

**Entwicklung von In-vitro-Kulturverfahren  
und blütenbiologische Untersuchungen zur  
Erweiterung der Zuchtmethodik bei  
*Hydrangea macrophylla***

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

von

**Dipl.-Ing. agr. Antje Doil**

geboren am 23.07.1978 in Bautzen

2010

Referent: Prof. Dr. T. Winkelmann

Koreferent: Prof. Dr. M. Serek

Tag der Promotion: 19.03.2010

## Zusammenfassung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Etablierung von In-vitro-Kulturtechniken für *Hydrangea*. Im ersten Schritt wurden hierfür Sprossspitzenkulturen von vier *H. macrophylla* Sorten und von *H. arborescens* 'Annabelle' in vitro etabliert. Anschließend wurde die Vermehrung auf unterschiedlichen Nährmedien und bei Kultur in temporärer Immersion getestet. Die Vermehrung von *H. macrophylla* war auf einem Medium nach Murashige und Skoog mit 0,2 mg/l BAP am erfolgreichsten. Durch Verwendung von Fe-EDDHA anstelle von Fe-Na-EDTA und durch den Austausch von Plant Agar durch Gelrite konnte eine deutliche Steigerung der Pflanzenqualität und eine weitere Steigerung der Vermehrungsraten erzielt werden. Die Vermehrungsraten lagen in Abhängigkeit vom Genotyp zwischen 1,2 und 4,3. Beim Vergleich der Kultur in temporärer Immersion mit der Kultur auf Festmedium war bei Kultur in temporärer Immersion eine Steigerung der Vermehrungsrate von 1,2 auf 3,3 bei gleichzeitig sehr guter Pflanzenqualität zu verzeichnen.

Ein weiteres Ziel war es, ein Regenerationssystem über Adventivsprossbildung für *Hydrangea* zu etablieren und dabei den Einfluss des Nährmediums zu untersuchen. Insgesamt war die Regenerationsleistung stark genotypenabhängig. Während an Blattexplantaten der Sorten *H. macrophylla* 'Adria' und 'Libelle' Adventivsprosse nur in geringem Umfang bzw. nur mit sukkulentem Wuchs regenerierten, konnte für *H. macrophylla* 'Blaumeise' und 'Nachtigall' sowie für *H. quercifolia* 'Pee Wee' ein effizientes Regenerationsprotokoll mit Regenerationsraten zwischen 3 und 5 Adventivsprossen pro Explantat entwickelt werden.

Die Regeneration über somatische Embryogenese konnte, trotz vielfältiger Versuchsansätze, nicht realisiert werden. Ein vielversprechender Ansatz für weitere Untersuchungen sind Plazentaexplantate. Nach Überführung auf Medium ohne Wachstumsregulatoren konnte an Plazentaexplantaten indirekte Differenzierung von Strukturen beobachtet werden, die somatische Embryonen zu sein schienen.

Mit dem Ziel die Möglichkeit zur Gewinnung von interspezifischen Hybriden zu untersuchen wurden Kreuzungen zwischen *H. macrophylla* und den drei Arten *H. quercifolia*, *H. paniculata* und *H. arborescens* durchgeführt. Anilinblaufärbungen dienten der Untersuchung der Pollenkeimung und des Pollenschlauchwachstums. Keimung und das Einwachsen der Pollenschläuche in den Griffel und z. T. bis in den Bereich der Ovarien wurde nur bei Verwendung von *H. macrophylla* als maternalem Elter beobachtet. Keine der interspezifischen Kreuzungen führte zum Samenanatz an der Pflanze. Durch die Kultur unreifer Samenanlagen in vitro ("embryo rescue") war eine Überwindung der Inkompatibilität und die Gewinnung von potentiellen Hybriden aus den Kreuzungen *H. macrophylla* 'Adria' x *H. paniculata* 'Unique', *H. macrophylla* 'Blaumeise' x *H. paniculata* 'Unique' sowie aus der Kreuzung *H. macrophylla* 'Adria' x *H. quercifolia* 'Pee Wee' möglich. Diese waren jedoch sehr schwachwüchsig und starben in einem frühen Entwicklungsstadium ab. Aufgrund der Hybridletalität war der molekulargenetische Nachweis des Hybridstatus nicht möglich.

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Selbstinkompatibilität bei *Hydrangea* durchgeführt. Es konnte durch Anilinfärbungen keimender Pollen und das Wachstum der Pollenschläuche bis in den Griffel beobachtet werden. Dies bestätigt die in der Literatur vermutete gametophytische Selbstinkompatibilität. In einigen Fällen waren jedoch vereinzelt auch Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen sichtbar und die Gewinnung von potentiellen Selbstungsnachkommen durch "embryo rescue" gelang. Von einer apomiktischen Abstammung dieser Pflanzen wird nicht ausgegangen und RAPD-Analysen lassen eine echte Selbstungsnachkommenschaft vermuten. Das Phänomen der Pseudo-

selbstinkompatibilität könnte eine Erklärung für das Auftreten von Nachkommen aus Selbstungen sein.

**Stichwörter:** *Hydrangea*, In-vitro-Kultur, Selbstinkompatibilität, interspezifische Kreuzungen, "embryo rescue"



## Abstract

The aim of the present study was to develop and establish *in vitro* culture protocols for *Hydrangea*. In a first step *in vitro* shoot tip cultures of four *H. macrophylla* cultivars and of *H. arborescens* 'Annabelle' were established. Subsequently a micropropagation system was optimized testing different media compositions and culture in a temporary immersion system. Cultures grown on solid medium according to Murashige and Skoog and 0,2 mg/l BAP produced the greatest number of shoots. Substitution of Fe-Na-EDTA with Fe-EDDHA and replacement of Plant Agar by Gelrite resulted in better shoot quality and a further increased number of produced shoots. Depending on the genotype propagation rates between 1,2 and 4,3 were observed. In addition culture in a temporary immersion system and culture on a solid medium were compared. Culture in temporary immersion system resulted in higher multiplication rates (3,3) and high plant quality compared to culture on solid media (multiplication rate 1,2).

