploiden Pflanzen unterschiedliche RAPD-Bande und Morphologie aufwiesen.

BINSFELD UND SCHNABL (2002) untersuchten symmetrische und asymmetrische Hybriden aus Protoplastenfusionen zwischen *Helianthus annuus* und *H. maximiliani* mit RAPDs. Einige Bande von den beiden Fusionspartnern wurden bei den Hybriden ausgeprägt, was die Kombination der Genome bestätigte. Aber bei SSH (symmetrische somatische Hybriden) wurde im Vergleich zu ASH (asymmetrische somatische Hybriden) eine höhere Variabilität der Bande beobachtet. Obwohl die Anzahl der Chromosomen bei beiden Fusionspartnern gleich war ( $2n = 34$ ), zeigten die cytologischen Untersuchungen, dass einige Chromosomen bei SSH eliminiert wurden. Für SSH-Pflanzen betrug die Chromosomensätze zwischen  $2n = 60$  bis  $2n = 65$ , was die Eliminierung von drei bis acht Chromosomen bei SSH bestätigte. Die Autoren vertraten die Auffassung, dass die Übertragung eines kleinen Teiles des Genoms, vorzugsweise eines Chromosoms oder einiger Chromosomen, zur Erzeugung einer besonderen neue Linie führte, die durch Rekombination neue Allele besaß.

Die Eliminierung von Chromosomen bei somatischen Hybridpflanzen ist ein allgemeines Phänomen, das mit der Zunahme der genetischen Distanz der Fusionspartner verstärkt auftritt (SHEPARD ET AL 1983).

GÖNTÉR ET AL. (2002) berichteten, dass durch symmetrische Fusion gewonnene Hybriden zwischen Mais und Weizen morphologisch wie Mais aussahen, aber durch RAPD-Analyse auch die Bandenmuster von Weizen ausprägten.

THIEME ET AL. (1997) fusionierten die Protoplasten aus Kulturkartoffeln mit einigen mexikanischen Wildarten durch Elektrofusion.

Die Pflanzen aus somatischer Hybridisierung zeigten in Bezug auf Krankheitsresistenz eine intermediäre Stellung. Die Autoren vermuteten, dass dies durch die Rekombination des Genoms oder durch die Eliminierung einiger Chromosomen verursacht worden war.

In jedem Fall, sowohl laut der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit als auch der Literaturangaben, ist festzustellen, dass die Identifizierung der Pflanzen oder Kallusse aus

Protoplastenfusionen nur durch morphologische oder genetische Eigenschaften meist nicht ausreicht und je nach Art eine Kombination von mehreren Methoden wie morphologischen Markern, zytologischen Markern (KAO UND WETTER 1977), Durchflussscytometrie (DE LAAT ET AL. 1987), Isoenzymen (NAKANO UND MII 1992; BEGUM ET AL. 1995) oder molekularen Markern verwendet werden sollte. Jede Methode hat z.T. Beschränkungen. Zytologische und durchflussscytometrische Untersuchungen können nicht die Unterschiede zwischen Homo- und Heterofusionen feststellen. Biochemikalische Marker wie Isoenzyme können dieses Problem überwinden, werden aber durch Umweltbedingungen, Entwicklungsstadien der Organe oder Gewebeart beeinflusst (SCARANO ET AL. 2002).

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass Fusionen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten sowie innerhalb von *Streptocarpus*-Arten (Subgattung: *Streptocarpella*) nach Protokoll 6 wahrscheinlich möglich sind und für die Entwicklung der Fusionsprodukte bis zur vollständigen Pflanze wahrscheinlich Optimierungen beim Ausgangsmaterial, möglicherweise auch beim Sprossinduktionsmedium erforderlich sind.

## 6 Zusammenfassung

Die Nachfrage nach neuen Zierpflanzen ist in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen. Hierbei führte die Kombination verschiedener Arten und Gattungen zur Herstellung von neuen Zierpflanzen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die gametische und somatische Hybridisierung in der Familie der *Gesneriaceae*, zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten sowie innerhalb von *Streptocarpus*-Arten der Untergattung *Streptocarpella*.

Dabei wurden Untersuchungen zur Pollenvitalität, Pollenkeimung *in vitro* und *in vivo* sowie Kreuzungen durchgeführt. Die Pollenkeimung *in vitro* lag je nach Genotyp zwischen 3 % und 56 %. Hierbei wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,99 zwischen der Pollenvitalität durch MTT-Färbung und der *In-vitro*-Pollenkeimung bestimmt.

Aus Artkreuzungen innerhalb von 13 *Streptocarpus*-Arten wurden bei elf Kreuzungen innerhalb der Untergattung *Streptocarpella* Hybriden hergestellt, bei denen durch morphologische Untersuchungen und teilweise durch RAPD (random amplified polymorphic DNA) -Marker bei fünf Kreuzungen der Hybridcharakter bestätigt wurde.

Um die ermittelten prä- und postzygotischen Barrieren bei Kreuzungen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus* und auch bei weiteren Artkreuzungen innerhalb von *Streptocarpus* zu überwinden, wurden *In-vitro*-Bestäubung und die „Embryo Rescue“-Technik eingesetzt. Bei den beiden Methoden wurde trotz anfänglicher Vergrößerung der Samenanlagen, die meistens als Zeichen einer Befruchtung interpretiert wird, keine Keimung von Embryonen beobachtet.

Als Vorbereitung für die Protoplastenfusion wurden nach Etablierung von Protoplastenisolation und -regeneration von vier *Saintpaulia ionantha*-Sorten nach WINKELMANN (1994) Versuche zur Isolierung und Regeneration von Protoplasten aus fünf *Streptocarpus*-Arten durchgeführt. Die geeignete Enzymkonzentration für die Isolierung der Protoplasten wurde bei einer Kombination aus 2 % Cellulase und 1 % Macerozyme ermittelt. Aus im Gewächshaus kultivierten *Streptocarpus*-Arten wurden sehr wenige Protoplasten gewonnen, die für ein Protoplastenkulturprogramm nicht ausreichend waren. Bei zwei Arten wurden von Stängeln aus *In-vitro* Sprosskulturen zwischen 2 und  $3,5 \times 10^5$  Protoplasten / g Frischmasse mit einer Vitalität von 68-72 % gewonnen. Bei drei weiteren kompakten Arten mit kurzen Internodien wurden andere Pflanzenorgane als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Protoplasten getestet: Aus an Blattexplantaten regenerierten Sprossen und aus

Blättern von In-vitro-Sprosskulturen auf festem Medium unter Licht bei  $28 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  wurden auch durch Einsatz von Vakuum nicht genügend Protoplasten freigesetzt, und die kultivierten Protoplasten zeigten keine Zellteilungen. Bei Reduzierung der Lichtintensität auf  $8 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  oder Kultur in Dunkelheit verbräunten die an Blattexplantaten regenerierten Sprosse und die an aus In-vitro-Sprosskultur auf festem Medium kultivierten Pflanzen zum großen Teil, und manche Arten waren zu 80 % hyperhydriert. Obwohl durch Isolierung der Protoplasten aus diesen Pflanzenmaterialien die Ausbeute der Protoplasten auf bis zu  $5,9 \times 10^5$  / g Frischmasse erhöht wurde, reduzierte sich die Vitalität der Protoplasten auf 12-44 %. Bei zwei Arten wurden an Protoplastenkulturen aus in Dunkelheit an Blattexplantaten regenerierten Sprossen 14 Tage nach der Isolierung Zellteilungsfrequenzen zwischen 2,3 % und 2,5 % beobachtet. Protoplastenkulturen aus Stängeln, die aus In-vitro-Sprosskultur bei  $28 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  stammten, zeigten bei einer Art Zellteilungsfrequenzen von 1,7 %. Bei Protoplastenkulturen aus Stängeln, die aus In-vitro-Sprosskultur unter  $8 \mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  Belichtung stammten, lagen die Zellteilungsfrequenzen bei zwei Arten bei 1,8 % bzw. 2,2 %. Diese entwickelten sich bis zum Mikrokallusstadium, starben dann aber ab.

Bei drei *Streptocarpus*-Arten ließen sich aus Blättern von in Dunkelheit in flüssigem Medium kultivierten In-vitro-Sprosskulturen zwischen  $2$  und  $3,6 \times 10^5$  Protoplasten / g Frischmasse mit hoher Vitalität von 68-96 % isolieren. 14 Tage nach der Isolierung wurden bei vier Arten Zellteilungsfrequenzen zwischen 2,1 und 5,5 % beobachtet, und bei zwei Arten bildeten sich Kallusse. An den Kallussen bildeten sich Wurzeln, aber trotz verschiedener Maßnahmen wie Zugabe von verschiedenen Wachstumsregulatoren (BAP, 2,4-D, Kinetin, 2ip, TDZ, Zeatin, Metatopolin, NAA, IAA), Adeninsulfat oder Silbernitrat in die Medien sowie Variation der Lichtintensität oder unterschiedliche Medienzusammensetzungen (MS, B5) wurde keine Sprossregeneration beobachtet.

Für die Protoplastenfusion kamen chemische und elektrische Methoden zum Einsatz. Chemische Protoplastenfusionen wurden mit Polyethylenglykol durchgeführt, und ein geeignetes Protokoll für die Protoplastenfusion zwischen *Streptocarpus* und *Saintpaulia* und innerhalb von *Streptocarpus*-Arten wurde entwickelt. Die Fusionsrate, mittels Zellkernfärbung durch Ethidiumbromid ermittelt, erreichte bis zu 35 % zweikernige Protoplasten. Nur durch Floatierungsbehandlung mit Saccharoselösung konnten die vitalen Protoplasten angereichert und Zellteilungen sowie Kallusbildung erzielt werden.

In fünf von zehn Fusionsexperimenten zwischen fünf *Streptocarpus*-Arten und zwei

*Saintpaulia ionantha*-Sorten wurden Zellteilungen und bei zweien Kallusbildung beobachtet. Hingegen ließen sich in fünf von neun Fusionsansätzen mit fünf *Streptocarpus*-Arten Kallusse gewinnen. Dabei wurden auf einem Kallus aus der Fusion zwischen *S. saxorum* x *S. stomandrus* und *S. glandulosissimus* Sprosse regeneriert, die im Gewächshaus akklimatisiert wurden.

Zur Identifizierung von möglichen Hybriden wurden zuerst zufällig ausgewählte Kallusse durchflusscytometrisch selektiert und mittels RAPD-Markern untersucht. Obwohl bei den meisten Kallussen die Banden von einem Fusionspartner deutlicher ausgeprägt waren, zeigten einige Kallusse Markerbanden von beiden Eltern sowie neue Banden. Dies zeigt, dass Fusionen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten sowie innerhalb der *Streptocarpus*-Arten wahrscheinlich möglich sind.

Die Elektrofusion erfolgte bei sechs Sekunden AC-Spannung bei  $70 \text{ V cm}^{-1}$ , der ein Puls von  $750 \text{ V cm}^{-1}$  für 20 Mikrosekunden folgte. Nach der Elektrofusion zwischen *Streptocarpus* und *Saintpaulia* entwickelten sich die Protoplasten bis zu Mikrokallusstadien, starben dann aber aus unbekannter Ursache ab, was weitere Untersuchungen verhindert.

## 7 Ausblick

Die Herstellung von Hybriden zeigte, dass Kreuzungen zwischen *Streptocarpus*-Arten der Untergattung *Streptocarpella* möglich sind. Die verbliebenen leeren Kapseln bei einigen Artkreuzungen und die Vergrößerung von Samenanlagen bei Anwendung der „Embryo-Rescue“-Technik und der In-vitro-Bestäubung bei Gattungskreuzungen zwischen *Saintpaulia* und *Streptocarpus* und auch bei Artkreuzungen innerhalb von *Streptocarpus* könnte möglicherweise als Zeichen einer Befruchtung interpretiert werden. Daher kann eine weitere Optimierung des Kulturmediums für „Embryo-Rescue“ und In-vitro-Bestäubung nur dann sinnvoll sein, wenn die Befruchtung von Embryonen aus Gattungskreuzungen zwischen *Saintpaulia* und *Streptocarpus* oder innerhalb von *Streptocarpus*-Arten histologisch überprüft wird. Die Untersuchung, ob der Pollenschlauch in die Eizelle eingedrungen ist und die Bestätigung der Befruchtung von Eizellen nach den Gattungskreuzungen wie zwischen *Melandrium album* x *Datura stramonium* (SENKTLER 1970) und Artkreuzungen bei *Oryza* (KHALEQUZZAMAN UND HAQ 2004) könnten den Grundstein für die Gewinnung von Pflanzen aus In-vitro-Bestäubung legen. Bei *Brachiaria* wurde durch die Anfärbung mit „astral blue“ und Safranin das Eindringen des Pollenschlauchs in den Embryosack, das Endosperm und die Eizelle verfolgt (DIVA ET AL. 2010).

Somatische Hybridisierungen zwischen *Saintpaulia ionantha* und *Streptocarpus*-Arten und innerhalb von *Streptocarpus*-Arten sind wahrscheinlich möglich. Diese wurden bei den Untersuchungen von Kallussen aus somatischen Hybridisierungen durch RAPD-Marker nachgewiesen. Auch bei der aus somatischer Hybridisierung zwischen S1 (*S. saxorum* x *S. stomandrus*) und S12 (*S. glandulosissimus*) gewonnenen Pflanze wurden morphologische Merkmale beider Arten festgestellt.

Bei somatischen Hybridisierungen wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden verwendet, die zahlreiche vitale Protoplasten benötigten. Deshalb wurden bei den vorgestellten Untersuchungen meistens Blätter als Ausgangsmaterial verwendet, die wahrscheinlich wegen der hohen Differenzierung der Mesophyllzellen keine Sprosse regenerieren können. Die erfolglose Sprossregeneration aus Mesophyllzellen bei *Streptocarpus*-Arten kann möglicherweise durch die Beobachtungen von NAYLOR UND JOHNSON (1937) erklärt werden. Sie stellten bei der Regeneration aus Blattstecklingen und Blattspreiten von *Saintpaulia* fest, dass die Sprosse aus Epidermiszellen stammten.

Durch die Anwendung von Fusionsmethoden, die eine geringe Anzahl von Protoplasten benötigen, wäre die Isolierung von Protoplasten aus regenerierbaren Pflanzenteilen wie der

Epidermis für die Protoplastenisolation und -fusion realisierbar. Die Epidermis von *Streptocarpus* aus dem Gewächshaus wurde durch Oberflächensterilisation beschädigt (AFKHAMI 2002). Die Epidermis ist von den Blättern von *Streptocarpus*-Arten aus In-vitro-Sprosskultur nicht leicht abzutrennen. Die Verlängerung der Stängel könnte aber zur Erhöhung der Epidermisfläche bzw. zu mehr verfügbarem Ausgangsmaterial führen. Als die *Streptocarpus*-Arten auf einem Sprosserhaltungsmedium (9.0), das 10 mg / l Gibberellinsäure GA<sub>3</sub> und 120 g / l Saccharose enthielt, kultiviert wurden, wurden die Internodien je nach Art um das 5- bis 10-fache verlängert (Daten nicht dargestellt). Beispielsweise könnten dann durch Mikroelektrofusion (KIRICENKO 1990; LENUTA ET AL. 2001) Protoplasten in geringer Anzahl fusioniert werden. Bei dieser Methode wurden in einer Kammer 20 Mikrotropfen und in jedem Mikrotropfen zwei Protoplasten der beiden Fusionspartner von Tabak transportiert und fusioniert, und die fusionierten Protoplasten durch ein „feeder cell layer“-System zur Zellteilung und Sprossregeneration gebracht (RÁKOSY-TICAN ET AL. 2001).

Durch die Fortschritte in der letzten Zeit, die auf der einen Seite im Bereich der gametischen Hybridisierung durch „Embryo-Rescue“-Technik und In-vitro-Bestäubung und auf der anderen Seite im Bereich der somatischen Hybridisierung erreicht wurden, eröffnet eine Kombination der beiden Verfahren weitere Perspektiven in der Pflanzenzüchtung.

Die Isolierung von Spermzellen und Eizellen kann durch unterschiedliche Methoden durchgeführt werden (KRANZ UND SCHOLTEN 2008). Wie für Reis von KHALEQUZZAMAN UND HAQ (2004) beschrieben, können die Spermzellen durch Reiben von Pollen in einer Lösung aus Chemikalien mit bestimmter Osmolarität mittels eines Glasröhrchens freigesetzt und mittels Filter und Zentrifugieren isoliert werden. Ebenso können die Eizellen durch Verdauung von Embryosäcken in einer Lösung aus Cellulase und Pektinase gewonnen werden. Danach können die isolierten Spermzellen mit Eizellen in vitro durch Mikroelektrofusion fusionieren. Die Kultur sollte dann in einem „feeder cell layer“-System aus Suspensionskultur, wie zum Beispiel bei UCHIUMI ET AL. (2007), erfolgen.

Bei den vorgestellten Versuchen war die Aussortierung von nicht fusionierten und homofusionierten Protoplasten schwierig. Da die Protoplasten von *Saintpaulia* und *Streptocarpus* empfindlich waren, war eine Vorbehandlung der Protoplasten mit Hemmstoffen wie Jodacetamid oder Rhodamin 6G (R6G) wegen deren toxischen Wirkungen auf die Zellteilungen nicht geeignet. Aber die Selektion von heterofusionierten Protoplasten durch Floatierung der Fusionsprodukte in einer „iso-osmotischen“ Lösung ist vorstellbar.

HARMS ET AL. (1978a) hatten Protoplasten aus verschiedenen Arten wie Tabak, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste und Mais in einer „iso-osmotischen“ Lösung zentrifugiert. Sie stellten fest, dass die Protoplasten aus unterschiedlichen Geweben und Arten unterschiedliche spezifische Dichten hatten und sich dadurch in der „iso-osmotischen“ Lösung in verschiedenen Schichten sammelten. Sie berichteten, dass diese Behandlung keine negativen Auswirkungen auf die Regeneration der Protoplasten hinterließ.

Ähnliche Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit bei *Streptocarpus* gemacht. Bei einer Untersuchung wurde in Enzymlösung verdautes Gewebe von *Streptocarpus glandulosissimus* in der Pufferlösung 1, die eine Osmolarität von 375 mOsmol / kg H<sub>2</sub>O hatte, suspendiert und bei 100 g zentrifugiert. Es wurde beobachtet, dass sich die Protoplasten in verschiedenen Ebenen positionierten. Die violetten Protoplasten aus der Epidermis sammelten sich an der Oberfläche der Lösung, die grünen Protoplasten sedimentierten am Boden der Glasröhrchen.

Bei einem Versuch mit Mais wurden die Protoplasten aus Stängeln und Mesophyllzellen von Weizen mit PEG fusioniert, und durch Floatierung der Fusionsprodukte in einer „iso-osmotischen“ Lösung wurden die heterofusionierten Protoplasten isoliert (HARMS ET AL. 1978b).

## 8 Literaturverzeichnis

ABDULLAH, B. UND I. H. SOMANTRI 2009: Production of hybrids through embryo rescue between tropical japonica rice and wild species of *Oryza*. Biotechnology Research Institute for Food Crops, CRIFC, Indonesia. <http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/rgn/vol12/v12p165.html>

ADAOHA, M. E. N. UND D. H. ROSCOE 1982: Alginate: An alternative to agar in plant protoplast culture. *Plant Science Letters* **25**, S. 61-66

AFKHAMI SARVESTANI, R. 2002: In-vitro-Etablierung verschiedener *Saintpaulia*-Sorten und *Streptocarpus*-Arten und ihre Identifizierung mittels RAPD-Markern. Diplomarbeit Universität Hannover

AKIKO, S., K. TOYOOKA UND T. OKAMOTO 2009: Asymmetric cell division of rice zygotes located in embryo sac and produced by in vitro fertilization. *Sex Plant Reprod* DOI 10.1007/s00497-009-0129-9

AHKONG, Q. F., D. FISHER, W. TAMPION UND J. A. LUCY 1975: Mechanisms of cell fusion. *Nature* **253**, S. 194-195

AHLOOWALLA, B. S. 1973: Germination in vitro of ryegrass pollen grains. *Euphytica* **22**, S. 575-581.

AKASAKA AKENNEDY, Y., H. OSHIDA UND Y. TAKAHATA 2005: Efficient plant regeneration from leaves of rape seed (*Brassica napus* L.): the influence of AgNO<sub>3</sub> and genotype. *Plant Cell Reports* **24**, S.649-654

AKHARE, A. A., SB. SAKHARE, PL. KULWAL, DB. DHUMALE UND A. KHARKAR 2008: RAPD profile studies in *Sorghum* for identification of hybrids and their parents. *IJIB International Journal of Integrative Biology*, <http://www.classicus.com/IJIB/Arch/2008/1063.pdf>

AL-ATABEE, J., S. B. J. MULLIGAN UND J. B. POWER 1990: Interspecific somatic hybrids between *Rudebeckia hirta* and *R. laciniata* (Compositae). *Plant Cell Reports* **8**, S. 517-520

ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWES, M. RAFF, K. ROBERTS UND J. D. WATSON 1986: *Molekularbiologie der Zelle*. 3 Auflage, S. 1365-1372

ALEXANDER, L. J. 1965: Embryo culture of a tomato interspecific hybrids. (Abstract). *Phytopath.* **46**, S. 6 in: SHARMA, D. R., R. KAUR UND K. KUMAR 1996: Embryo rescue in Plants-a review. *Euphytica* **89**, S. 325-337

ARNOLD, S. V. UND T. ERIKSSON 1975: Factors influencing the growth and division of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant* **36**, S. 147-155

ASANO, Y. UND H. MYODO 1977: Studies on cross between distantly related species of Lilies. I. For the interstellar pollination technique. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* **46**, S. 59-

ASANO, Y. UND H. MYODO 1977: Studies on crosses between distantly related species of Lilies. II. The culture of immature hybrid embryos. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **46**, S. 267-273

- ASANO, Y. 1978: Studies on crosses between distantly related species of Lilies. III. New hybrids through embryo culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. **47**, S.401-414
- ASCHER, P.D. 1973: The effect of pre-pollination stylar flush on pollen tube growth in heat-treated style of *Lilium longiflorum* Thunb. Incompatibility Newsletter **3**, S. 4-6
- ASHLEY, T. 1972: Zygote shrinkage and subsequent development in some *Hibiscus hybrids*. Planta **108**, S. 303-317
- ASSANI, A., D. CHABANE, R. HAÏCOUR, F. BAKRY, G. WENZEL UND B. FOROUGH-WEHR 2005: Protoplast fusion in banana (*Musa spp.*): comparison of chemical (PEG: polyethylene glycol) and electrical procedure. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **83**, S.145-151
- BARTH, S., D. VOESTE UND H. SCHNABL 1993: Somatic Hybrids of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Identified at the callus Stage by Isoenzyme Analysis, Botanica Acta **106**, S. 100-102
- BEGUM, F., S. PAUL, N. BAG, S. R. SIKDAR UND, S. K. SEN 1995: Somatic hybrids between *Brassica juncea* (L.) and *Diplotaxis harra* (Forsk.) Boiss and the generation of backcross progenies. Theor Appl Genet **91**, S. 1167-1172
- BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: Plant Tissue culture: Theory and Practice. Elsevier Amsterdam. S. 337-405
- BILKEY, PC. UND EC. COCKING 1982: A nonenzymatic method for the isolation of protoplasts of Callus of *Saintpaulia ionantha* (African violet), Z. Pflanzenphysiologie **105**, S. 285-288 in: HOSHINO, Y., M. NAKANO UND M. MII 1995: Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Plant Cell Reports **14**, S. 341-344
- BINDING, H., R. NEHLS, R. KOCK, J. FINGER UND G. MORDHORST 1981: Comparative Studies on Protoplasts Regeneration in Herbaceous Species of the Dicotyledonae Class. Z. Pfl. physiol. **101**, S. 119-130 in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Saintpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- BINO RAOUL, J., M. G. JANSSEN, J. FRANKEN UND J. N. DE VRIES 1989: Enhanced seed development in the interspecific cross *Allium cepa* x *A. phaeocephalon* through ovary culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **16**, S.135-142
- BINSFELD, P. UND H. SCHNABL 2002: Molecular and cytogenetic constitution of plants obtained via two different somatic hybridization methods. Plant Cell Reports Vol. 21, Nr. 1, S. 58-62
- BOYLE, T. H. UND A. IDNUM 2003: Intergeneric Hybridization between *Schlumbergera* Lem and *Hatiora* Britt. und Rose (*Cactaceae*). Journ. Amer. Soc. Hort. Sci. **128**, S. 724-730
- BRICHET, H., 2003: Distribution and ecology. In ROBERTS, A.V., TH. DEBENER and S. GUDIN: Encyclopedia of rose science. Elsevier Acad. Press, Oxford, UK, Vol. 1, S. 199-227.
- BREWBAKER, J. L. UND B. H. KWACK 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. American journal of botany **50**, S. 859-865

- CABASSON, C. M., F. LURO, P. OLLITRAULT. UND J. W. GROSSER 2001: Non-random inheritance of mitochondrial genomes in *Citrus hybrids* produced by protoplast fusion. *Plant Cell Reports* **20**, S. 604-609
- CARLSON, P. S., H. H. SMITH UND R. D. DEARING 1972: Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, S. 2292-2294 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405
- CHAND, K. P., M. R. DAVEY, J. B. POWER UND E. C. COCKING 1998: An Improved Procedure for Protoplast Fusion Using Polyehylen Glycol. *J. Plant Physiol* **133**, S. 480-485
- CHANG, S. B., H. H. CHEN, Y. M. FU UND Y. S. LIN 2000: RFLP and inheritance patterns of chloroplast DNA in intergeneric hybrids of *Phalaenopsis* and *Doritis*. *Bot. Bull. Acad. Sinica* **41**, S. 219-223
- CHEN, L. P., M. F. ZAHNG, Q. B. XIAO, J. G. WU UND Y. HIRATA 2004: Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of red cabbage (*Brassica oleraceae*) by using nurse culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **77**, S. 133-138
- CHI, H. S. 2000: Interspecific crosses of lily by in vitro pollinated ovules. *Bot. Bull. Acad. Sin* **41**, S. 143-149
- CHI, H. S. 2002: The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific cross of *Lilium*. *Bot. Bull. Acad. Sin* **43**, S. 139-145
- CHRAIBI, K. M. B., A. LATCHE, J. P. ROUSTAN UND J. FALLOT, 1991: Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Reports* **10**, S. 204-207
- CHOUDHURY, B. 1955a: Embryo culture technique. II. Embryo factors and immature tomato embryos. *Ind. J. Hort* **12**, S. 152-154
- CHOUDHURY, B. 1955b: Embryo culture technique. III. Growth of hybrid embryos (*Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* in culture medium. *Ind. J. Hort* **12**, S. 155-156
- CHUNDET, R. A., W. B. CUTLER, R. M. C. TASANON UND S. D. ANUNTALABHOCHAI 2002: Hybrid Detection in Lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) Cultivars Using RAPD Markers *Science Asia* **33**, S. 307-311
- CISNEROS, A. UND T. Z. NOEMI 2010: Embryo rescue and plant regeneration following interspecific crosses in the genus *Hylocereus* (*Cactaceae*) *Euphytica*. **174**, S. 73-82
- CLARKE, H. J., J. G. WILSON, I. KUO, M. M. LU-LSDORF, N. MALLIKARJUNA, J. KUO UND K. H. M. SIDDIQUE 2006: Embryo rescue and plant regeneration in vitro of selfed chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild annual relatives. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **85**, S. 197-204
- CLUSE, S. D., D. M. ZUREK, 1991: Molecular analysis of brassinolides action in plant growth and development. in: OH. M. H., S. D. CLOUSE 1998: Brassinolide affects the rate cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports* **17**, S. 921-924

- COCKING, E. C. UND J. F. PEBERDY (EDS) 1974: The use of protoplasts from Fungi and Higher Plant as genetic systems a practical handbook. Published by department of Botany, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD, England
- CONSTABEL, F. UND K. N. KAO 1974: Agglutination and fusion of protoplasts by polyethylene glycol. *Can. J. Bot* **52**, S. 1603-1606
- COSTICH, D. E., R. ORTIZ, T. R. MEAGHER, L. P. BRUEDERLE UND N. VORSA 1993: Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. *Theor Appl Genet* **86**, S. 1001-1006
- CUSTERS, J. B. M., W. EIKELBOOM, J. H. W. BERGERVOET UND J. P. VAN EIJK 1995: Embryo-rescue in the genus *Tulipa* L., successful direct transfer of *T. kaufmanniana* regel germplasm into *T. gesneriana* L. *Euphytica* **82**, S. 253-261
- DAMM, B. UND L. WILMITZER 1988: Regeneration of Fertile Plants from Protoplasts of Different *Arabidopsis thaliana* Genotypes. *Mol. Gen. Genet.* **213**, S. 15-20 in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- DANSI, A., H. D. MIGNOUNA, M. PILLAY UND S. ZOK 2001: Ploidy variation in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis-Dioscorea rotundata complex*) from Cameroon as determined by flow cytometry. *Euphytica* **119**, S. 301–307
- DAVEY, M. R., R. H. CLOTHIER, M. BALLS UND E. C. COCKING 1978: An ultrastructural study of the fusion of cultured amphibian cells with higher plant protoplasts. *Protoplasma* **96**, S. 157-172
- DE FILIPPIS, L. F., H. HAMPP, UND H. ZIEGLER 2000: Membrane Permeability Changes and Ultrastructural Abnormalities Observed during Protoplast Fusion. *J. Plant Physiol* **156**, S. 628-634
- DE FILIPPIS, L. F., H. HAMPP UND R. HAMPP 1996: Identification of somatic hybrids of tobacco generated by electrofusion and culture of protoplasts using RAPD-PCR. *Plant Science* **121**, S. 39-46
- DE JEU, M. J. UND E. JACOBSEN, 1995: Early post-fertilization ovule culture in *Alsterioemeria* L. and barriers to interspecific hybridization. *Euphytica* **86**, S. 15-23
- DE LAAT, A. M. M., W. GÖHDE UND M. J. D. C. VOGELZANG 1987. Determination of ploidy level of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breed* **99**, S.303–307.
- DEMKE, T. UND H. G. HUGHES 1991: Generation and Storage of Pollen of *Phytolacca dodecandra* L. *Annals of Botany* **68**, S. 13-15
- DIJAK, M., D. L. SMITH, T. J. WILSON, UND D. C. W. BROWN 1986: Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* *Plant Cell Reports* **5**, S. 468-470

DIVA, M. A. D., R. E. ALVES, M. T. M. WILLEMSE, R. FALCAO, C. B. DO VALLE, V. T. C. CARNEIRO 2010: Toward in vitro fertilization in *Brachiaria spp.* Sex Plant Repord DOI 10.1007 / s00497-010-0134-z

DOROKHOV, D. B. UND E. KLOCKE 1997: A rapid and economic technique for a RAPD-analysis of plant genomes. Russian Journal of Genetics **33**, S. 358-365

DRAGET, K. J., S. MYHRE, G. SKJAK-BRK UND K. OSTEGAARD 1988a: Regeneration, cultivation and differentiation of plant protoplasts immobilized in calcium-alginat beads. J. Plant Physiol **132**, S. 552-556 in: NAKANO, M., K. HOSOKAWA, T. OOMIYA UND S. YAMAMURA 1995: Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana* by embedding protoplasts in gellan gum. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **41**, S. 221-227

DRAGET, K. I., S. MYHER, K. EVJEN UND K. OSTGARD 1988b: Plant protoplasts immobilized in calcium alginate: a simple method of preparing fragile cells for transmission electron microscopy. Stain Technol **63** (3), S. 159-164.

DUDITS, D., I. RASKO, GY. HADLACZKY, A. LIMA-DE-FARIA 1976: Fusion of human cells with carrot protoplasts induced by polyethylene glycol. InterScience **82**, S. 121-123

DUDITS, D., E. MARORY, T. PRAZNOVSKY, Z. OLAH, J. GYORGYEY UND R. CELLA 1987: Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: regeneration of fertile plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, S. 8434-8438

DUTTA S. G. UND Y. IBARAKI 2006: Plant Tissue Culture Engineering, Kapitel: Electrical Controll of Plant Morphogenesis **6**, S.

EBRAHIMZADEH, H., R. KARAMIAN UND M. R. NOORI-DALOH 2000: Shoot Regeneration from Saferon (*Crocus sativus* L) Protoplasts immobilized in Ca-Alginat. J. Sci. I. R. Iran **11** (2), S. 68-72

ECKHAUT, T., E. DE. KEYSER, J. VAN HUYLENBROECK, J. DE. RIEK, E. VAN BOCKSTAELE 2007: Application of embryo rescue after interspecific crosses in the genus *Rhododendron*. Plant Cell Tissue and Organ Culture **89**, S. 29-35

EIGEL, L. UND H. U. KOOP 1989: Nurse culture of individual cells; regeneration of colonies from single protoplasts of *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus* and *Hordeum vulgare*. J. Plant Physiol **134**, S. 577-581: in BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: Plant Tissue culture: Theory and Practice. Elsevier Amsterdam. S. 337-405

ELLIS, D. D., H. BARCZYNSKA, B. H. MCCOWN UND N. NELSON 1991: A comparison from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **27**, S. 281-287 in: NAKANO M., K. HOSOKAWA, T. OOMIYA UND S. YAMAMURA 1995: Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana* by embedding protoplasts in gellan gum. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **41**, S. 221-227

ERHARDT, A. UND W. ERHARDT 1993: Schöne Usambaraveilchen und andere Gesnerien. Ulmer Verlag Stuttgart. in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.