To establish a regeneration protocol, further experiments focused on the effect of different media compositions on adventitious shoot regeneration. Genotypic differences in regeneration ability were observed. Using leaf explants of *H. macrophylla* 'Adria' or *H. macrophylla* 'Libelle' only a low number of shoots and shoots with succulent habit were observed. However an efficient regeneration protocol for *H. macrophylla* 'Blaumeise' and 'Nachtigall' and for *H. quercifolia* 'Pee Wee' were established, resulting in regeneration of 3 to 5 shoots per regenerating explant.

Despite of different experimental approaches regeneration via somatic embryogenesis could not be observed. However, first indications were obtained that the use of placenta explants might be a promising approach. Placenta explants after transfer to media without plant growth regulators resulted in differentiation of structures that might be somatic embryos.

In addition, the generation of interspecific hybrids was studied. Reciprocal crosses were made between *H. macrophylla* and *H. quercifolia*, *H. paniculata* and *H. arborescens* respectively. Germinating pollen and pollen tubes growing into the style and sometimes into the ovary were only observed when *H. macrophylla* was used as female parent. This was confirmed by aniline blue staining. None of the interspecific crosses resulted in seed set. However, *in vitro* culture of immature ovules by "embryo rescue" resulted in overcoming of incompatibility. This was the case for putative hybrids after crosses of *H. macrophylla* 'Adria' x *H. paniculata* 'Unique', *H. macrophylla* 'Blaumeise' x *H. paniculata* 'Unique' as well as after crosses of *H. macrophylla* 'Adria' x *H. quercifolia* 'Pee Wee'. Due to their reduced viability they died at early seedling stages, so that a molecular verification of the hybrids was not possible.

Furthermore studies concerning self incompatibility in *Hydrangea* were carried out. Germinating pollen and pollen growing into the style after self pollination were observed by aniline blue staining. This finding supports the reported gametophytic self incompatibility in *Hydrangea*. However, in some cases pollen tube growth was observed in the ovary and development of putative self progeny was achieved via "embryo rescue". An apomictic origin is thought to be unlikely and RAPD analysis confirmed that the tested plants were self progenies. The progenies after self pollination may be evidence for pseudo-self-incompatibility.

**Keywords:** *Hydrangea*, *in vitro* culture, self incompatibility, interspecific hybridization, "embryo rescue"

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 In-vitro-Etablierung, -Vermehrung und -Regeneration von <i>Hydrangea</i> Arten und Sorten .....</b>	<b>6</b>
2.1 Material und Methoden .....	6
2.1.1 Pflanzenmaterial .....	6
2.1.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien .....	6
2.1.3 Etablierung von <i>Hydrangea</i> -Arten <i>in vitro</i> .....	9
2.1.4 Erhaltung und Kultur <i>in vitro</i> .....	11
2.1.5 Versuche zur axillaren Sprossvermehrung .....	11
2.1.5.1 Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Vermehrung .....	12
2.1.5.2 Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die Vermehrung .....	13
2.1.5.3 Einfluss der Eisenform auf die Vermehrung .....	15
2.1.5.4 Einfluss des Verfestigungsmittels auf die Vermehrung .....	15
2.1.5.5 Vergleich der Kultur auf Festmedium mit der Kultur in einem permanenten bzw. temporären Immersionssystem.....	15
2.1.6 Versuche zur Regeneration über Organogenese und somatische Embryogenese.....	18
2.1.6.1 Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Regeneration von Adventivsprossen.....	19
2.1.6.2 Einfluss der Wachstumsregulatoren auf die Regeneration von Adventivsprossen.....	20
2.1.6.3 Einfluss der Kohlenhydratquelle auf die Regeneration von Adventivsprossen.....	22
2.1.6.4 Regeneration über somatische Embryogenese .....	22
2.1.7 Statistische Auswertung.....	30
2.2 Ergebnisse.....	31
2.2.1 Etablierung von <i>Hydrangea</i> -Arten <i>in vitro</i> .....	31
2.2.2 Versuche zur axillaren Sprossvermehrung .....	36
2.2.2.1 Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Vermehrung .....	36
2.2.2.2 Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die Vermehrung .....	44
2.2.2.3 Einfluss der Eisenform auf die Vermehrung .....	51
2.2.2.4 Einfluss des Verfestigungsmittels auf die Vermehrung .....	53
2.2.2.5 Vergleich der Kultur auf Festmedium mit der Kultur in einem permanenten bzw. einem temporären Immersionssystem.....	54
2.2.3 Versuche zur Regeneration über Organogenese und somatische Embryogenese.....	58
2.2.3.1 Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Regeneration von Adventivsprossen.....	59

2.2.3.2	Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die Regeneration von Adventivsprossen.....	68
2.2.3.3	Einfluss der Kohlenhydratquelle auf die Regeneration von Adventivsprossen.....	81
2.2.3.4	Regeneration über somatische Embryogenese .....	87
2.3	Diskussion .....	107
2.3.1	Etablierung von Hydrangea-Arten in vitro .....	107
2.3.2	Axillare Sprossvermehrung .....	108
2.3.3	Adventivsprossregeneration.....	112
2.3.4	Regeneration über somatische Embryogenese .....	118
<b>3</b>	<b>Hybridisierungen und Untersuchungen zur Kompatibilität.....</b>	<b>122</b>
3.1	Material und Methoden .....	122
3.1.1	Pflanzenmaterial .....	122
3.1.2	Pollenlagerung, Bestimmung von Pollenvitalität und -keimung in vitro .....	123
3.1.3	Durchführung der Kreuzungen .....	124
3.1.4	Aussaaten .....	126
3.1.5	Färbung der Pollenschläuche mit Anilinblau.....	127
3.1.6	Durchführung des "embryo rescue"-Verfahrens.....	130
3.1.7	Molekulargenetische Untersuchung der Selbstungsnachkommen .....	132
3.1.7.1	DNA-Isolierung nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997).....	132
3.1.7.2	Agarosegelelektrophorese.....	133
3.1.7.3	Quantifizierung der DNA mittels Agarosegel .....	133
3.1.7.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Erstellung von RAPD-Markern.....	134
3.2	Ergebnisse.....	136
3.2.1	Pollenlagerung .....	136
3.2.2	Färbung der Pollenschläuche mit Anilinblau.....	138
3.2.3	Entwicklung der Samenkapseln an der Pflanze.....	144
3.2.4	Versuche zum "embryo rescue"-Verfahren .....	145
3.2.4.1	Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens in der ersten Kreuzungsperiode (2006) .....	146
3.2.4.2	Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens in der zweiten Kreuzungsperiode (2007) .....	150
3.2.5	Weiterkultur der durch Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens gewonnenen Pflanzen .....	155
3.2.6	Molekulargenetische Untersuchung der Selbstungsnachkommen .....	159
3.3	Diskussion .....	161