- ERIKSSON, T. 1965: Studies on the growth requirement and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plantarum* **18**, S. 976-993. in: KAO, K.N. UND M. R. MICHAYLUK, 1974: A Method for High-frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplast. *Planta (Berl.)* **115**, S. 355-367
- ETTINGER-PALTIN, R., S. IZHAR, D. SWARTZBERG UND Y. TABIB 1984: Growth hormones as a selection tool for somatic hybridization in *Petunia*. *Plant Science Letter* **35**, S. 231-235
- EVANS, P. K. UND E. C. COCKING 1975: The Technique of Plant Cell Culture and Somatic Cell Hybridization. S. 127-158 in: PAIN, R. H. UND B. J. SMITH (Hrsg.): *New Techniques in Biophysics and Cell Biology* **2**, London in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- EVANS, D. A., L. R. WETTER UND O. L. GAMBORG 1980: Somatic hybrid plant of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum* obtained by protoplast fusion. *Physiol. Plant* **48**, S. 225-230 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. ElsevierAmsterdam. S. 337-405
- EWALD, A. 1996: Interspecific hybridization between *Cyclamen persicum* Mill. and *C purpurascens* Mill. Produced by ovule culture, *Euphytica* **82**, S. 31-37
- FAEGRI, K. UND L. VAN DER PIJL 1996: *The principles of pollination ecology*. Toronto: Pergamon Press Limited, S. 13-118
- FOWKE, LC., SM. ATREE, H. WANG UND EC. COCKING 1990: Microtubule organization and cell division in embryogenic protoplast culture white spruce (*Picea glauca*). *Protoplasma* **158**, S. 380-385
- FRYE, L. D. UND M. EDIDIN 1970: The Rapid Intermixing of Cell Surface Antigens After Formation of Mouse-Human Heterokaryons. *Journal of Cell Science* **7**, S. 319-335
- FREARSON, E. M., J. B. POWER UND E. C. COCKING 1973: The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Developmental Biology* **33**, S. 130-137
- FUCHS, R. F. 1997: *Fabulus vandaceaous* intergenerics. *Orchidis* **66**: 350-357
- GAIRI A. UND A. RASHID 2004: TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**, S. 29-33
- GAMBORG, O. L., R. A. MILLER UND K. OJIMA 1968: Nutrient Requirement of Suspension Cultures of Soybean Root. *Cell. Exp. Cell Res.* **50**, S. 151-158
- GAMBORG, O. L., T. MURASHIGE, T. A. THORPE AND, I. K. VASIL 1975: *Plant Tissue Culture Media. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **12**, S. 473-478
- GENOVESI, A. D., W. R. JESSUP, M. C. ENGELKE UND B. L. BURSON 2009: Interploid St. Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze] hybrids recovered by embryo rescue. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **45**, S. 659-666

GEORG, F. E., M. D. PUTTOCK, UND J. H. GEORG 1987: Plant cultuer media. **1**, Exegeties Ltd. Westbury. England.

GIRMEN, M., R. BACKES UND J. GRUNEWALDT 1991: Plant Regeneration from *Brassica oleraceae* var. *Italica* (Broccoli) Protoplasts. Crucifear Newsletter **14 / 15**, S. 104-105 in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.

GLASER, A. UND E. DONATH 1988: Osmotically-induced vesicle-membrane fusion in plant protoplasts. *Studia Biophysica* **127**, S.129–138

GLASER, A. UND E. DONATH 1989: Osmotically-Induced Surface Area Expansion in Oat Protoplasts Depends on the Transmembrane Potential. *Journal of Experimental Botany*. **40** (11), S. 1231-1235

GORDON-KAMM, W. J. UND P. L. STEPONKUS 1984: The influence of cold acclimation on the behavior of the plasma membrane following osmotic concentration of isolated protoplasts. *Protoplasma* **123**, S. 161-173

GOSCH, G., Y. P. S. BAJAJ UND J. REINERT 1975: Isolation, culture and induction of embryogenesis in protoplasts from cell-suspension of *Atropa belladonna*. *Protoplasma* **86**, S. 405-410 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: Plant Tissue culture: Theory and Practice. Elsevier Amsterdam. S. 337-405

GÖNTÉR, I, B. SZARKA, Á. LENDAVI, M. MOLNÁR-LÁNG, S. MÓOROCZ UND D. DUDITS 2002: Problem and possibilities of wheat-maize somatic hybridization. *Acta Biologica Szegediensis* **46** (3-4), S. 11-12

GRAU, J. 2006: Genetik, Kapitel 10: Veränderungen im Genom: Mutationen. S. 369-427.

GRIMES, H. D. UND F. B. WEDY 1985: Intracellulare Calcium and Calmodium Involvement in Protoplast Fusion. *Plant Physiol* **79**, S. 253-258

GROSSER, J. W. UND F.G. GMITTER, N. TUSA, G. REFORGIATO RECUPERO UND P. CUCINOTTA 1996: Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from *citrus* leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Reports* **15**, Nr.9, S. 672-676

GROSSER, J. W. 1994: Observation and Suggestion for improving somatic Hybridisation by Plant Protoplast Isolation, Fusion and Culture. *Hort Science* **29** (11), S. 1241-1243

GROSSER, J. W. UND F.G. GMITTER 1990: Protoplast fusion and *Citrus* improvement, *Plant Breeding Rev* **8**, S. 339-374

GRUNEWALDT, J. 1977: Adventivknospenbildung und Pflanzenregeneration bei *Gesneriaceae* in vitro. *Gartenbauwissenschaft* **42**, S. 171-175

GUAN, Q., Y. GUO, Y. WIE, F. MENG UND Z. ZHANG 2010: Regeneration of somatic hybrids of ginger via chemical protoplast fusion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **102**, Nr. 3, S. 279-274. DOI 10.1007 / s11240-010-9730-8

- GUO, W. W. UND X. X. DENG 2001: Wide somatic hybrids of *Citrus* with its related genera and their potential in genetic improvement. *Euphytica* **118**, S. 175-183
- GUO, S., Q. FALAN, Z. DUANPIN UND L. XINGHUA 2009: Characterization of interspecific hybrids and backcross progenies from a cross between *Oryza minuta* and *Oryza sativa*. *Science in China Series C, Life Sciences* **52**, S. 1148-1155
- GÜREL, S. E. GÜREL UND Z. KAYA, 2002 Protoplast Fusion in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Turk J. Biol* **26**, S. 163-170
- HAHN-HÄGERDAL, B., K. HOSONO, A. ZACHARISSON UND C. H. BORNMAN 1986: Polyethylene glycol and electric field treatment of plant protoplasts: characterization of some membrane properties. *Physiol. Plant* **67**, S. 359-364
- HAHNE, B., J. FLECK UND G. HAHNE 1991: Alginate Embedding Greatly Improves Development of Cereal Mesophyll Protoplasts. *Physiol Plant* **82** (1), S. A6, Abstracts 8<sup>th</sup> Internat. Protoplast Symp. in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- HALL, R. D., C. PEDERSEN UND F. HOFFMANN 1983: Wall formation and Cell Division in Fluorescence Labelled Plant Protoplasts. *Protoplasma* **115**, S. 217-221 in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- HAGMAN, M., MIKKOLA, L. 1963: Observation on cross- self-, and interspecific pollination in *Pinus peuce* Briseb. *Silvae Genetica* **12**, S. 73-79
- HAMBURGER, R., E. AZAZ, UND M. DONBROW 1975: Autoxidation of polyoxyethylenic non-ionic surfactant and polyethylene glycols. *Pharm. Acta Helv* **50**, S. 10-17 in CHAND, K. P., M. R. DAVEY, J. B. POWER UND E. C. COCKING 1998: An Improved Procedure for Protoplast Fusion Using Polyehylen Glycol. *J. Plant Physiol.* **133**, S. 480-485
- HANNING, E. 1904: Zur Physiologie Pflanzlicher Embryonen. I. Über die Kultur von Crucifere- Embryonen außerhalb des Embryosacks. *Bot. Ztg* **62**, S. 45-80.
- HARRISON, C. J., M., MÖLLER UND Q. C. B. CRONK 1999: Evolution and Development of Floral Diversity in *Streptocarpus* and *Sainpaulia*. *Annals of Botany* **84** S. 49-60
- HANSEN, L. N. 1998: Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleraceae* L. and *Camelina sativa* L. *Euphytica* **104**, S. 173-179
- HARMS, CH. T. UND T. POTRYKUS 1978a: Fractionation of Plant Protoplast Types by Iso-osmotic Density Gradient Centrifugation. *Theor. Appl. Genet.* **53**, S. 57-63
- HARMS, CH. T. UND T. POTRYKUS 1978b: Enrichment for Heterokaryotes by the Use of Iso-osmotic Density Gradient after Plant Protoplast Fusion. *Theor. Appl. Genet.* **53**, S. 49-55
- HASTON, E. UND L. P. R. DE CRAENE 2007: Inflorescence and floral development in *Streptocarpus* and *Sainpaulia* (*Gesneriaceae*) with particular reference to the impact of bracteole suppression. *Pl. Syst. Evol* **265**, S. 13-25

- HECKER, R. J. 1963: Use of tetrazolium salts in determining viability of sugar beet pollen. Amer. Soc. Sugar Beet Tech **12** (6), S. 521-528.
- HESLOP-HARRISON, J. UND Y. HESLOP-HARRISON 1970: Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Technology **45**, S. 115-120
- HELLER, F. O. 1973: DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulsphotometrie. Ber. Deutsche Bot. Ges **36**, S. 437-441 in WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- HOMANN, U. 1998: Fusion and fission of plasma-membrane material accommodates for osmotically induced change in the surface area of guard –cell protoplasts. Planta **206**, S. 329-333
- HONJO, R, T. IKEDA, A. TAJI, UND A. URAGAMI 2009: Effects of various sucrose concentration and ancyimidol on shoot elongation and water status of *Asparagus* in vitro. Acta Hort. **829** S. 299–303
- HOSHINO, Y., M. NAKANO UND M. MII 1995: Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Plant Cell Reports **14**, S. 341-344
- HUGHES, 1977: Isolation of protoplasts from haploid plants of African violet. ASB Bull **24**, S. 60-61 in: HOSHINO Y., M. NAKANO, UND M. MII 1995: Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. S. Plant Cell Reports **14**, S. 341-344
- HUGHES, M., M. MÖLLER, D. U. BELLSTEDT, T. J. EDWARDS UND M. WOODHEAS 2004: EST and random genomic nuclear microsatellite markers for *Streptocarpus*. Molecular Ecology Notes **4**, S. 36-40
- HUGHES, M., G. MACMASTER, M. MÖLLER, D. U. BELLSTEDT, AND T. J. EDWARDS 2006: Breeding system of a plesiomorphic floral type: an investigation of small flowered *Streptocarpus* (*Gesneriaceae*) species Pl. Syst. Evol **262**, S. 13–24
- HUETTEMAN, C. A., UND J. E. PREECE 1993: Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **33**, S. 105-119
- IKEDA, T., M. IWAYA-INOUE, T. FUKUYAMA UND H. NONAMI 2000: Trehalose changes hydraulic conductance of tissue cultured soybean embryos. Plant Biotechnol **17**, S. 119-125
- ISHIZAKA, H. UND J. UEMATSU 1995: Interspecific hybridization between *Cyclamen persicum* Mill. and *C purpurascens* Mill. Plant Breeding **115**, S. 162-166
- ISHIZAKA, H. 1996: Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* and *C. graecum*. Euphytica **91**, S. 109-117

- JAIN, R. K., G. S. KHEVA, S. H. LEE, N. W. BLACKHALL, R. MARCHANT, M. R. DAVEY, J. P. POWER, UND E. C. COOKING 1995: An improved procedure for plant regeneration from indica and japonica rice protoplasts. *Plant Cell Reports* **14**, S. 515-519 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405
- JO, C. H., O. S. AN, M. J. KIM UND K. S. MIN 1977: Studies on intergeneric hybridization in cereals. I. The effect of EACA on hybrid grain formation in intergeneric crosses among cereals. - *Korean J. Breeding* **9**, 65-71. in: *Plant Breeding Abstracts* **49**, S.199.
- JAUSSI, CH. 2005: *Biochemie. Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten* 2005. ISSN 0937-7433 Springer Lehrbuch
- JONG, K. 1973: *Streptocarpus (Gesneriaceae)* and the phyllomorph concept (Abstract.). *Acta Bot. Neerl* **22** (3), S. 224
- JONG, K. 1978: Phyllomorphic organisation in rosulate *Streptocarpus*. *Notes Roy. Bot. Gards. Edinburgh* **36** (2), S. 369-396
- JONG, K. UND M. MÖLLER 1999: New chromosome counts in *Streptocarpus (Gesneriaceae)* from Madagascar and the Comoro Islands and their taxonomic significance. *Plant Syst. Evol.* **224**, S. 173-182
- KADISH, J. UND K. M. WENC 1983: Kontamination of Polyethylen glycol with aldehydes: Implications for hybridoma fusion. *Hybridoma* **2**, S. 87-89
- KANCHANAPOOM, K. UND W. F. BOSS 1986: Osmoregulation of fusogenic protoplast fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **861**, S. 429-439
- KANTA, K., N. S. RANGASWAMY, P. MAHESHWARI 1962: Test-tube fertilization in flowering plant. *Nature* **194**, S. 1214-1217. in: REINERT, J. UND Y. P. S. BAJAI 1977: *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* S. 412-464
- KANTA, K., P. MAHESHWARI 1963: Test-tube fertilization in some angiosperms. *Phytomorphology* **13**, S. 230-237: In REINERT, J. UND Y. P. S. BAJAI, 1977: *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* S. 412-464
- KAO, K. N. UND M. R. MICHAYLUK 1974: A Method for High-frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplast. *Planta (Berl.)* **115**, S. 355-367
- KAO, K. N., F. CONSTABLE, M. R. MICHAYLUK UND O. L. GAMBURG 1974: Plant protoplasts fusion and growth of intergeneric hybrid cell. *Planta (Berl.)* **120**, S. 215-227
- KAO, K. N. UND M. R. MICHAYLUK 1975: Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* **126**, S. 105-110
- KAO, K. N., L. R. WETTER 1977: Advances in techniques of plant protoplast fusion and culture of heterocaryocytes. *Internat. Cell Biol.* (ed. B.R. BRINKLEY UND K.R. PORTER) S. 216-224. *Internat. Congr. on Cell Biology*, Boston Mass. In: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405

KARAMIAN R., M. RANJBAR 2008: Efficient somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Crocus sativus* L. ISHS Acta Horticulturae **850**, (Abstract)

KARESCH, H., R. BILANG UND I. POTRYKUS 1991: *Arabidopsis thaliana*: Protocol for Plant Regeneration from Protoplasts. Plant Cell Reports **9**, S. 575-578 in WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.

KARP, G. 2005: Molekulare Zellbiologie Struktur und Funktion der Plasmamembran Aus dem Amerikanischen übersetzt von KURT BEGINNEN, SEBASTIAN VOGEL UND SUSANNE KUHLMANN-KRIEG, Springer-Lehrbuch

KHATUM, S. UND FLOWERS T.J. 1995: The estimation of pollen viability in rice. J Exp Bot **46**, S.151-154

KAUSCHMANN, A., A. JESSOP, C. KONCZ, M. SZEKERES, L. WILLMITZER UND T. ALTMANN 1996: Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. Plant Journal **9**, S. 701-713 in OH. M.H., S.D. CLOUSE 1998: Brassinolide affects the rate cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. Plant Cell Reports **17**, S. 921-924

KAZUMITSU, M., A. D. VILARINHOS UND S. OKA 2002: Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts. Euphytica **125**, S. 317-324

KELL, A. UND R. W. GLASER 1993: On the mechanical and dynamic properties of plant cell membranes: Their role in growth, direct gene and protoplast fusion. J. Theor. Biol **160**, S. 41-62

KELLER, W. A. UND G. MELCHERS 1973: The Effekt of High pH and Calcium on Leaf Protoplast Fusion. Z. Naturforsch. **28 c**, S. 737-741

KENT, N. F UND R.A. BRINK 1947: Growth in vitro of immature *Hordeum* Embryos. Science **106**, S. 547-548

KISAKA, H., H. LEE, M. KISAKA, A. KANNO, K. KANG UND T. KAMEYA 1994: Production and analysis of asymmetric hybrid plants between a monocotyledon (*Oriza sativa* L.) and a dicotyledon (*Daucus carota*). Theor Appl Genet **89**, S. 365-371

KIRICENKO IV 1990: Zlittia individualnñh par preselektovanih protoplastiv tiutiunu za dopomogoiu elektricinogo polia. Dokl. A.N. URSR. Ser. B. Geol., Him. Ta Biol. Nauki 6: 71-74 in: RÁKOSY-TICAN LENUTA, MARIA HORNOK UND LÁSZLO MENCZEL 2001: An improved procedure for protoplast microelectrofusion and culture of *Nicotiana tabacum* intraspecific somatic hybrids: plant regeneration and initial proofs on organelle segregation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **67**, S. 153-158

KHALEQUZZAMAN, M. UND N. HAQ 2004: Isolation and in vitro fusion of egg and sperm cells in *Oryza sativa*. Plant Physiology and Biochemistry **43**, S. 69-75

KRANZ, E. UND S. SCHOLTEN 2008: In vitro fertilization: analysis of early post fertilization development using cytological and molecular techniques. Sex Plant Reprod **21**, S. 67-77  
DOI 10.1007/s00497-007-0060-x

- KRIEBEL, H. B. 1972: Embryo development and hybridity barriers in the white pines (section *Strobus*). *Silvae Genetica* **21**, S. 39-44 in: REINERT, J. UND Y. P. S. BAJAI, 1977: *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. S. 412-464
- KRUSE, A. 1974: 2,4-D treatment prior to pollination eliminates the haplontic (gametic) Sterility in wide intergeneric crosses with 2-rowed barley, *Hordeum vulgare* ssp. *distichmn*, as maternal species. *Hereditas*, **78**, S. 319-322.
- KUNITAKE H. UND M. MII 1990: Plant regeneration from cell culture-derived protoplast of static (*Limonium Perezii* Hubbard). *Plant Sci.* **70**, S. 115-119 in HOSHINO Y., M. NAKANO UND M. MII 1995: Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. S. *Plant Cell Reports* **14**, S. 41-344
- KÜSTER, E. 1909: Über die Verschmelzung nackter Protoplasten. *Bar. Deut. Botan. Ges.* **27**, S. 589-598
- KYOZUKA, J., Y. HAYASHI UND K. SHIMAMOTO 1987: High frequency plant regeneration from rice protoplasts by noval nurse culture methods. *Mol. Gen. Genet.* **206**, S. 408-413
- LAI, A., D. CHIARETTI, P. MINI, M. E. BITTI UND P. CRINO 1990: Parameters influencing embryo rescue in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum*). *Eucarpia Tomato* **90**, in: SHARMA, D. R., R. KAUR UND K. KUMAR, 1996: Embryo rescue in Plants-a review. *Euphytica* **89**, S. 325-337
- LAIBACH, F. 1925: das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Z. Bot.* **17**, S. 417-459 in: SHARMA, D. R., R. KAUR UND K. KUMAR, 1996: Embryo rescue in Plants-a review. *Euphytica* **89**, S. 325-337
- LAMMERTS, W. E. 1942: Embryo culture an effective technique for shortening the breeding cycle of deciduous trees and increasing germination of hybrid seed. *Am. J. Bot* **29**, S. 166-171
- LAN, T. H., CH. G. COOK UND A. H. PATERSON 1992: Identification of a RAPD marker linked to a male fertility restoration gene in cotton. Department of Soil and Crop Sciences, Texas A und M University, College Station, TX
- LAWRENCE W. J. C. 1940: The genus *Streptocarpus*. *J. Roy. Hort. Soc.* **65**, S. 17-22
- LEE, Y. H., S. M. WONG, W. K. TAN UND C. J. GOH, 1996: Breeding vandaceous orchids for commercial cut flowers in Singapore: an overview. *Euphytica* **89**, S. 31-37
- LEE, C., K. PEAK, J. HWANG, C. H. LEE, K. Y. PEAK UND J. K. HWANG 1994: Production and characterization of putativ intertribal somatic hybrids between *Salpiglossis* and *Petunia*. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* **35**, S. 360-369
- LENUTA, R., M. HORNOK UND L. MENCZEL 2001: An improved procedure for protoplast microelectrofusion and culture of *Nicotiana tabacum* intraspecific somatic hybrids: plant regeneration and initial proofs on organelle segregation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**, S. 153-158
- LI, Z., L. PINKHAM, N. FAITH, C. ANA, C. ESPINOSA UND R. CONEV 2009: Development of triploid daylily (*Hemerocallis*) germplasm by embryo rescue. *Euphytica* **169**, S.313-318

LIU, B., M. XING, Z. H. ZHANG, M.Y. HE, S. HAO, D. F. GU, R. ZHAO UND X. K. WU 1995: Intergeneric somatic hybrid plants of *Nicotiana tabacum* L. and *Lycium barbarum* L. by protoplast electrofusion. *Acta. Bot. Sin* **27**, S. 207-209

LIU B., Z. L. LIU, X. W. LI 1999: Production on a highly asymmetric somatic hybrid between rice and *Zizania latifolia* (Griseb): evidence for inter-genomic exchange. *Theor Appl Genet* **98**, S. 1099-1103

LIU, J., X. ZHANG, B. K. POUJIAL, Y. ZHANG, Z. JIAO, J. QI 2009: Adventitious shoot regeneration from the leaves of in vitro grown 'Zhongli pear (*Pyrus spp.*) *Front. Agric. China.* **3** (1), S. 60–66

LIU J., X. XI UND X. DENG 2005: Intergenic somatic hybridization and its application to crop genetic. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **82**, S. 19-44

LU, C-Y 1993: The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **29P**, S. 92-96  
in: NAKANO M., K. HOSOKAWA, T. OOMIYA UND S. YAMAMURA 1995: Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana* by embedding protoplasts in gellan gum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **41**, S. 221-227

MAHESHWARI, P. UND K. KANTA, 1964: Control of fertilization. in: REINERT, J. UND Y. P. S. BAJAI 1977: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* S. 412-464

MAHESHWARI, S. C., R. GILL., N. MAHESHWARI, UND P. K. GHARYAL 1986: Isolation and Regeneration of Protoplasts from Higher Plants. S. 2-36 in REINERT, J. UND H. BINDING (Hrsg.): *Results and Problems in Cell Differentiation* **12**, Springer Verlag Berlin in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.

MARCHANT, R., M. R. DAVEY UND J. B. POWER 1997: Isolation and Culture of mesophyll protoplasts from *Rosa hybrida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **50**, S. 131-134

MCDADE, L. A. 1986: Protandry, synchronized flowering and sequential phenotypic unisexuality in neotropical *Pentagonia macrophylla* *Oecologia* (Berlin) **68**, S. 218-223

MELCHERS, G. UND G. LABIB 1974: Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. *Mol. Gen. Genet* **135**, S. 277-294 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice.* Elsevier Amsterdam. S. 337-405

MELCHERS, G. 1977: Microbial techniques in somatic hybridization by fusion of protoplasts: in BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice.* Elsevier Amsterdam. S. 337-405

MENCZEL L. UND K. WOLFE 1984: High frequency of fusion induced in freely suspended protoplast mixtures by polyethylene glycol and dimethylsulfoxide at high pH. *Plant Cell Reports* **3**, S. 196-198

MERCER, W. E. UND R. A. SCLEGEL 1979: Phytohemagglutamin enhancement of cell fusion reduces polyethylenglycol cytotoxicity. *Exp Cell Res* **120**, S. 417

- MEYER, K. H.: Natural and synthetic high polymers. New York: Interscience 1952, S. 245-247 in KAO, K.N. UND M. R. MICHAYLUK, 1974: A Method for High-frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplast. *Planta (Berl.)* **115**, S. 355-367
- MILLER, R. A., O. L. GAMBORG, W. A. KELLER UND N. K. KAO 1971: Fusion and adhesion of nuclei in multinucleated soybean protoplasts. *Can.J. Genet. Cytol* **13**, S. 347-353 in: BHOJWANI, S. S. AND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405
- MOTTLEY, J., YOKOYA, K., MATTHEWS, D., SQUIRRELL, J. UND WENTWORTH, J.E. 1996: Protoplast fusion and its potential role in the genetic improvement of Roses. *Acta Hort. (ISHS)* **424**, S. 393-398
- MOTOYOSHI, F 1971; Protoplast isolation from callus cells of maize endosperm: formation of multinucleate protoplasts and nuclear division. *Exp. cell Res* **68**, S. 452-456
- MÖLLER, M. 1984: Art- und Gattungskreuzungen bei *Gesneriaceae*, Diplomarbeit Züchtung, Fachhochschule Osnabrück
- MÖLLER, M. UND Q. C. B. CRONK 1997: Origin and relationships of *Saintpaulia* (*Gesneriaceae*) based on ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) Sequences. *American Journal of Botany* **84** (7), S. 956-965
- MÖLLER, M. UND Q. C. B. CRONK 1999: New approaches to the systematics of *Saintpaulia* and *Streptocarpus*. In: Andrews, S., A. C. Leslie and C. Alexander (Editions). *Taxonomy of Cultivated Plants: Third International Symposium*. S. 253-264
- MÖLLER, M., M. CLOKIE, P. CUBAS UND Q. C. B. CRONK 1999: Integrating molecular phylogenies and developmental genetics: a *Gesneriaceae* case study. *Molecular Systematics and Plant Evolution*, S. 375-402
- MÖLLER, M. UND Q. C. B. CRONK 2001a: Phylogenetic studies in *Streptocarpus* (*Gesneriaceae*): reconstruction of biogeographic history and distribution patterns. *Syst. Geogr. Pl.* **71**, S. 545-555
- MÖLLER, M. UND Q. C. B. CRONK 2001b: Evolution of morphological novelty: A phylogenetic analysis of growth patterns in *Streptocarpus* (*Gesneriaceae*). *Evolution* **55** (5), S. 918-929.
- MURASHIGE, T. UND F. SKOOG 1962: A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant* **15**, S. 473-497
- NAKANO, M. UND M. MII 1992a: Somatic hybridization between *Dianthus chinensis* and *D. barbatus* through protoplast fusion. *Theor Apple Genet* **86**, S: 1-5
- NAKANO, M. UND H. MII 1992b: Interspecific somatic hybridization in *Dianthus*: selection of hybrids by use of iodoacetamid inactivation and regenerationability. *Plant Science*, **88**, S: 203-208
- NAKANO M., K. HOSOKAWA, T. OOMIYA UND S. YAMAMURA 1995: Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana* by embedding protoplasts in gellan gum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **41**, S. 221-227

- NAKANO, M., Y. HOSHINO UND M. MII 1996: Intergeneric somatic hybrid plantlets between *Dianthus barbatus* and *Gyposophyla paniculata* obtained by electrofusion. *Theor Appl Genet* **92**, S. 170-172
- NAKANO, M., Y. HOSHINO UND M. MII 2001: Somatic hybridization in *Dianthus* Species. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **49**, S. 278-291
- NAKAJIMA N, A. SHIDA, S. TOYAMA 1996: Effect of Brassinolid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. *Jpn J Crop Sci* **65**, S. 114-118 in: OH. M.-H, S.D. CLOUSE 1998: Brassinolide affects the rate cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports* **17**, S. 921-924
- NAUMANN, I. 1994: Zur Fusion von Protoplasten aus *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. und *Episia spec.* Diplomarbeit, Universität Hannover, Fachbereich Gartenbau
- NAYLOR, E. E. UND B. JOHNSON 1937: A Histological study of vegetative reproduction in *Sainpaulia ionantha*. *American journal of Botany* **24**, S. 673-678
- NIEDZ, R. P. 1993: Culturing embryogenic protoplasts of „Hamlin“sweet orange in calcium alginate beads. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **34**, S. 19-25
- NIMURA, M., J. KATO, M. MII UND K. MORIOK 2003: Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus japonicus* Thumb. *Theor. Apple. Genet* **106**, S. 1164-1170
- NORTON, RB 1966: Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. *Am Soc Hortic Sci* **89**, S. 132-134
- OCHATT, S., P. DURIEN, L. JACAS UND C. POTÉCAILLE, 2001: Protoplast, cell and tissue cultures for the biotechnological breeding of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Lathyrus Lathyrism*. Newsletter **2**, S. 35-38
- OEHLERS, F. 1964: Cytoplasmic inheritance in the genus *Streptocarpus*. *Adv. Genet* **12**, S. 329-370 in: MÖLLER, M. 1984: Art- und Gattungskreuzungen bei *Gesneriaceae*, Diplomarbeit Züchtung, Fachhochschule Osnabrück
- OH. M.-H, UND S.D. CLOUSE 1998: Brassinolide affects the rate cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports* **17**, S. 921-924
- OLIVARES-FUSTER, O., N. DURAN-VILA, UND L. NAVARO, 2005: Electrochemical protoplast fusion in *Citrus*. *Plant Cell Reports* **24**, S. 112-119
- OKA, S. UND K. OHYAMA 1985: Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Broussonetia kazinoki* Sieb. *J. Plant Physiol* **119**, S. 455-460 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405
- OTONI, W.C., N. W. BLACKHALL, F. B. UTRA VAZ, V. W. CASALI, J. B. POWER UND M. R. DAVEY 1995: Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnata* L. *Oxford Journals, Journal of Experimental Botany* **46** (7), S. 777-785

PANDA, B. S. UND V. J. RAO, 1970: Inactivation of incompatibility in *Guizotia abyssinica* following UV irradiation and hot water treatment. *Genetica Iberica* **22**, S. 61-66.

PATIP, K., M. SHARMA, P. S. AHUJA 2008: Rose protoplast isolation and culture and heterokaryon selection by immobilization in extra thin alginate film. *Protoplasma* **233**, S. 165-171

PESTANA, C., C. LACORTE, V. G. DEFREITAS, D. E. DE OLIVEIRA, UND E. MANSU 1999: In vitro regeneration of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) through organogenesis: Effect of culture temperature and silver. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **35**, S. 214-216

POWER, J.B., S. E. CUMMINES UND E.C. COCKING 1970: Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature*, **225**, S. 1016-1018 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405

POWER, J.B., S. F BERRY, J. V. CHAPMAN UND E.C. COCKING 1980: Somatic hybridization of sexually incompatible petunias: *Petunia parodii*, *Petunia parviflora*. *Theor. Appl. Genet* **57**, S. 1-4

RAGHAVAN, V. 1977: Applied Aspects of Embryo Culture In: *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Edited by J. REINERT UND Y. P. S. BAJAJ. Springer Verlag. S. 375-397

RÁKOSY-TICAN LENUTA, MARIA HORNOK UND LÁSZLO MENCZEL 2001: An improved procedure for protoplast microelectrofusion and culture of *Nicotiana tabacum* intraspecific somatic hybrids: plant regeneration and initial proofs on organelle segregation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**, S. 153–158

RANGASWAMY, N. S., UND K. R SHIVANNA 1967: Induction of gametic compatibility and seed formation in axenic culture of a diploid self-incompatible species of *Petunia*. *Nature* **16**, S. 937-939

RANGASWAMY, N. S. UND K. R. SHIVANNA, 1971: Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris* (Lam.) B. S. P II. Placenta Pollination in vitro. *J. Indian. Botan. Soc* **50A**, S. 286-296

RANGASWAMY, N. S., 1977: Applications of in vitro Pollination and in vitro Fertilization in: REINERT, J. UND Y. P. S. BAJAI 1977: *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. S. 412-425 Springer Verlag

RAVEH, D., E. HUBERMAN UND E. GALUN 1973: In vitro culture of tobacco protoplasts: use of feeder techniques to support division of cells plated at low densities: *In Vitro*, **9**, S. 216-222 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405

REINERT, J. UND Y. P. S. BAJAI 1977: *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Springer Verlag. S. 412-488

RENNER, O.:1914,:Befruchtung und Embryobildung bei *Oenothera lamarkiana* und einige verwandten Arten. *Flora* **107**, S. 115-150 in: REINERT, J. UND Y. P. S. BAJAI 1977: *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. S. 412-464 Springer Verlag

- RETHMEIER, N. O. M., C. E. JANSEN, E. A. M. SNEL, H. J. J. NIJKAMP, UND J. HILLE 1990: Improvement of regeneration of *Lycopersicon pennellii* protoplasts by decreasing ethylene production. *Plant Cell Reports* **9**, S. 539-543
- REUSTLE, G. M. 1989: Untersuchung zur Protoplastenkultur und zur somatischen Embryogenese bei Reben. Dissertation, Universität Stuttgart-Hohenheim in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- RIETSEMA, J., S. SATINA, 1959: Barriers to crossability: Post-fertilization in: REINERT, J. UND Y. P. S. BAJAI 1977: *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, S. 412-464 Springer Verlag
- RODRIGUEZ I. FERNANDO, JEFFREY J. ESCH, ANNE E. HALL, BRAD M. BINDER, G. ERIC SCHALLER AND ANTHONY B. BLEECKER 1999: A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* **283**, S. 996-998
- RODRIGUEZ-RIANO, T. UND A. DAFNI, 1999: A new procedure to asses pollen viability. *Plant Cell Repots* **12**, S. 241-244,
- ROGER, D., A. DAVID AND H. DAVID 1996: Immobilization of Flax Protoplasts in Agarose and Alginate Beads. *Plant Physiol* **112**, S. 1191-1199
- ROTH, PS., TJ. BACH, MJ. THOMPSON 1989: Brassinosteroides: Potent inhibitors of transformed tobacco callus culture. *Plant Sci* **59**, S. 63-70 in: OH. M.-H, S.D. CLOUSE 1998: Brassinolide affects the rate cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Repots* **17**, S. 921-924
- RUSSEL, J. A. UND B. H. MCCOWN 1986: Culture and regeneration of Populus leaf protoplast isolated from non-seedling tissue. *Plant Sci* **46**, S. 133-142
- SALA, C. UND F. SALA 1985: Effect of brassinosteroid on cell division and enlargement in culture carrot (*Daucus carota* L.) cells. *Plant Cell Reports* **4**, S. 144-147
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS T. (1989), *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed., B.23, p. 6.7, Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratories
- SAN MARTIN-GAJARDO, I. UND M. SAZIMA 2004: Non-Euglossine Bees also function as Pollinators of *Sinningia* Species (*Gesneriaceae*) in Southeastern Brazil. *Plant Biology* **6**, S. 506–512
- SANKHLA, D., N. SANKHLA UND T. D. DAVIS 1995: Promotion of *in vitro* shoot formation from excised roots of silk tree (*Albizia julibrissin*) by an oxime ether derivative and other ethylene inhibitors. *Plant Cell Reports* **15**, S.143–146
- SCARANO M. T., L. ABBATE, S. FERRANTE, S. LUCETTI UND N. TUSA 2002: ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Reports* **20**, S.1162–1166
- SCHAFFLER, E. UND H. U. KOOP, 1990: Single cell nurse culture of tobacco Protoplasts: physiological analysis of conditioning factors. *J. Plant Physiol.*, **137**, S. 95-101