3.3.1	Pollenlagerung .....	161
3.3.2	Intraspezifische Kreuzungen innerhalb der Art <i>H. macrophylla</i> .....	162
3.3.3	Interspezifische Kreuzungen von <i>Hydrangea spec.</i> .....	166
3.3.4	Selbstungen von <i>Hydrangea spec.</i> .....	169
<b>4</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>173</b>
<b>5</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>186</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
2,4D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2iP	6-(-Dimethylallylamino)purin
A.	Aqua
B5	Gamborg et al.
BAP	6-Benzylaminopurin
DKW	Driver und Kuniyuki (1984)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Fe-EDDHA	Eisen-Ethylendiamin-di-(o-Hydroxyphenyl)-Essigsäure
Fe-Na-EDTA	Eisen-Natrium-Ethylendinitrilotetraessigsäure
Expl.	Explantat
g	Gramm
GA <sub>3</sub>	Gibberellinsäure A3
h	Stunde
<i>H.</i>	<i>Hydrangea</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
Kin	Kinetin
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MS	Murashige und Skoog (1962)
mTop	meta-Topolin
MTT	Diphenyl-tetrazoliumbromid
NAA	1-Naphtylessigsäure
ng	Nanogramm
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PIS	permanent immersion system
PS	Petrischale(n)
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
spec.	species
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TDZ	Thidiazuron
TIS	temporary immersion system
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (units)
WPM	Woody Plant Medium (Lloyd und McCown 1980)
Zea	Zeatin

# 1 Einleitung

Die Gattung *Hydrangea* gehört mit ihren rund 23 Arten zur Familie der *Hydrangeaceae* (MCCLINTOCK 1957). Eine der in dieser Arbeit verwendeten Arten ist *H. macrophylla* mit ihren ball- bzw. tellerförmigen Blüten. Sie hat ihren Ursprung in Asien (HAWORTH-BOOTH 1950, KUHLEN 1956). Dort fand Karl Peter Thunberg am Ende des 18. Jahrhunderts eine Pflanze mit einer großen kugeligen Blüte. Aufgrund der Ähnlichkeit mit einem Gartenschneeball, ordnete er die Pflanze der Gattung *Viburnum* zu und benannte sie aufgrund der großen Laubblätter *Viburnum macrophylla*. Im Jahr 1789 brachte Sir Joseph Banks eine Gartenvarietät von China nach England, wo sie den Namen *Hydrangea hortensis* erhielt. Obwohl der eigentlich gültige Name, der von Thunberg vergeben war, wurden noch diverse andere Bezeichnungen wie *Hortensia opuloides* oder *Hydrangea hortensia* veröffentlicht. Erst im Jahr 1830 erfolgte durch den Botaniker Séringe die offizielle Zuordnung zur Gattung *Hydrangea* und der endgültige Name ist *Hydrangea macrophylla* (Thunberg) Séringe. In der Mitte des 19. Jahrhunderts erwachte das Interesse der Züchter und sie schickten Pflanzensammler nach Asien. Auf diesem Weg gelangten weitere Pflanzen nach Europa, die als Grundlage für die Hortensienzüchtung dienten. Anzumerken ist, dass es sich bei der heutigen Art *H. macrophylla* nicht um eine reine Art handelt, sondern vielmehr um Hybriden, die großer Wahrscheinlichkeit nach auf Kreuzungen mit der von Joseph Banks eingeführten Varietät (aufgrund ihres natürlichen Standortes an Japans Küsten, erfolgte später die Zuordnung zur Art *Hydrangea maritima*) und der im Wald beheimateten Spezies *H. japonica*, *H. acuminata* und *H. thunbergii* sind (HAWORTH-BOOTH 1950, KUHLEN 1956).

Ebenfalls in dieser Arbeit verwendet wurde die auch aus Asien stammende Art *H. paniculata*. Hierbei handelt es sich um einen absolut winterharten Strauch, der aufgrund seiner länglichen Blütenstände auch Rispenhortensie genannt wird. Neben diesen beiden aus Asien stammenden Arten wurden zwei weitere, in Nordamerika beheimatete Arten, verwendet. Zum einen *H. quercifolia*, die durch ihre dekorativen, eichenförmigen Blätter besticht, die durch Rotfärbung im Herbst ihren Zierwert noch erhöhen. Und zum anderen *H. arborescens*, die sich durch ihre extrem großen Blütenbälle auszeichnet, die teilweise einen Durchmesser von 25 cm erreichen können (MALLET 2008).