- SCHMIDT-LEBUHN, A. N., J. FUCHS UND M. KESSLER 2008: Flow cytometric measurements do not reveal different ploidy levels in *Minthostachys* (*Lamiaceae*) *Pl Syst* **271**, S. 123–128
- SCHNABLE, H., R. YOUNGMAN UND U. ZIMMERMANN 1983: Maintenance of Plant Cell Membrane Integrity and Function by the Immobilisation of Protoplasts in Alginate. *Planta* **158**, S. 392-397 in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Universität Hannover.
- SCHOPFER, W. H. 1943: Plants and Vitamins. *Chronica Botanica Co.*, Waltam in: SHARMA, D.R., R. KAUR UND K. KUMAR 1996 In: Embryo rescue in Plants-a review. *Euphytica* **89**, S. 325-337
- SCHUM, A. UND K. HOFMANN 2001: Use of isolated protoplasts in rose breeding. *Acta Hort.* **547**, S. 35-44
- SCHUM, A., K. HOFMANN, N. GHALIB UND A. TAWIFIK 2001: Factors affecting protoplast isolation and plant regeneration in *Rosa* spp. *Gartenbauwissenschaft*, **66** (3), S. 115-122
- SCHUM, A., K. HOFMANN UND R. FELTEN 2002: Fundamentals for integration of somatic hybridization in Rose breeding. *Acta Hort.* **572**, ISHS, S. 29-36
- SCOTT, K. J., J. C. CHIN UND C. J. WOOD 1978: Isolation and culture of cereal protoplasts, In: *Proc Symp. Plant Tissue Culture*. Science Press, Peking, S. 293-315 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405
- SENKTLER, M 1970: Test-Tube Fertilization of Ovules in *Melandrium album* Mill. with Pollen Grains of *Datura stramonium* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **26** (6), S. 661-662
- SERPERSU, E. H., K. KINOSITA, JR. UND T. Y. TSONG 1985: Reversible and irreversible modification of erythrocyte membrane permeability by electric field. *Biochimica et Biophysica Acta* **812**, S.779-785
- SHARMA, D. R., R. KAUR, UND K. KUMAR 1996: Embryo rescue in Plants-a review, Department of Biotechnology; Department of Fruit Breeding, University of Horticulture and Forestry, *Euphytica* **89**, S. 325-337
- SHASANY, A. K., M. P. DAROKAR, S. DHAWAN, A. K. GUPTA, S. GUPTA, A. K. SHUKLA, N. K. PATRA, UND S. P. S. KHANUJA 2005: Use of RAPD and AFLP Markers to Identify Inter- and Intraspecific Hybrids of *Mentha*. *Journal of Heredity* **96** (5), S. 542-549
- SHEPARD, J. F., D. BIDNEY, T. BARBY, R. KEMBEL 1983: Genetic transfer in plant through interspecific protoplasts fusion. *Science* **219**, S. 283-688 in: BINSFELD P.C., H. SCHNABEL 2002: Molekular and cytogenetic constitution of plants obtained via two different somatic hybridization methods. *Plant Cell Reports* **21**, S. 58-62
- SHILLITO, R. D., J. PASKOWSKI, UND I. POTRYKUS 1983: Agarose Plating and a Bead Type Culture Technique Enable and Stimulate Development of Protoplast-Derived Colonies in a Number of Plant Species. *Plant Cell Reports* **2**, S. 244-247

- SHIMIZU K., Y. MIYABE, H. NAGAIKE, T. YABUYA UND T. ADACHI 1990: Production of somatic hybrid plant between *Iris ensata* Thunb. and *I. germanica* L. *Euphytica* **107**, S. 105-113
- SIHACHAKR D UND G. DUREUX 1987: Cultural behavior of protoplasts from different organs of eggplant (*Solanum melongena* L.) and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* **11**, S. 179-188
- SINGER S. J. UND G. L. NICOLSON (1974) In: KARP, GERALD 2005: Molekulare Zellbiologie Struktur und Funktion der Plasmamembran Aus dem Amerikanischen übersetzt von KURT BEGINNEN, SEBASTIAN VOGEL UND SUSANNE KUHLMANN-KRIEG, Springer-Lehrbuch
- SMIDSRØD, O. UND G. SKJÅK-BÆK 1990: Alginate as Immobilization Matrix for Cells. *Trends in Biotechn.* **8**, S. 71-78 in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- SMITH, P. G. 1944: Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **44**, S. 413-416
- SMITH, J. F., J. 1996: Tribal Relationships Within *Gesneriaceae*: a Cladistic Analysis of Morphological Data. *Systematic Botany* **21** (4), S. 497-513
- SMITH, J. F., J. C. WOLFRAM, K.D. BROWN, C. L. CARROLL UND D.S. DENTON 1997: Tribal relationship in the *Gesneriaceae*: Evidence from DNA sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84** (1), S. 49-66
- SMITH, J. F., J. C. WOLFRAM, K. D. BROWN, C. L. CARROLL UND D. S. DENTON 1998: A Cladistic analysis of *ndhF* sequences from representative species of *Sainpaulia* and *Streptocarpus* subgenera *Streptocarpus* and *Streptocarpella* (*Gesneriaceae*). *EDINB. J. BOT.* **55** (1), S. 1-7
- STETTLER, R. F. 1968: Irradiated mentor pollen: Its use in remote hybridization of black cotton-wood. *Nature* **219**, S. 746-747.
- SQUIRREL J., Z. MANDEGARAN, K. YOKOYA, A.V. ROBERTS UND J. MOTTLEY, 2005: Cell lines plant obtained after protoplast fusion of *Rosa* + *Rosa*, *Rosa* + *Prunus* and *Rosa* + *Rubus*. *Euphytica* **146**, S. 223-231
- SVOBODA, A. UND P. OUREDNIČEK 1990: Yeast protoplasts immobilized in alginate: Cell wall regeneration and reversion to cells. *Current Microbiology.* **20** (5), S. 335-338
- SUGAR I. P., W. FORSTER UND E. NEUMANN 1987: Model of cell electrofusion: Membrane electroporation, pore coalescence and percolation. *Biophys. Chem.* **26**, S. 321-335
- TAGUCHI, T., K. SAKAMOTO UND M. TERADA 1993: Fertile somatic hybrids between *Petunia hybrida* and a wild species, *Petunia variabilis*. *Theor Appl Genet* **87**, S. 75-80
- TAKEBE, I., Y. OTSUI, Y. HONDA, T. NISHIO UND C. MATSUI 1973: Fine Structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Planta* **113**, S. 21-27

- TAMURA N., Y. MURATA, T. MUKAIHARA 2002: A somatic hybrid between *Solanum integrifolium* and *Solanum violaceum* that is resistant to bacterial wilt caused by *Ratstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports* **21**, S. 353-358
- THIEME ROMANO, U. DARSOW, T. GAVRILENKO, D. DOROKHOV UND H. TIEMANN 1997: Production of somatic hybrids between *S. tubercum* L. and the blight resistant Mexican wild potato species. *Euphytica* **97**, S. 189-200
- TRICOLI, D. M., M. HEIN UND M. G. CARNES 1986: Culture of soybean mesophyll protoplasts in alginate beads. *Plant Cell Reports* **5**, S. 334-337
- TUKEY, H. B. 1933: Artificial culture of sweet cherry embryos. *J. Hered.* **24**, S. 7-12
- TUKEY, H. B. 1938: Growth Patterns of plant development from immature embryos in artificial culture. *Bot. Gaz* **99**, S. 630-665
- TUSA, N., G. FERRAUTO UND E. CALDERARO 1992: Investigation on protoplast regeneration from leaves of monoembryonic and polyembryonic *Citrus* species. *Proc. Int. Soc. Citriculture* S. 180-182 in: GUO W.W. UND X.X. DENG 2001: Wide somatic hybrids of *Citrus* with its related genera and their potential in genetic improvement. *Euphytica* **118**, S. 175-183
- UCHIUMI, T., I. UEMURA, T. OKAMOTO 2007: Establishment of an in vitro fertilization system in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **226**, S. 581-589
- UPADHYA, M. D. 1975: Isolation and culture of mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Res.* **18**, S. 438-445 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Amsterdam. S. 337-405
- VAN LAERE K., L. LEUS, J. VAN HUYLENBROECK, E. VAN BOCKSTAELE 2009: Interspecific hybridisation and genome size analysis in *Buddleja*. *Euphytica* **166**, S.445-456
- VAN TUYL, J. M., M. FRANKEN, C. JONGERIUS, C. A. M. LOCK UND A. A. M. KWAKKENBOS, 1986: Interspecific hybridization in *Lilium*. *Acta Horticulture* **177**, S. 591-595
- VAN TUYL, J. M., J. B. M. CUSTERS, L. W. D. VAN RAAMSDONK UND A. A. M. KWAKKENBOS 1987: Embryo culture as an aid in overcoming hybridization barriers between sections in *Lilium*. *Acta Bot. Neerl* **36**, S. 138
- VAN TUYL, J. M., T. P. STRAATHOF, R. J. BINO UND A. A. M. KWAKKENBOS, 1989: Effect of three pollination methods on embryo development and seedset in intra and interspecific crosses between seven *Lilium* species. *Sex Plant Reprod.* **1**, S. 119-123
- VAN TUYL, J. M., M. P. VAN DIEN, M. G. M. VAN CREIJ, T. C. M. VAN KLEINWEE, J. FRANKEN UND R. J. BINO 1991: Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci* **74**, S. 115-126
- VAN TUYL, J. M. UND L. KI-BYUNG 2004: Interspecific Hybridisation and Polyploidisation as Tools in Ornamental Plant Breeding. *Horticulturae*, Number **612**, S.13-22

- VAN WYK G. 1977: Pollen handling, controlled pollination and grafting of *Eucalyptus grandis*. S. Afr. For. J. **101**, S. 47–53
- VASIL, V., F. REDWAY UND I. K. VASIL 1990: Regeneration of Plant from Embryogenic Suspension Culture Protoplasts of Wheat (*Triticum aestivum*). Bio / Technol. **8**, S. 429-434.
- VERVAEKE, I., E. LONDERS, R. DEROOSE, M. P. DE PROFT 2002: In Vitro Pollination and Fertilization in *Bromeliaceae* 2002. Acta Horticulturae, **572**, S. 23-26
- VELÁZQUEZ T. JUAN FRANCISCO ORNELAS 2010: Pollen consumption by flower mites in three hummingbird-pollinated plant species: *Moussonia deppeana* (Gesneriaceae), *Lobelia laxiflora* and *L. cardinalis* (Lobeliaceae). Exp Appl Acarol **50**, S. 97–105
- VIENKEN J., U. ZIMMERMANN, R. GANSER UND R. HAMP 1983: Vesicle formation during electrofusion of mesophyll protoplasts of *Kalanchoe diargremontiana*. Planta **157**, S. 331-335
- VIŽINTIN, L. UND B. BOHANEK, 2004: In Vitro Manipulation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Pollen and Microspores, Isolation Procedures, Viability Tests, Germination, Maturation, Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica **46**, S. 177-183
- VOLKER, P.W, UND R. K. ORME 1998: Provenance trials of *Eucalyptus globules* and related Species in Tasmania. Aust. For. **51** (4), S. 257-265 in: VAN TUYL, J. M. UND K. LIM: Interspecific Hybridisation and Polyploidisation as Tools in Ornamental Plant Breeding. Horticulturae, **612**, S. 13-22
- WATKINS, R. E. UND B. C. CURTIS 2005: A staining technique for determining wheat pollen viability. [www.shigen.nig.ac.jp/wheat/wis/No26/p1/1.html](http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/wis/No26/p1/1.html)
- WALTER, K. S. UND H. J. GILLET 1998: Red list of threatened plants. **862**. IUCN, the World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK
- WANG, H., G. P. SLATER, L. C. FOWKE, M. SALEEM UND A. J. CUTLER 1991: Comparison of Cell Wall Regeneration on Maize Protoplasts Isolated from Leaf Tissue and Suspension Culture Cells. In vitro Cell. Dev. Biol. **27** P, S. 70-76 in WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- WANG, J., L. HUANG, M. BAO, G. LIU 2009: Production of interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. lophophorum* var *linearifolium* via ovule culture at early stage. Euphytica **167** S. 45–55
- WANGLER, N., O. BRETT, M. LAUFER, M. STRABER, M. DAUB, R. ZENGERLE UND J. STEIGERT, 2009: Gezielte chemische Stimulation einzelner Tabak Protoplasten mittels hochaufgelöster Wirkstoffabgabe. MikroSystemTechnikKongress. Berlin (Abstract)
- WEBB, M. S. UND J. P. WILLIAMS 1984: Changes in the lipid and fatty a composition of *Vicia faba* mesophyll protoplasts induced by isolation. Plant Cell Physiol. **25**, S. 1541-1550
- WEBB, C. J. UND P. E. PEARSON 1993: The evolution of approach herkogamy from protandry in New Zealand *Gentiana* (Gentianaceae) P1. Syst. Evol. **186**, S. 187-191

- WEIGEND, M. UND T. J. EDWARDS, 1996: The palynology of *Streptocarpus* and the other African and Malagasy *Gesneriaceae* and its systematical implications. Bot. Jahrb. Syst. **118**, S. 59-80
- WENDLAND, H. 1893: *Saintpaulia ionantha*. Gartenflora **42**, S. 320-324, in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- WERNER, M., B. NATON, UND R. HAMPP 1990: Determination of physical membrane properties of plant cell protoplasts via the electrofusion technique: Production of optimal fusion yields and protoplast viability. Plant Cell Reports **8**, S. 687-691
- WETTER, L. UND J. DICK 1983: Isoenzyme analysis of cultured cells and somatic hybrids. in: NAKANO, M., Y. HOSHINO UND M. MII 2001: Somatic hybridization in Dianthus Species. Biotechnology in Agriculture and Forestry, **49**, S. 278-291
- WIDHOLM J. M. 1972: The use of Fluorescein Diacetate and Phenosafranine for Determining Viability of Cultured Plant Cell. Stain Technol **47** (4), S. 189-194 in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- WIEJACHA, K., S. PLUTA, A. GOLIS, T. ORLIKOWSKA 2001: Investigation on molecular markers for characterization of parental genotypes used in Ribes sexual hybridization. ISHS Acta Horticulturae **560** (Abstract)
- WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.
- WINKELMANN, T. und GRUNDEWALDT J. 1992: Plant Regeneration from Protoplasts of *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. S. 117-125
- WITHERS, L. A. AND E. C. COCKING 1972: Fine-Structural Studies on Spontaneous and Induced Fusion of Higher Plant Protoplasts. Journal of Cell Science, **11**, S. 59-75
- WOLFE, L. M. UND J. S. SHORE 1992: The mating system of *Hydrophyllum appendiculatum*, a protandrous species. Sex Plant Reprot **5**, S. 239-245
- XIAOKE, HU., J. XIAOKE UND G. HUASHI 2007: Isolation of protoplasts from *Undaria pinnatifida* by Alginate Lyase Digestion. Journal of Ocean University of Qingdao, China. **2**, S. 58-61
- XU, L. F., F. W. MA, Z. Z. WANG UND X. L. REN 2002: Regeneration of adventitious bud from leaves of 'Bayuehong' pear. Journal of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For, **30** (4), S. 73-75 (in Chinese) in: LIU, J., X. ZHANG, B. K. POU DIAL, Y. ZHANG, Z. JIAO, J. QI 2009: Adventitious shoot regeneration from the leaves of in vitro grown 'Zhongli' pear (*Pyrus spp.*) Front. Agric. China **3** (1), S. 60-66
- YE, G.-N. UND E. EARLE 1991: Effect of Cellulase on Spontaneous Fusion of Maize Protoplasts. Plant Cell Reports. **10**, S.213-216 in: WINKELMANN, T. 1994: zur Transformation, Protoplastenregeneration und-Fusion bei *Sainpaulia ionantha* und *Episcia spec.* Dissertation. Uni-Hannover.

YAO, J. L. UND D.COHEN 1996: Production of triploid *Zantedeschia* hybrids using embryo rescue. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science abstracts. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, **24**, S. 297-301

ZADWORNA, UND E. ZENKTERLER 2005: Embryological Studies on Ovules of *Melandrium Album* Pollinated in vitro with *Lychnis coronaria* Pollen Grains. Acta Biologica cracoviensia Series Botanica **47** (1), S. 135-138

ZAHNG, FL., Y. TAKAHATA, JB. XU 1998: Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). Plant Cell Reports **17**, S. 780-786 in: AKASAKA-AKENNEDY Y., H. YOSHIDA, Y. TAKAHATA 2005: Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): the influence of AgNO<sub>3</sub> and genotype

ZAPATA, F. J., K. C. SINK UND E. C. COCKING 1981: Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species, *L. esculentum* cv Walter, *L. pimpinellifolium* and *L. hirsutum* F. Glabratum. Plant Sci. Lett., **23**, S. 41-46 in: BHOJWANI, S. S. UND M. K. RAZDAN 1996: Plant Tissue culture: Theory and Practice. Elsevier Amsterdam. S. 337-405

ZENKTELER, M. 1967: Test-tube fertilization of ovules of *Melandrium album* Mill. with pollen grains of several species of the *Caryophyllaceae* family. Experientia **23**, S. 775-777

ZENKTELER, M. 1969: Test-tube fertilization and development of hybrids between some species of the *Caryophyllaceae* family. PTPN Pr Kom Biol **32**, S. 69-71

ZENKTLER, M. 1970: Test-Tube Fertilization of Ovules in *Melandrium album* Mill. with Pollen Grains of *Datura stramonium* L. Cellular and Molecular Life Sciences. **26** (6), S. 661-662

ZENKTELER, M. 1980: Intraovarian and in vitro pollination. International Review of Cytology, suppl **11**, S. 137-156

ZENKTELER, M. 1999: In vitro pollination of excised ovaries. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica **41**, S. 31-38.