Die wirtschaftlich bedeutendste Art ist *Hydrangea macrophylla*. Laut der Gesellschaft für Konsumforschung, die u. a. im Auftrag der Zentralen Markt- und Preisberichtsstelle GmbH (ZMP) und der Centralen Marketing-Gesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft (CMA) Erhebungen über private Einkäufe von Blumen und Pflanzen durchführten,

waren Hortensien (im wesentlichen *H. macrophylla*) im Jahr 2007 mit einem Marktanteil von 6 % auf Platz vier der Top-10-Liste der wichtigsten blühenden Pflanzen. Der gesamte Hortensienmarkt wird durch die ZMP auf einen Gesamtwert von 70 bis 80 Millionen Euro jährlich geschätzt (HANKE 2008). Neben dem Absatz als Topf- bzw. Gartenpflanze werden auch Schnitthortensien für den floristischen Bedarf produziert. Bei den niederländischen Versteigerungen (VBN) wurden 2005 und 2006 im Mittel 0,95 € pro Blüte erzielt. Damit lag die Hortensie beim Vergleich von 42 Schnittblumen auf Platz drei hinter *Cymbidium* (2,09 €) und *Strelitzia* (1,32 €) (VAKBLAD VOOR DE BLOEMISTERIJ 2007).

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts zwischen dem Julius-Kühn-Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst (JKI), der Firma Synergy Breeding und der Leibniz Universität Hannover bzw. der Forschungsanstalt für Gartenbau Weihestein durchgeführt. Ziel des gemeinsamen Forschungsprojektes war die Erweiterung der Zuchtmethodik und die Erarbeitung eines integrativen Züchtungsschemas zur effektiven Entwicklung neuer Sorten bei *H. macrophylla*. Mit dem Ziel die genetische Variabilität zu erweitern wurden am JKI Untersuchungen zur Mutationsinduktion *in vivo* und *in vitro* und Polyploidisierungen durchgeführt. Außerdem wurden Methoden zur molekulargenetischen und cytogenetischen Charakterisierung des vorhandenen Zuchtmaterials entwickelt. Die Sammlung und züchterische Evaluation von *Hydrangea*-Arten und -Sorten erfolgte durch die Firma Synergy Breeding. Ebenso wurden von diesem Partner intra- und interspezifische Hybridisierungen zur Erweiterung der genetischen Variabilität durchgeführt

Hortensien werden vorwiegend konventionell gezüchtet. Dies ist zum einen zeitaufwendig und zum anderen sind die Möglichkeiten moderner Züchtungsmethoden nicht ausgeschöpft. So bietet zum Beispiel die In-vitro-Kultur verschiedene Möglichkeiten für eine effizientere Züchtung von *Hydrangea*. Durch die Regeneration, d. h. die Neubildung von Organen aus nur einer bzw. wenigen Zellen ist die Gewinnung von Pflanzen möglich. Dies lässt sich hervorragend in der Mutationszüchtung nutzen, da die z. B. durch Röntgenstrahlung hervorgerufenen Veränderungen immer nur eine Zelle betreffen, und eine Pflanze, die sich aus dieser Zelle entwickelt, diese Veränderung bereits in all ihren Zellen trägt. Ohne ein In-vitro-Regenerationssystem entstehen vorrangig

Chimären, und es müssten die veränderten Zellen aufwendig über eine Vielzahl vegetativer Vermehrungszyklen angereichert werden. Das Vorhandensein eines effizienten Regenerationssystems ist ebenso Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung gentechnischer Methoden bei *Hydrangea*. Es gibt nur eine eingeschränkte Zahl an Berichten über die In-vitro-Kultur von *Hydrangea spec.* STOLTZ (1984) beschreibt die erfolgreiche In-vitro-Vermehrung von *H. macrophylla* 'Merveille' über Axillarsprossbildung sowie die anschließende Bewurzelung und Akklimatisierung der Pflanzen. In der Arbeit von BAILEY ET AL. (1986) wurden der Einfluss zweier Cytokinine sowie der Einfluss der Nährsalzzusammensetzung und des Verfestigungsmittels auf die Axillarsprossbildung bei *H. macrophylla* 'Rose Supreme' untersucht. Zur Adventivsprossregeneration bei *H. macrophylla* lässt sich nur eine Arbeit von BOCCON-GIBOD ET AL. (2000) finden. In dieser wurden Blatt- und Internodienexplantate von drei Sorten verwendet. Je nach Nährmedienzusammensetzung beschreiben die Autoren direkte bzw. indirekte (nach Bildung von Kallus) Regeneration von Sprossen. Neben den erwähnten Untersuchungen an der Art *H. macrophylla* gibt es auch einige wenige Berichte über die In-vitro-Kultur von *H. quercifolia*. SEBASTIAN UND HEUSER (1987) beschreiben die Vermehrung durch Axillarsprossbildung sowie die Regeneration von Adventivsprossen nach Kallusbildung (indirekte Regeneration) an Blattexplantaten. LEDBETTER UND PREECE (2004) berichten von einer gesteigerten Anzahl von Adventivsprossen wenn die Kultur auf Medien mit Thidiazuron (TDZ) durchgeführt wurde. Berichte über die In-vitro-Kultur der ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendeten Art *H. arborescens* liegen nicht vor.

Neben der Adventivsprossregeneration ist die somatische Embryogenese ein effizientes Regenerationsverfahren. Hier werden bipolare Strukturen (somatische Embryonen) gebildet, die eine ähnliche Entwicklung wie zygotische Embryonen durchlaufen, aber nicht durch die Verschmelzung von Gameten entstehen, sondern asexuell aus somatischem Gewebe. Während es bereits eine Vielzahl an Untersuchungen bei anderen Arten gibt (z. B. *Daucus*: REINERT 1958, STEWARD ET AL. 1958, *Pelargonium*: MARSOLAIS ET AL. 1991, VISSER ET AL. 1992, WILSON ET AL. 1996, *Cyclamen*: WINKELMANN ET AL. 2000) gibt es keine Berichte über somatische Embryogenese bei *Hydrangea*.

Erstes Ziel dieser Arbeit war der Aufbau einer In-vitro-Sprosskultur. Die Vermehrung der etablierten Sorten sollte zum einen aufzeigen, inwieweit eine Anpassung der Nährmedienzusammensetzung an einzelne Genotypen notwendig ist und zum anderen waren die Sprosskulturen Ausgangsmaterial für die anschließende Entwicklung eines effizien-



ten Regenerationssysteme und Grundlage für die Realisierung der In-vitro-Mutations- und -Polyploidisierungsversuche des Kooperationspartners.