ZIEBUR, N. K. 1951: Factors influencing the growth of plant embryos. in: SKOOG, F. (Ed.). Plant growth substances, S. 253-261, University Wisconsin Press, Madison

ZIMMERMANN, U. UND P. SCHEURICH 1981: High Frequency Fusion of Plant Protoplasts by Electric Fields. Planta **151**, S. 26-32

ZHAO, H. B., XU, L. F., MA, F. W., LIANG, D., FU, X. C. (2007). Leaf culture and plantlet regeneration of pear scion cultivar 'Dangshansu'. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, **16** (2), S. 153-157 (in Chinese) in: Liu, J., X. Zhang, B. K. Poudial, Y. Zhang, Z. Jiao, J. Qi 2009: Adventitious shoot regeneration from the leaves of in vitro grown 'Zhongli pear (*Pyrus* spp.) Front. Agric. China. **3** (1), S. 60-66

ZHONGYI, LI, G. J. TANNER UND P. J. LARKIN 1990: Callus regeneration from *Trifolium subterraneum* protoplasts and enhanced protoplast division by low-voltage treatment and nurse cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **21**, S. 67-73

ZOREC, R., UND M. TESTER 1992: Cytoplasmic Calcium stimulates exocytosis in plant secretory cell. *Biophys. J.* **63**, S. 864-867

9 Anhang

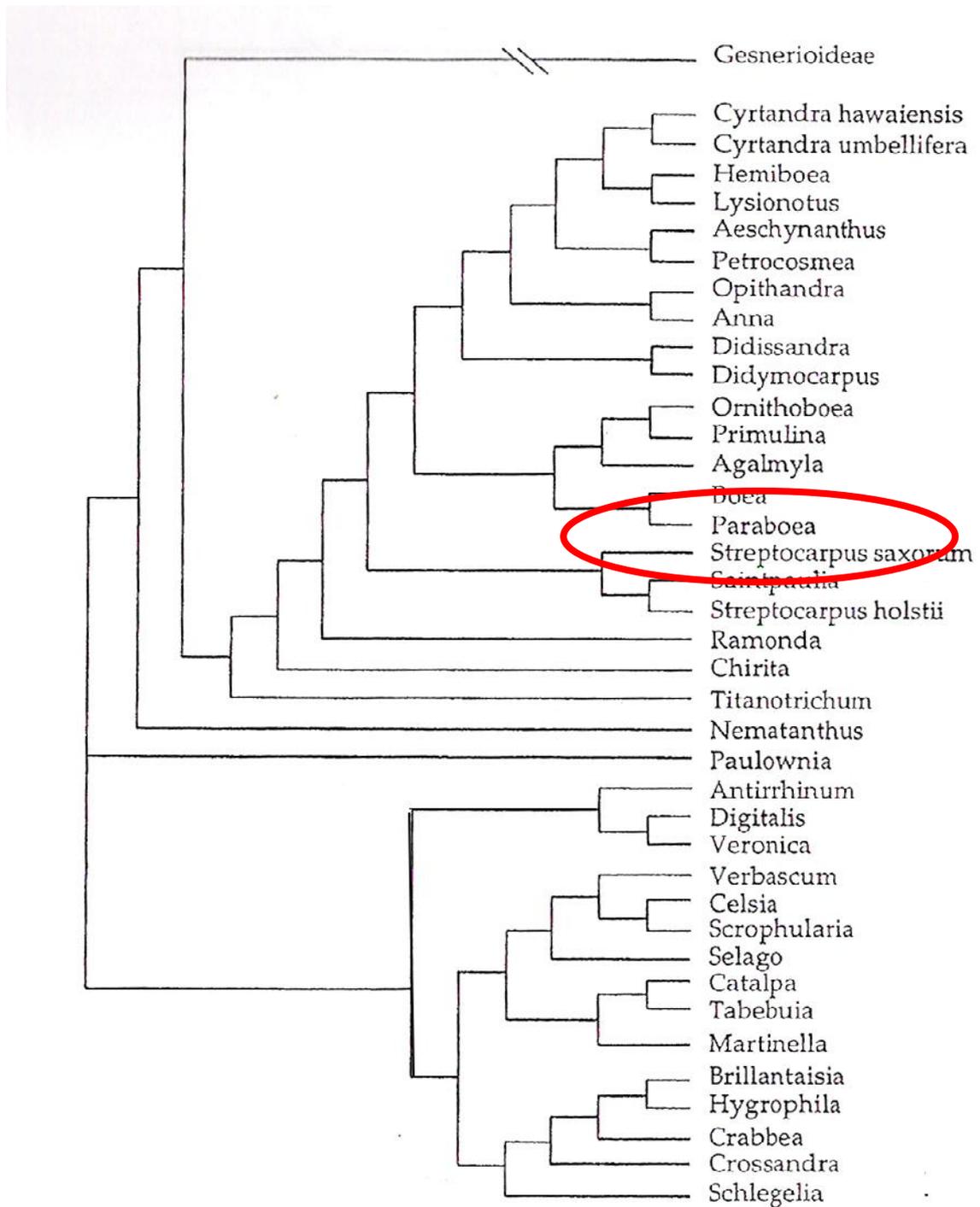
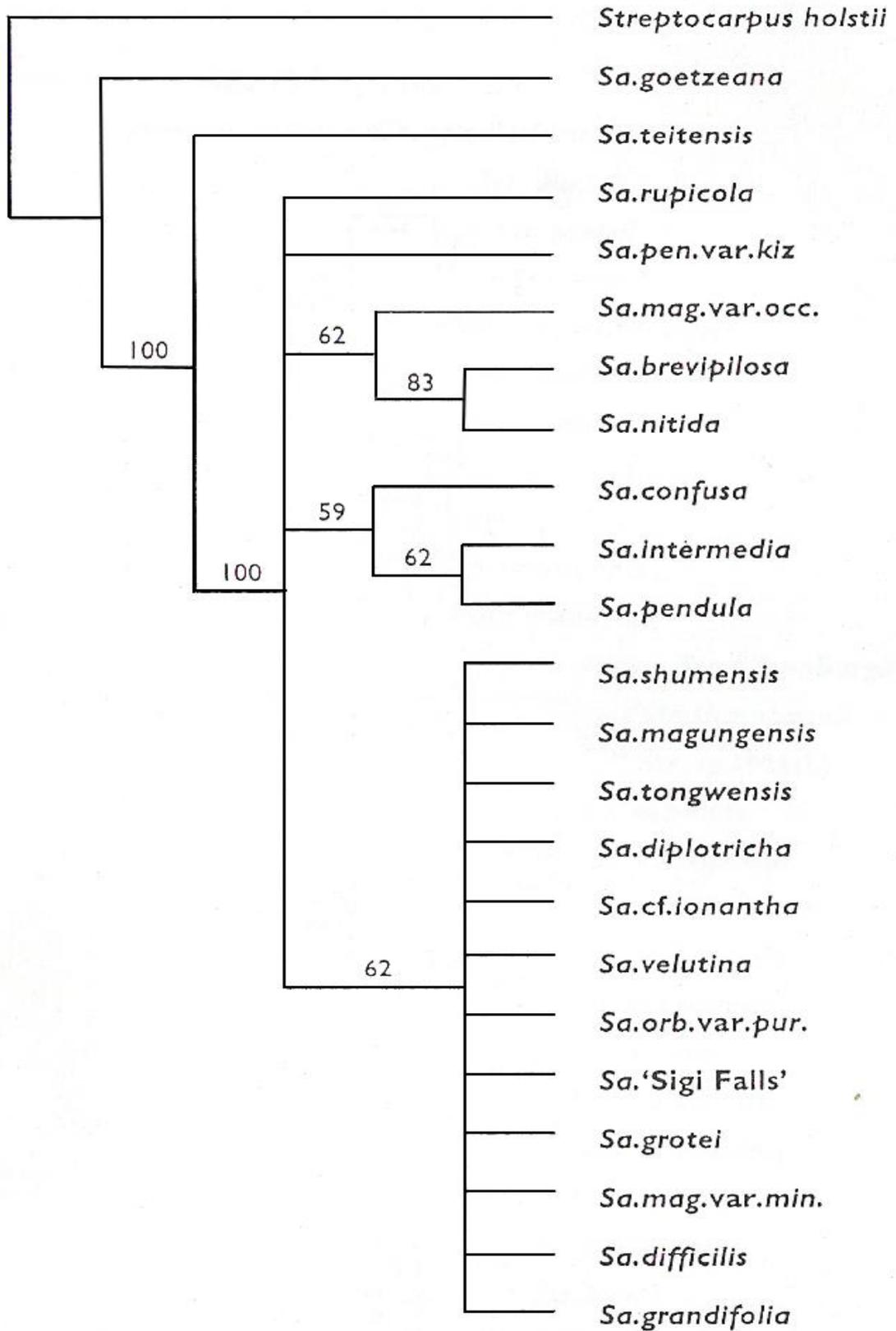


Figure 1. Streptocarpus and Saintpaulia

**Abbildung 9.1:** Das Phänogramm der Subfamilie *Gesneriaceae* nach der Sequenzierung des Chloroplastengens „ndh F“ zeigt die Verwandtschaft zwischen den zwei Subgattungen *Streptocarpus* und der Gattung *Saintpaulia* (SMITH ET AL. 1997)



**Abbildung 9.2:** Phänogramm von *Saintpaulia*-Arten und *Streptocarpus holstii*, das auf kombinierten ITS1- und ITS2-Datensätzen basiert (MÖLLER UND CRONK 1999)

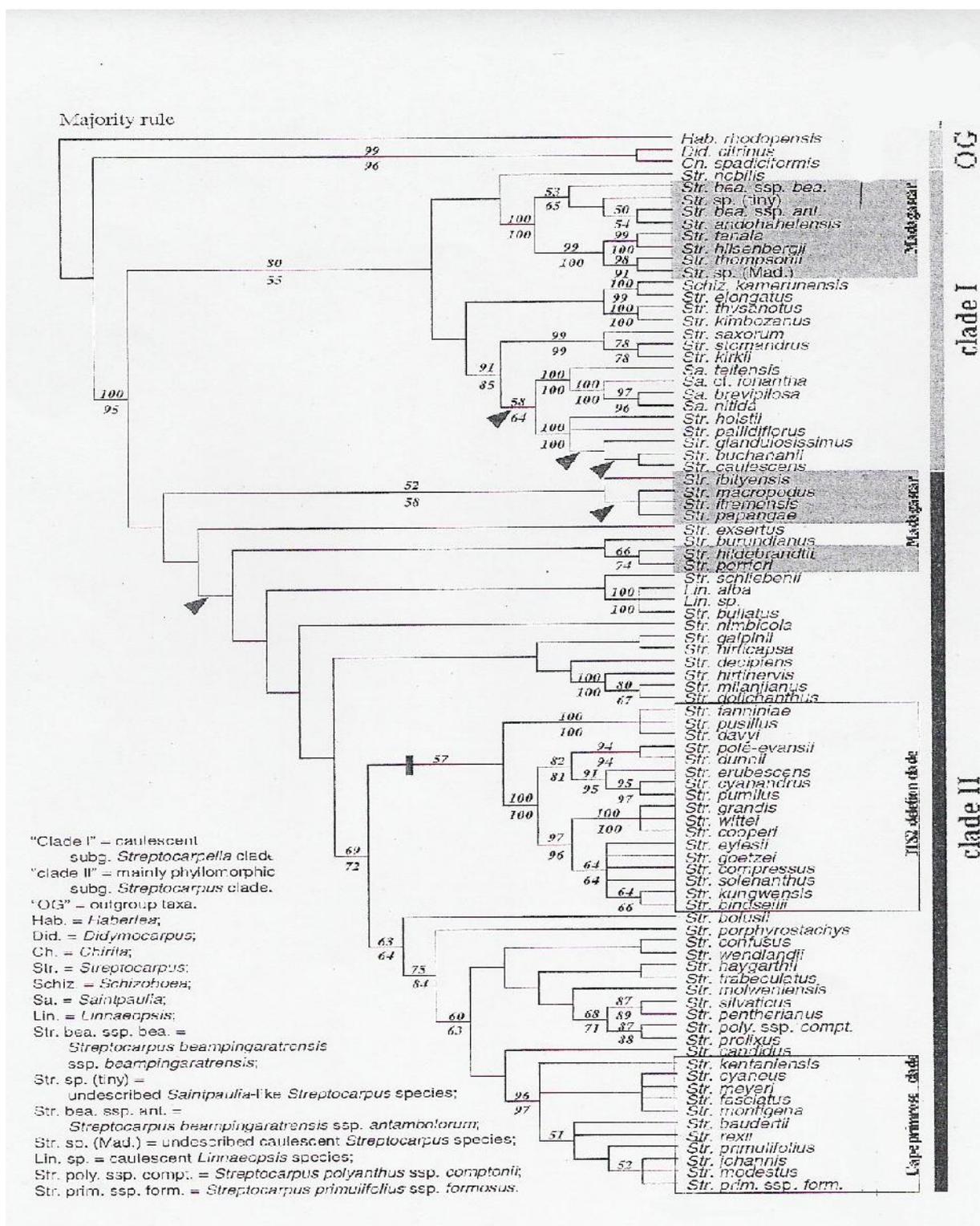


Abbildung 9.3: Phänogramm von *Streptocarpus*-Arten. Die Subgattung *Streptocarpella* mit einem Chromosomenansatz  $x = 15$  ist mit der Gattung *Sainpaulia* verwandt (MÖLLER UND CRONK 2001a)

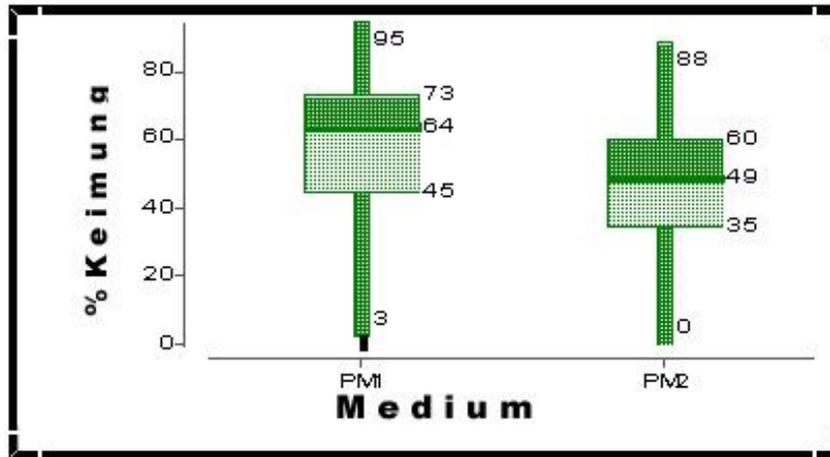


Abbildung 9.4: Vergleich der prozentualen In-vitro-Pollenkeimung von fünf *Saintpaulia ionantha*-Sorten und 12 *Streptocarpus*-Arten auf den zwei Medien PM1 und PM2

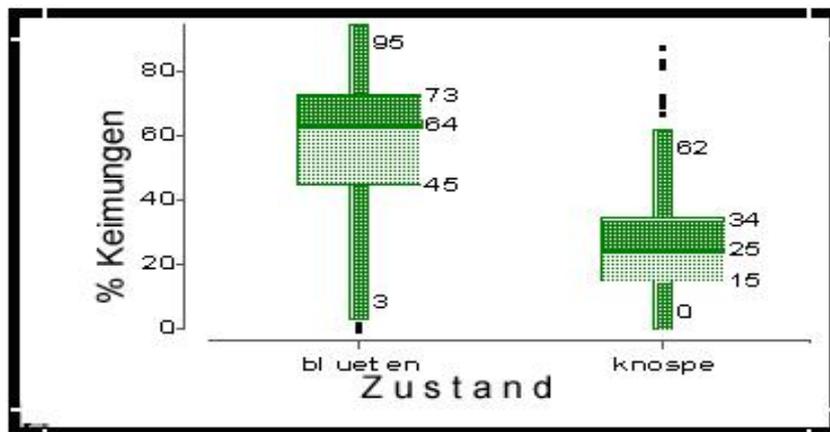


Abbildung 9.5: Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von Knospen und geöffneten Blüten aus verschiedenen *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen

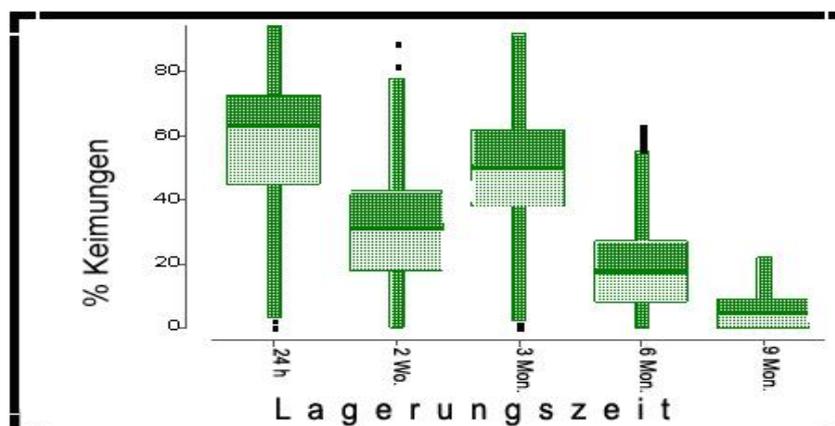


Abbildung 9.6: Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von verschiedenen *Streptocarpus*-Arten und *Saintpaulia*-Genotypen in Bezug zur Lagerungszeit

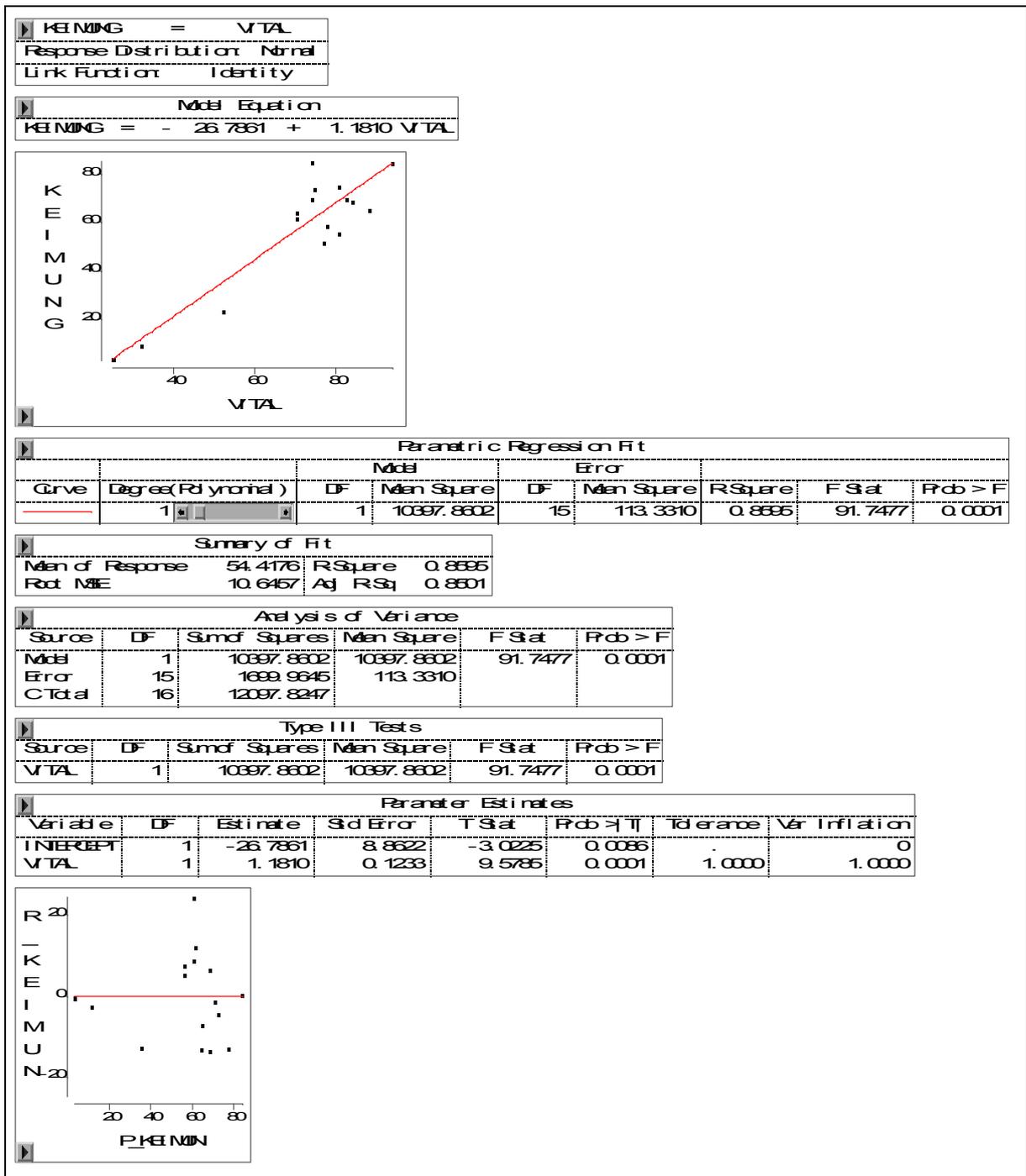


Abbildung 9.7: Regressionslinie zwischen der Pollenvitalität, ermittelt mit FDA-Färbung, und der Pollenkeimung in vitro bei 12 *Streptocarpus*-Arten und fünf *Saintpaulia*-Genotypen

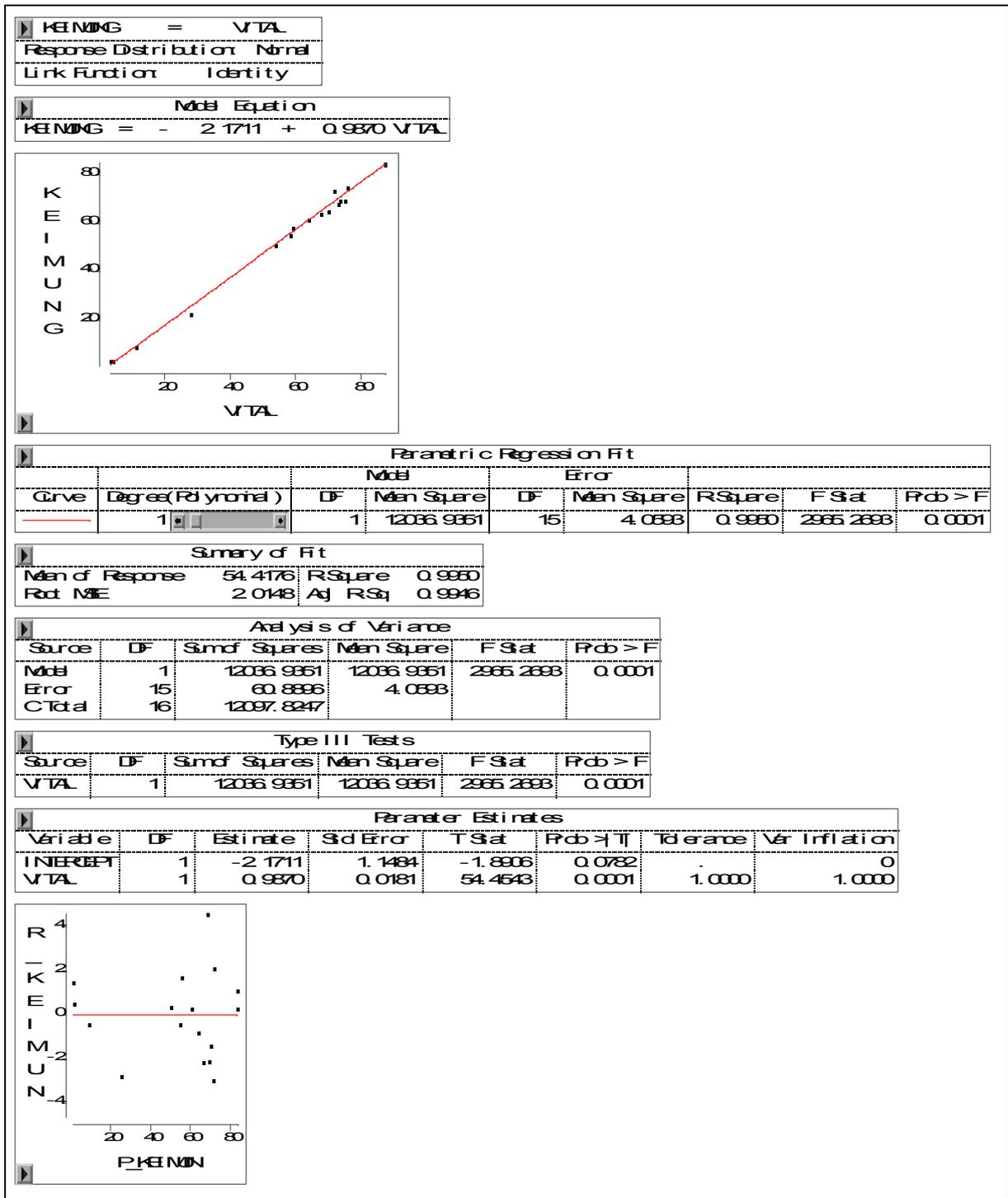


Abbildung 9.8: Regressionslinie zwischen der Pollenvitalität, ermittelt mit MTT-Färbung, und der Pollenkeimung in vitro bei 12 *Streptocarpus*-Arten und fünf *Saintpaulia*-Genotypen

**Tabelle 9.1:** Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von fünf *Saintpaulia*-Genotypen und 12 *Streptocarpus*-Arten auf den zwei Medien PM1 und PM2

source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GENOTYPE	16	195833.50000000	12239.59375000	305.95	0.0001
MEDIUM	1	8925.18823529	8925.18823529	223.10	<b>0.0001</b>
GENOTYPE*MEDIUM	16	4911.91176471	306.99448529	7.67	<b>0.0001</b>

**Tabelle 9.2-a:** Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von fünf *Saintpaulia*-Genotypen und 12 *Streptocarpus*-Arten auf den zwei Medien PM1 und PM2. Verglichen wurde jeweils die Keimung für einen Genotyp auf zwei Medien

Genotyp	P-wert	Genotyp	P-wert	Genotyp	P-wert
<b>S1</b>	0,0014	<b>S20</b>	0,0613	<b>U03</b>	0,0796
<b>S11</b>	0,0001	<b>S25</b>	0,0011	<b>U08</b>	0,7521
<b>S12</b>	0,0009	<b>S3</b>	0,7985	<b>U09</b>	0,8932
<b>S14</b>	0,0001	<b>S5</b>	0,0001	<b>U13</b>	0,0022
<b>S19</b>	0,0001	<b>S7</b>	0,0001	<b>U14</b>	0,0154
<b>S2</b>	0,4196	<b>S8</b>	0,0218		

**Tabelle 9.3-b:** Vergleich der In-vitro-Pollenkeimung von verschiedenen *Saintpaulia*-Genotypen und *Streptocarpus*-Arten aus Blüten in zwei Entwicklungsstadien: Knospen und Blüten

Genotyp	P-wert	Genotyp	P-wert	Genotyp	P-wert
<b>S1</b>	0,0001	<b>S20</b>	0,0001	<b>U03</b>	0,0241
<b>S11</b>	0,0001	<b>S25</b>	0,0001	<b>U08</b>	0,6377
<b>S12</b>	0,0001	<b>S3</b>	0,0133	<b>U09</b>	0,0204
<b>S14</b>	0,0001	<b>S5</b>	0,0009	<b>U13</b>	0,0001
<b>S19</b>	0,0001	<b>S7</b>	0,0001	<b>U14</b>	0,0001
<b>S2</b>	0,0001	<b>S8</b>	0,0001		

**Tabelle 9.4:** Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von *Streptocarpus*-Arten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit (Kontrolle U)

<b>Genotyp</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>3 Mon.</b>	<b>6 Mon.</b>	<b>9 Mon.</b>
<b>S1</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S11</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S12</b>	0,0001	0,0001	0,0343	0,0001
<b>S14</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S19</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S2</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S20</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S25</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S3</b>	0,0001	0,0001	0,6546	0,0001
<b>S5</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S7</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S8</b>	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001
<b>U03</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>U08</b>	0,0167	0,0001	0,6065	0,0001
<b>U09</b>	0,0233	0,0116	0,8000	0,0001
<b>U13</b>	0,0001	0,0001	0,2795	0,0001
<b>U14</b>	0,0001	0,0001	0,0097	0,0001

**Tabelle 9.5:** Vergleich der prozentualen Pollenkeimung von *Streptocarpus*-Arten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit (Kontrolle O)

<b>Genotyp</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>3 Mon.</b>	<b>6 Mon.</b>	<b>9 Mon.</b>
<b>S1</b>	0,0001	0,0051	0,0001	0,0001
<b>S11</b>	0,0001	0,1272	0,0001	0,0001
<b>S12</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S14</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S19</b>	0,0001	0,0007	0,0001	0,0001
<b>S2</b>	0,0001	0,1234	0,0001	0,0001
<b>S20</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S25</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S3</b>	0,0001	0,4834	0,0001	0,0001
<b>S5</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>S7</b>	0,0001	0,1452	0,0001	0,0001
<b>S8</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>U03</b>	0,0001	0,1564	0,0001	0,0001
<b>U08</b>	0,0001	0,1032	0,0001	0,0001
<b>U09</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>U13</b>	0,0001	0,3279	0,0001	0,0001
<b>U14</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

**Tabelle 9.6:** Kreuzungen zwischen *Streptocarpus*-Arten der Untergattung *Streptocarpella*

♀		♂	Anzahl der Kreuzungen	Geerntete Kapseln	Samen mit Kapseln	gekeimt
S1	X	S2	30	7	vorhanden	+
S1	X	S3	10	3	keine	
S1	X	S4	30	5	keine	
S1	X	S5	30	0		
S1	X	S7	30	0		
S1	X	S8	30	4	vorhanden	+
S1	X	S11	30	0		
S1	X	S12	30	7	keine	
S1	X	S14	20	4	vorhanden	+
S1	X	S19	30	0		
S1	X	S25	30	4	vorhanden	+
S1	X	S26	30	0		
S1	X	S27	10	0		
S1	X	S28	20	0		
S1	X	S33	20	0		
S2	X	S1	5	0		
S2	X	S3	5	0		
S2	X	S4	5	0		
S2	X	S5	5	0		
S2	X	S8	5	0		
S2	X	S12	5	0		
S2	X	S25	5	0		
S2	X	S26	5	0		

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

♀		♂	Anzahl der Kreuzungen	Geerntete Kapseln	Samen mit Kapseln	gekeimt
S3	X	S28	30	0		
S3	X	S33	30	0		
S4	X	S1	15	0		
S4	X	S2	15	0		
S4	X	S3	15	0		
S4	X	S5	10	0		
S4	X	S8	10	6	keine	
S4	X	S12	10	0		
S4	X	S14	10	0		
S4	X	S25	15	0		
S4	X	S26	15	0		
S4	X	S28	10	0		
S5	X	S1	30	1	keine	
S5	X	S2	30	0		
S5	X	S3	30	0		
S5	X	S4	30	0		
S5	X	S7	30	0		
S5	X	S8	30	0		
S5	X	S11	30	0		
S5	X	S12	30	0		
S5	X	S19	30	0		
S5	X	S25	30	0		
S5	X	S26	30	0		
S5	X	S28	30	0		
S7	X	S1	30	25	keine	
S7	X	S2	30	20	keine	
S7	X	S3	30	23	keine	
S7	X	S4	30	22	keine	
S7	X	S5	30	27	keine	
S7	X	S8	30	22	keine	
S7	X	S12	30	18	keine	
S7	X	S14	30	20	keine	
S7	X	S25	30	25	keine	
S7	X	S26	30	17	keine	
S7	X	S27	30	23	keine	
S7	X	S28	30	20	keine	
S7	X	S33	30	20	keine	
S8	X	S1	30	0	keine	
S8	X	S2	30	8	keine	
S8	X	S3	30	0		
S8	X	S4	30	0		
S8	X	S5	30	6	keine	
S8	X	S7	30	0		
S8	X	S11	30	0		
S8	X	S12	30	18	vorhanden	+
S8	X	S14	30	0		
S8	X	S19	30	0		
S8	X	S25	30	12	vorhanden	+

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

♀		♂	Anzahl der Kreuzungen	Geerntete Kapseln	Samen mit Kapseln	gekeimt
S8	X	S26	30	0		
S8	X	S27	30	0		
S8	X	S28	30	0		
S8	X	S33	30	0		
S11	X	S1	30	18	keine	
S11	X	S2	30	20	keine	
S11	X	S3	30	28	keine	
S11	X	S4	30	25	keine	
S11	X	S5	30	28	keine	
S11	X	S8	30	25	keine	
S11	X	S12	30	20	keine	
S11	X	S14	30	14	keine	
S11	X	S25	30	22	keine	
S11	X	S26	30	20	keine	
S11	X	S27	30	12	keine	
S11	X	S28	30	19	keine	
S11	X	S33	30	13	keine	
S12	X	S1	20	0		
S12	X	S2	20	0		
S12	X	S3	20	0		
S12	X	S4	20	0		
S12	X	S5	20	0		
S12	X	S7	20	0		
S12	X	S11	20	0		
S12	X	S14	20	0		
S12	X	S19	20	0		
S12	X	S25	20	0		
S12	X	S26	20	0		
S12	X	S27	20	0		
S12	X	S28	20	0		
S12	X	S33	20	0		
S14	X	S1	5	2	vorhanden	-
S14	X	S2	5	0		
S14	X	S3	5	0		
S14	X	S4	5	0		
S14	X	S5	5	0		
S14	X	S7	5	0		
S14	X	S8	5	0		
S14	X	S11	5	0		
S14	X	S12	5	0		
S14	X	S19	5	0		
S14	X	S25	5	2	vorhanden	-
S14	X	S26	5	1	vorhanden	+
S14	X	S27	5	0		
S14	X	S28	5	0		
S14	X	S33	5	0		
S19	X	S1	30	17	keine	
S19	X	S2	30	15	keine	

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

♀		♂	Anzahl der Kreuzungen	Geerntete Kapseln	Samen mit Kapseln	gekeimt
S19	X	S3	30	18	keine	
S19	X	S4	30	22	keine	
S19	X	S5	30	18	keine	
S19	X	S8	30	15	keine	
S19	X	S12	30	14	keine	
S19	X	S14	30	18	keine	
S19	X	S25	30	19	keine	
S19	X	S26	30	13	keine	
S19	X	S27	30	15	keine	
S19	X	S28	30	22	keine	
S19	X	S33	30	15	keine	
S25	X	S1	30	5	keine	
S25	X	S2	30	2	keine	
S25	X	S3	30	0		
S25	X	S4	20	0		
S25	X	S5	30	0	vorhanden	+
S25	X	S7	30	0		
S25	X	S8	30	6	vorhanden	+
S25	X	S1	30	0		
S25	X	S12	30	22	vorhanden	+
S25	X	S14	30	5	vorhanden	-
S25	X	S19	30	0		
S25	X	S27	30	0		
S25	X	S28	30	0		
S25	X	S33	30	0		
S26	X	S1	30	0		
S26	X	S2	30	0		
S26	X	S3	30	0		
S26	X	S4	30	0		
S26	X	S5	30	0		
S26	X	S8	30	0		
S26	X	S12	30	0		
S26	X	S14	30	0		
S26	X	S27	30	0		
S26	X	S28	30	0		
S26	X	S33	30	0		

**Tabelle 9.7:** Zusammensetzung [mg/ l] der Medien für die Protoplastenkultur von *Saintpaulia ionantha* nach WINKELMANN (1994) (Wachstumsregulatoren, pH-Wert, Sterilisation, Saccharosegehalt und osmotischer Wert: Tab. 3.1)

<b>Medium</b>					
<b>Chemikalie</b>	<b>BNE 9</b>	<b>8pm7</b>	<b>KF1</b>	<b>KF2</b>	<b>KR10</b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	600	600	300	300	300
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900	1900	1900	1900	1900
<b>CaCl x 2 H<sub>2</sub>O</b>	600	600	900	900	600
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</b>	300	300	300	300	300
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170	170	170	170	170
<b>KCL</b>	300	300	300	300	300
<b>MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</b>	10				
<b>ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</b>	2				
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	3				
<b>KJ</b>	0,75				
<b>CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O</b>	0,025				
<b>NaMoO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O</b>	0,25				
<b>CaCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O</b>	0,025				
<b>NaFeEDTA</b>	25				
<b>Na-Pyrovat</b>	20				
<b>Zitronensäure</b>	40				
<b>Äpfelsäure</b>	40				
<b>Fumarsäure</b>	40				
<b>Myo-Inisit</b>	100				
<b>Thiamin HCL</b>	10				
<b>Nicitinsäure</b>	1				
<b>Pyridoxin</b>	1				
<b>Fruktose</b>	250				
<b>Ribose</b>	250				
<b>Xylose</b>	250				
<b>Mannose</b>	250				
<b>Rhamnose</b>	250				
<b>Cellobiose</b>	250				
<b>Sorbitol</b>	250				
<b>Mannitol</b>	250				

**Tabelle 9.8:** Protoplastenausbeute (g / FM x 10<sup>5</sup>) aus regenerierten Sprossen bei fünf *Streptocarpus*-Arten nach sechswöchiger Kultur unter Licht oder in Dunkelheit.