Interspezifische Kreuzungen innerhalb der Gattung *Hydrangea* bieten die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Sorten, die wünschenswerte Merkmale verschiedener Arten kombinieren. So bieten die Blüten von *H. macrophylla* ein breites Farbspektrum von weiß über verschiedene Rosa- zu diversen Rottönen. Außerdem können einige rosa Sorten, durch Absenken des pH-Wertes im Substrat und Aufnahme und Transport von Aluminium in die Sepalen zur Bildung blauer Farbstoffkomplexe angeregt werden. Ein Nachteil von *H. macrophylla* ist die Frostempfindlichkeit. Der Knospenansatz erfolgt bereits an Trieben des Vorjahres und diese werden durch niedrige Temperaturen im folgenden Winter geschädigt. Ein wünschenswertes Zuchtziel wäre daher eine Kombination der Blütenfarben von *H. macrophylla* mit der Kältetoleranz von *H. paniculata*, *H. quercifolia* oder *H. arborescens*.

Obwohl bereits, insbesondere bei der Art *H. macrophylla*, eine Vielzahl von Sorten entwickelt wurden, gibt es nur sehr wenige Veröffentlichungen die sich mit der Blütenbiologie, der Phylogenie und mit Kompatibilitäts- bzw. Inkompatibilitätsmechanismen bei *Hydrangea* beschäftigen.

Zur Selbstinkompatibilität bzw. -kompatibilität lassen sich widersprüchliche Aussagen in der Literatur finden. Während KUDO UND NIIMI (1999a) nach Selbstung von *H. arborescens* und *H. macrophylla* die Bildung von Samen beschrieben, beobachtete REED (2000a) das Absterben der Blüten relativ kurz nach Selbstung von *H. arborescens*. Bei Selbstungen von *H. macrophylla* konnte REED (2000a) bei nur einer (*H. macrophylla* 'Alpenglühchen') von 12 verwendeten Sorten den Ansatz einer geringen Anzahl vitaler Samen und die Entwicklung eines Sämlings über das Kotyledonenstadium hinaus beobachten. Bei den Arten *H. paniculata* und *H. quercifolia* wird gametophytische Selbstinkompatibilität vermutet (MORTREAU ET AL. 2003, REED 2004a). Mikroskopische Untersuchungen zeigten hier Pollenkeimung mit anschließendem verlangsamten Wachstum des Pollenschlauches bis in den Griffel (REED 2004a). Untersuchungen an weiteren *Hydrangea*-Arten (*H. involucrata*, *H. aspera*, *H. anomala*) lassen auch hier gametophytische Selbstinkompatibilität vermuten (MORTREAU ET AL. 2003).

KUDO UND NIIMI (1999a, b) berichten über die Hybridisierungen zwischen *H. macrophylla* und *H. arborescens*, bei denen eine erfolgreiche Befruchtung der Samenanlagen durch den Pollen stattgefunden hat. Die daraus entstandenen Embryonen starben aber im

Kotyledonenstadium ab. Durch die Regeneration aus Kallus, der vereinzelt an Kotyledonen gebildet wurde, ist die Gewinnung von Hybridpflanzen aus einer Kreuzung gelungen. Mit Hilfe von RAPD-Analysen und durch Chromosomenzählungen wurden diese Pflanzen als Hybride charakterisiert. Die Chromosomenzahl der Hybride betrug  $2n = 42$  und die des Elter *H. macrophylla* 'Blue Sky' betrug  $2n = 52$ , bzw. von *H. arborescens* 'Annabelle'  $2n = 38$  (KUDO UND NIIMI 1999b). Bei weiteren interspezifischen Kreuzungen konnten, ebenfalls nur durch die Kultur der unreifen Samen in vitro ("embryo rescue"-Verfahren), Nachkommen erzielt werden (REED 2000b, REED ET AL. 2001). Das Vorhandensein postzygotischer Faktoren, die die Entwicklung des Embryos verhindern, scheint hier der limitierende Faktor für die erfolgreiche Kreuzung der Arten zu sein. Weiterhin wurde häufig beobachtet, dass Kreuzungen nur in einer Richtung zur Entwicklung von Embryonen führen, die reziproke Kreuzung jedoch erfolglos bleibt (REED 2000a, MORTREAU ET AL. 2003)

Weiteres Ziel dieser Arbeit war die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Pollenkeimung, sowohl nach intraspezifischer Kreuzung innerhalb der Art *Hydrangea macrophylla*, als auch nach Selbstungen und interspezifischen Kreuzungen sowie Untersuchungen zum Samenanatz und zur Samenkeimung. Diese sollten Aufschluss über die Art der Inkompatibilitätsmechanismen nach Selbstung und nach Hybridisierungen geben, um anschließend Methoden zur Überwindung dieser Mechanismen und Verfahren zum "embryo rescue" zu entwickeln.

## 2 In-vitro-Etablierung, -Vermehrung und -Regeneration von *Hydrangea* Arten und Sorten

### 2.1 Material und Methoden

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Die Gewächshauspflanzen wurden von der Firma Synergy Breeding, Havixbeck zur Verfügung gestellt. Die In-vitro-Sprosse der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' wurden von Frau Dr. A. Schum (JKI, Groß Lüsewitz) etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die In-vitro-Kulturen der anderen Sorten und Arten wurden wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, etabliert.

Tabelle 2-1: Verwendete *Hydrangea*-Arten und -Sorten sowie deren Eigenschaften

Art	Sorte	Blütenfarbe	Blütenform	Wuchstyp	Ploidiestufe
<i>H. macrophylla</i>	'Nachtigall'	dunkelviolett	Teller	niedrig bis halbhoch	triploid
<i>H. macrophylla</i>	'Sensation 75'	rosa mit weißem Rand	Ball	schwachwüchsig	diploid
<i>H. macrophylla</i>	'Adria'	rosa (blau färbbar)	Ball	kompakt	diploid
<i>H. macrophylla</i>	'Libelle'	weiß	Teller	mittelstark, bis 2 m, leicht überhängende Zweige	diploid
<i>H. macrophylla</i>	'Blaumeise'	rosa (blau färbbar)	Teller	stark wachsend bis 2m	triploid
<i>H. macrophylla</i>	'Doris'	röt	Ball	kompakt	diploid
<i>H. arborescens</i>	'Annabelle'	weiß	Ball	verzweigter Strauch bis 2 m, leicht überhängende Zweige	diploid
<i>H. quercifolia</i>	'Pee Wee'	weiß	Rispe	Strauch bis 2 m	diploid

#### 2.1.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Nährmedienzusammensetzungen verwendet. Da eine Vielzahl von Medienvariationen getestet wurden, finden sich in diesem Kapitel nur die Grundzusammensetzungen der Makro- und Mikronährstoffe (Tabelle 2-2 bis Tabelle 2-5) der jeweiligen Medien sowie die Zusammensetzung der verwendeten Vitamine und weitere organische Bestandteile (Tabelle 2-6). Die weitere Zusammensetzung der in den Versuchen verwendeten Medien ist in den jeweiligen Versuchskapiteln aufgelistet.

**Tabelle 2-2: Zusammensetzung der Makro- und Mikronährstoffe nach MURASHIGE UND SKOOG (MS) (1962)**

Medienbestandteile	Konzentration (mg/l)	Molarität
Makroelemente		(mM)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,61
KNO <sub>3</sub>	1900	18,79
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	442	2,99
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25
Mikroelemente		(μM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	100,27
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	16,9	100
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,6	29,91
KJ	0,83	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25	1,03
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,11

**Tabelle 2-3: Zusammensetzung der Makro- und Mikronährstoffe nach GAMBORG ET AL. (B5) (1968)**

Medienbestandteile	Konzentration (mg/l)	Molarität
Makroelemente		(mM)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	1,02
KNO <sub>3</sub>	2500	24,73
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	113,24	1,02
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	121,56	1,01
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130,44	1,09
Mikroelemente		(μM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	48,52
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	10	59,16
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2	6,96
KJ	0,75	4,52
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25	1,03
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,11

**Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Makro- und Mikronährstoffe nach LLOYD UND McCOWN (WPM) (1980)**

<b>Medienbestandteile</b>	<b>Konzentration (mg/l)</b>	<b>Molarität</b>
Makroelemente		(mM)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	471,26	2,35
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	180,54	1,01
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990	5,68
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	72,5	
Mikroelemente		(µM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	100,27
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	22,30	131,94
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,6	29,91
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25	1,03
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,25	1,0

**Tabelle 2-5: Zusammensetzung der Makro- und Mikronährstoffe nach DRIVER UND KUNIYUKI (DKW) (1984)**

<b>Medienbestandteile</b>	<b>Konzentration (mg/l)</b>	<b>Molarität</b>
Makroelemente		(mM)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1416	17,70
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1960,38	8,30
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	148,49	1,01
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	361,49	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	265	1,95
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1559	8,95
Mikroelemente		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,80	77,63
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	33,8	200
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	17	72,19
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,39	1,61
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,25	1

**Tabelle 2-6: Zusammensetzung der Vitamine und anderer organischer Bestandteile nach MURASHIGE UND SKOOG (1962)**

<b>Medienbestandteile</b>	<b>Konzentration (mg/l)</b>	<b>Molarität (µM)</b>
Glycin	2	26,64
Myo-Inosit	100	554,94
Nikotinsäure	0,5	4,06
Pyridoxin-HCl	0,5	2,43
Thiamin-HCl	0,1	0,3

Tabelle 2-7: Zusammensetzung der Vitamine und anderer organischer Bestandteile nach GAMBORG ET AL. (1968)

Medienbestandteile	Konzentration (mg/l)	Molarität ( $\mu\text{M}$ )
Myo-Inosit	100	554,94
Nikotinsäure	1	8,12
Pyridoxin-HCl	1	4,86
Thiamin-HCl	10	29,65

Der pH-Wert aller Medien wurde vor dem Autoklavieren mit Hilfe eines pH-Meters auf 5,7 bzw. bei dem Etablierungsmedium auf 5,8 eingestellt. Die Sterilisation der Medien erfolgte in einem Autoklaven bei 121 °C und 210 kPA für 15 min. Hitzeinstabile Verbindungen wie Zeatin, GA<sub>3</sub> und Flurprimidol wurden als sterilfiltrierte Stammlösung dem auf ca. 60 °C abgekühlten Medium vor dem Abfüllen in die Kulturgefäße zugefügt. Für die Regenerations- und Etablierungsversuche wurde das Medium in Plastikpetrischalen (Sarstedt) mit einem Durchmesser von 6 cm abgefüllt (10 ml/Petrischale). Die Vermehrungsmedien wurden entweder in 150 ml-Glasgefäße (25 ml/Glas) mit Twist-off Deckeln, in die ein Filterpapier gelegt wurde, oder in 500 bzw. 250 ml-Plastikgefäße (80 ml/Becher) ausgegossen.

### 2.1.3 Etablierung von *Hydrangea*-Arten *in vitro*

Zur Etablierung steriler Sprosskulturen wurden Apikalknospen von Trieben von Gewächshauspflanzen geerntet. Zusätzlich wurden zu einem Termin Axillarknospen von Pflanzen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' geerntet, um den Etablierungserfolg beider Explantattypen zu vergleichen. Die Oberflächensterilisation erfolgte in 3 % Natriumhypochlorit (mit einem Tropfen Tween 20) für 20 Minuten und anschließendem Waschen in sterilem Wasser für 1, 2 und 5 min. Im Anschluss an die Sterilisation erfolgte die Präparation unter dem Binokular (Stemi 2000 C, Zeiss), indem die Wachstumszone schrittweise entblättert und soweit freigelegt wurde, bis der meristematische Bereich geschnitten werden konnte (Abbildung 2-1).