<b>Genotyp</b>	<b>Dunkelheit</b>	<b>Licht</b>
<b>S1</b>	1,70	0,93
<b>S2</b>	1,68	0,41
<b>S3</b>	5,88	1,52
<b>S12</b>	1,12	1,77
<b>S25</b>	1,06	2,21

**Tabelle 9.9:** Protoplastenausbeute (g / FM x 10<sup>5</sup>) aus Blättern von fünf *Streptocarpus*-Arten, die aus In-vitro-Sprosskultur auf dem festen Medium entnommen wurden

<b>Genotyp</b>	<b>mit Vakuum</b>	<b>ohne Vakuum</b>
<b>S1</b>	1,58	0,98
<b>S2</b>	0,14	0,11
<b>S3</b>	1,15	0,79
<b>S12</b>	1,20	0,77
<b>S25</b>	1,53	1,43

**Tabelle 9.10:** Protoplastenausbeute (g / FM x 10<sup>5</sup>) aus Blättern von fünf *Streptocarpus*-Arten, die unter verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert wurden

<b>Genotyp</b>	<b>Dunkelheit</b>	<b>500 Lux</b>	<b>2000 Lux</b>
<b>S1</b>	1,14	1,27	0,98
<b>S2</b>	2,00	0,90	0,11
<b>S3</b>	1,85	1,61	0,79
<b>S12</b>	1,24	1,08	0,77
<b>S25</b>	1,55	1,55	1,43

**Tabelle 9.11:** Protoplastenausbeute (g / FM x 10<sup>5</sup>) aus Stängeln von fünf *Streptocarpus*-Arten, die unter verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert wurden

<b>Genotyp</b>	<b>Dunkelheit</b>	<b>500 Lux</b>	<b>2000 Lux</b>
<b>S1</b>	3,16	3,25	1,92
<b>S2</b>	4,28	3,01	0,20
<b>S3</b>	2,45	3,18	1,35
<b>S12</b>	2,45	2,45	3,48
<b>S25</b>	3,49	3,58	3,60

**Tabelle 9.12:** Protoplastenausbeute (g / FM x 10<sup>5</sup>) aus Blättern und Stängeln von fünf *Streptocarpus*-Arten nach dreiwöchiger Kultur im flüssigen Medium in Dunkelheit

<b>Genotyp</b>	<b>Blätter</b>	<b>Stängel</b>
<b>S1</b>	3,44	0,92
<b>S2</b>	2,15	1,45
<b>S3</b>	3,63	0,79
<b>S12</b>	2,00	0,12
<b>S25</b>	2,57	0,82

**Tabelle 9.13:** Änderungen der Durchmesser der kultivierten Protoplasten aus drei *Streptocarpus*-Arten im flüssigen 8pm7-Medium mit verschiedenen Osmolaritäten. Oben die Messungen der Protoplasten nach drei Tagen Kultur, unten die Messungen nach einer Woche

		400		450		500		550		600		650	
		Osm. →											
Genotyp		X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
nach drei Tagen	S3	45	11	35	9	41	11	43	12	40	8	41	8
	S12	70	15	60	13	55	17	53	16	41	10	36	12
	S25	66	18	65	19	63	14	62	14	57	12	59	12
nach einer Woche	S3	47	8	39	9	38	9	39	8	38	7	35	8
	S12	69	11	65	12	61	13	56	8	54	7	50	7
	S25	81	12	67	12	64	10	63	13	61	11	58	12

**Tabelle 9.14:** Zusammensetzung des CPW (Cell and Protoplast Washing Medium) nach COOKING UND PEBERDY (1974)

Chemikalie	ppm = mg / l	Stammlösung mg in A. des	ml Stammlösung für 100 ml	ml Stammlösung für 250 ml	ml Stammlösung für 500 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27,2	272			
KNO <sub>3</sub>	101,0	1010			
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1480,0	14800 2000ml	20	50	100
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	246,0	2460			
KJ	0,16	16			
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025	2,5 100ml	0,1	0,25	0,5

**Tabelle 9.15:** Zusammensetzung des TAE-Puffers (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) nach SAMBROOK ET AL. (1989)

Chemikalie	Konzentration	50 x Stammlösung
TRIS	0,4 M	242 g
EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz	0,01 M	100 ml
Essigsäure	0,2 M	57,1 ml
PH-Wert: 8,5		

**Tabelle 9.16:** Zusammensetzung des Ladepuffers

Chemikalie	Konzentration	Für 10 ml
Glycerin	30 %	3 ml
Bromphenolblau A. dest.	25 %	25 g

## 9.1 Protokolle

### 9.1.1 Protokoll P2 nach MOTTLEY (1996)

1. Die Protoplasten der beiden Fusionspartnern in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Pps / ml in CPW 13M suspendieren und in einem Verhältnis von 1 zu 1 mischen.
2. Eine Probe in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml als Kontrolle nehmen.
3. Danach 0,5 ml der Suspension in einem Glaszentrifugenröhrchen (98 x 16 mm, Schütt) auffüllen.
4. Darauf 2 ml PEG-Lösung PEG 2 zugeben. Das Röhrchen leicht schütteln, damit die Protoplasten sich im PEG verteilen.
5. Nach 10 min. Inkubationszeit 0,5 ml DW9M-Lösung darauf pipettieren und das Röhrchen wieder leicht schütteln, damit die Protoplasten sich in der Mischung verteilen.
6. Die Nachbehandlung folgt schrittweise durch Zugabe von 1 ml DW9M in 5 min.
7. Nach weiteren 5 min. Wartezeit die Röhrchen für 5 min. bei 40 x g im Ausschwingrotor einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugieren.
8. Die Überstände absaugen.
9. Das Pellet zweimal in 10ml DW9M-Lösung suspendieren und unter denselben Bedingungen zentrifugieren.
10. Das Pellet für die Bestimmung des Titers, die Einschätzung des Anteils zweikerniger Protoplasten und die Abschätzung der Vitalität in 1 ml 0,5 M Mannit-Lösung suspendieren.
11. Die Fusionsprodukte in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml kultivieren.

### 9.1.2 Protokoll P3 nach SCHUM UND HOFMANN (2001)

1. Die Protoplasten der beiden Fusionspartner nach Isolierung und Pelletierung in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Pps / ml in die CPW-Lösung (nach COOKING UND PEBERDY 1974) aufnehmen und in einem Verhältnis von 1 zu 1 mischen.
2. Eine Probe in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml als Kontrolle nehmen.
3. Danach in einer 3,5 cm Plastikpetrischale 2 Tropfen (0,15 ml) PEG-Lösung PEG3 im Abstand von etwa 1 cm pipettieren.
4. 0,3 ml Protoplastensuspension so zugeben, dass sich drei Tropfen langsam miteinander verbinden und die Protoplasten nicht mit dem Boden der Petrischale in Kontakt kommen.
5. Nach 20 min. Inkubation bei Raumtemperatur langsam 2,5 ml 0,275 M Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-

Lösung hinzufügen.

6. Wieder für 20 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
7. 3 ml 0,275 M Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung in ein steriles Zentrifugenröhrchen pipettieren und die Fusionsprodukte mit einer Pipette mit weiter Öffnung absaugen und hinzufügen. Dabei die Protoplasten, die sich am Boden der Petrischale festgesetzt haben, vorsichtig mehrfach aufspülen und in das Röhrchen füllen.
8. Wieder für 20 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Das Röhrchen für 8 min. bei 40 x g zentrifugieren.
10. Den Überstand absaugen.
11. Das Pellet zweimal in 8 ml 6 M Mannit suspendieren und unter denselben Bedingungen zentrifugieren.
12. Das Pellet für die Bestimmung des Titers, die Einschätzung des Anteils zweikerniger Protoplasten und die Abschätzung der Vitalität in einem geeigneten Volumen von 0,5 M Mannit-Lösung suspendieren.
13. Die Fusionsprodukte nach einer Stunde in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml im Alginatfilm kultivieren.

### **9.1.3 Protokoll P4 nach NAKANO UND MII (1992):**

1. Die Protoplasten jedes Fusionspartners in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Pps / ml in PS1-Lösung suspendieren und in einem Verhältnis von 1 zu 1 mischen.
2. Eine Probe in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml als Kontrolle nehmen.
3. 1 ml PEG-Lösung PEG4 in vier Tropfen in eine 6 cm-Glasspetrischale geben.
4. Darauf 1 ml Protoplastensuspension in die Mitte der vier Tropfen zugeben, so dass sich die PEG-Tropfen mit der Protoplastensuspension mischen und die Protoplasten nicht mit dem Boden der Petrischale in Kontakt kommen.
5. Nach 30 min. Inkubationszeit langsam 8 ml Nachbehandlungslösung PV4 dazu pipettieren.
6. Danach die Fusionsprodukte mit einer Pipette mit weiter Öffnung absaugen, in ein steriles Zentrifugenröhrchen auffüllen und für 3 min. bei 120 x g zentrifugieren.
7. Den Überstand absaugen.
8. Das Pellet zweimal in 10 ml 0,5 M Mannitol-Lösung (autoklaviert) suspendieren und unter denselben Bedingungen zentrifugieren.
9. Das Pellet für die Bestimmung des Titers, die Einschätzung des Anteils zweikerniger Protoplasten und die Abschätzung der Vitalität in einem geeigneten Volumen von 0,5 M Mani-Lösung suspendieren.

10. Die Fusionsprodukte in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml im Alginatfilm kultivieren.

#### 9.1.4 Protokoll P5 nach ASSANI ET AL. (2005):

1. Die Protoplasten der beiden Fusionspartner in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Pps / ml in PS5-Lösung suspendieren und in einem Verhältnis von 1 zu 1 mischen.
2. Eine Probe in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml als Kontrolle nehmen.
3. 300 ml der Protoplastensuspension in eine 6 cm-Glasspetrischale pipettieren. Darauf langsam 50  $\mu$ l PEG-Lösung PEG5 (4-6 Tropfen) zugeben.
4. Die Petrischale für 25 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
5. 3 ml PS1-Lösung dazupipettieren und die Mischung verdünnen.
6. Die Petrischale für 10 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Die Fusionsprodukte mit einer Pipette mit weiter Öffnung absaugen und in ein steriles Zentrifugenröhrchen auffüllen.
8. Danach zusätzlich 5 ml Pufferlösung 2 (204 mM KCl, 67 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , in destilliertem Wasser, autoklaviert) auffüllen.
9. Das Röhrchen für 3 min. bei 66 x g im Ausschwingrotor einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugieren.
10. Die intakten Protoplasten sammeln sich am Boden des Röhrchens und pelletieren.
11. Den Überstand absaugen.
12. Das Pellet wieder in 10ml Pufferlösung 1 suspendieren und unter denselben Bedingungen zentrifugieren.
13. Das Pellet für die Bestimmung des Titers, die Einschätzung des Anteils zweikerniger Protoplasten und die Abschätzung der Vitalität in einem geeigneten Volumen von 0,5 M Mani-Lösung suspendieren.
14. Die Fusionsprodukte in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml im Alginatfilm kultivieren.

#### 9.1.5 Protokoll P6

Die Protoplastenfusion wurde nach einem geänderten Protokoll von KAO UND MICHAYLUK (1974) wie folgt durchgeführt:

1. Die Protoplasten der beiden Fusionspartner in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Pps / ml in PS6 suspendieren und in einem Verhältnis 1 zu 1 mischen.
2. Eine Probe in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml als Kontrolle nehmen.
3. 0,5 ml der PEG-Lösung PEG6 in ein Glaszentrifugenröhrchen (98 x 16 mm, Schütt) auffüllen. Das Röhrchen horizontal mehrmals drehen, damit sich das PEG an die innere Seite des Röhrchens anhaftet (HARMS UND POTRYKUS 1978).

4. 0,5 ml der Protoplastensuspension tropfenweise an den Rand der inneren Seite des Röhrchens zupipettieren.
5. Nach ca. 30 min, wenn die Protoplasten in der PEG-Lösung absinken, 1 ml des Medium BNE 9 (pH-Wert: 9,5) tropfenweise zugeben, so dass alle 30 Sekunden ein Tropfen in das Röhrchen zupipettiert wird.
6. Während der Verdünnung das Röhrchen leicht drehen und schütteln, damit der pH-Wert in der Suspension allmählich erhöht wird.
7. Nach dem letzten Tropfen vorsichtig 3 ml des Mediums BNE 9 (pH-Wert: 5,6) hinzufügen.
8. Darauf 5 ml autoklavierte 20%ige Saccharoselösung zugeben. Das Röhrchen leicht schwenken, damit die beiden Phasen gut miteinander gemischt werden.
9. Die Mischungen in dem Röhrchen mit 1,5 ml Pufferlösung 1 überschichten.
10. Das Röhrchen für 6 min. bei 200 x g im Ausschwingrotor einer Hettich-Tischzentrifuge zentrifugieren. Die intakten Protoplasten sammeln sich in der Interphase zwischen der Mischung und der Pufferlösung 1. Diese Bande aus Protoplasten mit der Pufferlösung vorsichtig mit einer Pipette mit weiter Öffnung absaugen, in ein neues Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Pufferlösung 1 auffüllen und mit leichtem Schwenken mischen.
11. Das neue Zentrifugenröhrchen unter denselben Bedingungen, jedoch bei 40 x g (500 rpm) zentrifugieren, damit die Protoplasten am Boden des Röhrchens pelletieren.
12. Den Überstand absaugen.
13. Das Pellet in 10ml Pufferlösung 1 suspendieren und bei 40 x g (500 rpm) zentrifugieren.
14. Das Pellet für die Bestimmung des Titers, die Einschätzung des Anteils zweikerniger Protoplasten und die Abschätzung der Vitalität in ein geeignetes Volumen von 0,5 M Mannit-Lösung suspendieren.
15. Die Fusionsprodukte in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  / ml im Alginatfilm kultivieren.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum 21.04.1958  
Geburtsort Schiraz / Iran

### Schulbildung

09.1964 - 06.1976 Kherad-Gymnasium in Schiraz / Iran, Abschluss: Abitur

### Berufliche Ausbildung

09.1976 - 03.1979 Studium der Agronomie und Pflanzenzüchtung an der

09.1989 - 06.1992 Universität Gilan (Iran),

Abschluss:

Lizenz Agrar-Ingenieur-Agronomie und Pflanzenzüchtung

08.1996 - 09.1997 Ausbildung zur Zierpflanzengärtner

04.1998 - 06.2002 Studium des Gartenbau an der Universität Hannover,  
Fachbereich Gartenbau

Abschluss: Diplom-Agraringenieur Gartenbau

06.2002 Promotion an der Universität Hannover, Fachbereich Gartenbau,  
Institut für Zierpflanzenbau

### Berufstätigkeit

02.1992 - 05.1994 Sortenbestimmung von Feigen in Istahban, Provinz Fars

06.2002 - 12.2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Zierpflanzenbau,  
Fachbereich Gartenbau, Universität Hannover

11.2008 - 10.2009 Projektleiter Landeshauptstadt Hannover, Fachbereich Soziales,  
Beschäftigungsförderung, Stützpunkt Hölderlinstraße