**Abbildung 2-1: Sprossspitze nach schrittweisem Entblättern**  
(Die rote Linie kennzeichnet den letzten Schnitt zur Präparation des Explantats.)

Nach der Präparation der Explantate wurden deren Durchmesser ermittelt, um so die optimale Explantatgröße für eine erfolgreiche In-vitro-Etablierung zu ermitteln. Im Anschluss wurden die Sprossspitzen auf Etablierungsmedium nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) (Tabelle 2-2) mit Vitaminen nach GAMBORG ET AL. (1968) (Tabelle 2-7), 36,7 mg/l Fe-Na-EDTA, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>, 30 g/l Saccharose sowie 8 g/l Plant Agar aufgelegt. Die Kultur der Präparate erfolgte zu Beginn in 6 cm-Petrischalen. In einem Turnus von vier Wochen wurden die Explantate auf frisches Medium gleicher Zusammensetzung überführt. Bei Entwicklung von Pflänzchen wurden diese in Gläsern auf MS-Medium (Tabelle 2-2) mit halber Nährstoffkonzentration, Vitaminen nach GAMBORG ET AL. (1968) (Tabelle 2-7), 36,7 mg/l Fe-Na-EDTA, 0,2 mg/l BAP, 1 mg/l GA<sub>3</sub>, 10 g/l Saccharose, 15 g/l Glukose sowie 8 g/l Plant Agar weiterkultiviert. Einige der entwickelten Sprosse waren sehr klein, so dass diese erst auf Medium der beschriebenen Zusammensetzung jedoch ohne Zugabe von BAP kultiviert wurden, um so eine Sprosstreckung zu erzielen.

Die Entwicklung der präparierten Sprossspitzen wurde zwei und vier Wochen nach Präparation und anschließend alle vier Wochen bonitiert. Hierbei wurden folgende Parameter erfasst: Austritt von Endophyten und andere Kontaminationen, Absterben, Entwicklung von Kallus, ausschließlich Blattentwicklung und die erfolgreiche Entwicklung zu Sprossen. Dies geschah über einen Zeitraum von maximal 20 Wochen. Unsterile Explantate, die auf endogene Kontaminationen zurückzuführen waren, traten während der gesamten Kultur auf. In einigen Fällen war die Kontamination erst nach Sprossentwicklung sichtbar. Diese Sprosse wurden in die Boniturklasse „kontaminiert“ ein-

geordnet. Einige der Explantate bildeten Kallus und starben anschließend ab, ihre Einordnung erfolgte in die Klasse der abgestorbenen Explantate.

Die in den Etablierungsversuchen verwendeten *Hydrangea*-Sorten und Arten sowie der Zeitraum der Präparation, die Explantatart und die Anzahl der präparierten Explantate pro Termin sind in Tabelle 2-8 dargestellt.

**Tabelle 2-8: Pflanzenmaterial, Präparationszeitraum sowie Anzahl und Art der Explantate zur In-vitro-Etablierung**

<b>Art</b>	<b>Sorte</b>	<b>Explantattyp</b>	<b>Präparationszeitraum</b>	<b>Anzahl Präparationstermine (Anzahl Explantate pro Termin)</b>
<i>H. macrophylla</i>	'Sensation 75'	Apikalknospen	Mai/Juni 05	4 (15, 12, 12, 15)
<i>H. macrophylla</i>	'Sensation 75'	Axillarknospen	Jun 05	1 (50)
<i>H. macrophylla</i>	'Libelle'	Apikalknospen	Mai/Juni 05	4 (13, 12, 12, 18)
<i>H. macrophylla</i>	'Adria'	Apikalknospen	Mai 05	3 (15, 20, 10)
<i>H. macrophylla</i>	'Blaumeise'	Apikalknospen	Mai/Juni 05	3 (17, 7, 14)
<i>H. macrophylla</i>	'Doris'	Apikalknospen	Juli-Sept. 05/Mai 06	5 (21, 19, 26, 19, 36)
<i>H. arborescens</i>	'Annabelle'	Apikalknospen	Sep 06	1 (19)

#### **2.1.4 Erhaltung und Kultur *in vitro***

Die Kultur der bereits *in vitro* etablierten Sprosskulturen erfolgte bei 24 °C, einem Licht/Dunkelrhythmus von 16/8 h und einer Beleuchtungsstärke von 20 - 40 µMol/m<sup>2</sup>s entweder in Glasgefäßen mit Twist-off Deckeln oder in Plastikbechern.

Die Versuche wurden mit Sprossen durchgeführt, die zuvor mindestens zwei Kulturpassagen à sechs Wochen auf Medium ohne Wachstumsregulatoren bzw. Medium mit 0,2 mg/l BAP und 1 mg/l GA<sub>3</sub> kultiviert worden waren.

#### **2.1.5 Versuche zur axillaren Sprossvermehrung**

Im Anschluss an die In-vitro-Etablierung wurden Versuche zur Vermehrung über axillare Sprosse durchgeführt. Als Explantate dienten, sofern nicht anders beschrieben, In-vitro-Kopfstecklinge mit zwei Blattpaaren. Der Einfluss verschiedener Medienformulierungen, Wachstumsregulatoren und weiterer Medienbestandteile wurde ebenso untersucht wie der Einfluss der Kultur in flüssigem bzw. auf festem Nährmedium.

Die Darstellung der Versuche im Folgenden entspricht nicht der zeitlichen Abfolge der Versuchsanstellung. Während der Pflanzenkultur kam es zu Verschlechterungen der Qualität einiger Sprosse, so dass zwischenzeitlich verschiedene Untersuchungen zur Steigerung der Qualität durchgeführt wurden. Aufgrund der Erkenntnisse aus diesen



Versuchen wurde häufig in den zweiten Versuchsdurchgängen eine andere Eisenform bzw. ein anderes Verfestigungsmittel verwendet.

In den Versuchen, die auf Festmedium durchgeführt wurden, kamen, wenn nicht anders beschrieben, pro Medienvariante sechs Kulturgefäße mit je fünf Sprossen zur Anwendung. Die Kultur der Pflanzen erfolgte für zwei mal sechs Wochen. Nach der ersten Kulturpassage wurde von jeder Pflanze ein Kopfsteckling geerntet und auf frischem Medium der gleichen Zusammensetzung erneut für sechs Wochen kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Bonitur auf die Anzahl der zu gewinnenden Mikrostecklinge, auf die Pflanzengröße, die Kallus- sowie die Wurzelbildung. Die Vermehrung der Sprosse erfolgte, indem die Pflanzen zwischen den Nodien geschnitten und so Mikrostecklinge gewonnen wurden. Im Folgenden werden diese Mikrostecklinge als In-vitro-Stecklinge bezeichnet. Es erfolgte eine Unterscheidung in In-vitro-Kopf- und Basisstecklinge, In-vitro-Teilstecklinge wurden zu In-vitro-Basisstecklingen gezählt (Abbildung 2-2). Neugebildete Axillarsprosse wurden als In-vitro-Kopfstecklinge gezählt bzw. es erfolgte bei ausreichender Sprosslänge eine Teilung in Kopf- und Teil- bzw. Basisstecklinge.

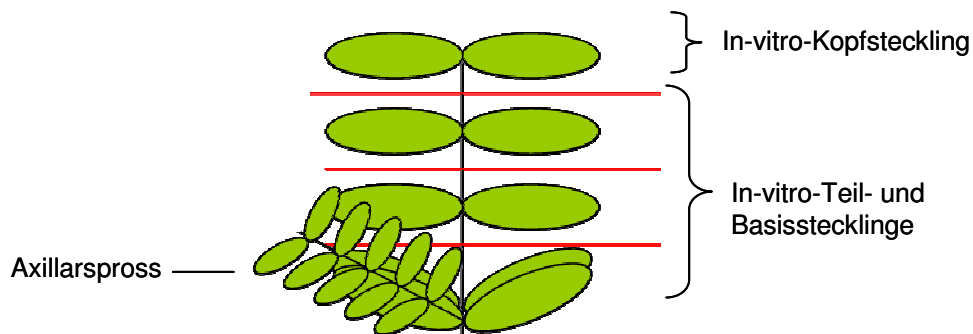


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Mikrostecklingsarten

Die Ermittlung der Vermehrungsraten erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Vermehrungsrate} = \frac{\text{Anzahl verwertbarer In-vitro-Stecklinge}}{\text{Anzahl eingesetzter Sprosse}}$$

### 2.1.5.1 Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Vermehrung

In dieser Versuchsreihe fanden Medien nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) (Tabelle 2-2), nach GAMBORG ET AL. (1968) (Tabelle 2-3) und in Versuch vier das Medium nach DRIVER UND KUNIYUKI (1984) (Tabelle 2-5) jeweils in voller und halber Nährsalzkon-

zentration Verwendung. Es wurde die Vitaminzusammensetzung nach GAMBORG ET AL. (1968) (Tabelle 2-7) verwendet. Zusätzlich wurden den Medien

- 1 mg/l GA<sub>3</sub>,
- 0,2 mg/l BAP,
- 10 g Saccharose und
- 15 g/l Glukose zugefügt.

Die in dieser Versuchsreihe verwendeten Genotypen sowie Konzentration und Art des Verfestigungsmittels und der Eisenform sind in Tabelle 2-9 dargestellt.

**Tabelle 2-9: Versuchsparameter zum Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die axillare Sprossvermehrung**

Versuchsnummer	Versuchsdurchgang	Sorte	Medienvariante	Eisenform	Verfestigungsmittel
Verm 1	1	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	MS	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar
			1/2 MS		
	B5	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite		
	1/2 B5				
2	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	MS	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite	
		1/2 MS			
		B5			
Verm 2	1	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	MS	85,6 mg/l Fe-EDDHA	8 g/l Plant Agar
			1/2 MS		
			B5		
	2	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	MS	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite
			1/2 MS		
			B5		
Verm 3	1	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	MS	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar
			1/2 MS		
			B5		
	2	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	MS	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite
			1/2 MS		
			B5		
			1/2 B5		

### 2.1.5.2 Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die Vermehrung

In dieser Versuchsreihe wurden In-vitro-Kopfstecklinge auf Medien mit Makro- und Mikronährsalzen nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) (Tabelle 2-2) in halber Konzentration und B5-Vitaminen (Tabelle 2-7) verwendet. Zusätzlich enthielten alle Medien 10 g/l Glukose und 15 g/l Saccharose.

Die untersuchten Sorten sowie die Wachstumsregulatoren, das Verfestigungsmittel, die Eisenform und deren Konzentrationen sind in Tabelle 2-10 dargestellt.

Tabelle 2-10: Versuchsparameter der Versuche zum Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die axillare Sprossvermehrung

Versuchsnummer	Versuchsdurchgang	Pflanzenart/-sorte	Wachstumsregulatoren	Eisenform	Verfestigungsmittel	Bemerkungen
Verm 4	1	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	0,05 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 0,2 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l meta-Topolin + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite	
	2	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	0,05 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 0,2 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l meta-Topolin + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite	
Verm 5	1	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	0,05 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 0,2 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l meta-Topolin + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar	Explantatspenderpflanzen sehr chlorotisch
	2	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	0,05 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 0,2 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l meta-Topolin + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite	
Verm 6	1	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	0,05 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 0,2 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l meta-Topolin + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar	
	2	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	0,05 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 0,2 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l meta-Topolin + 1 mg/l GA <sub>3</sub> 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite	
Verm 7	1	<i>H. macrophylla</i> 'Annabelle'	1/2 MS + 0,5 mg/l Flurprimidol 1/2 MS + ohne Flurprimidol	85,6 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite	mangels ausreichend Pflanzenmaterials nur je 4 Becher mit 3 bzw. 4 Explantaten

### 2.1.5.3 Einfluss der Eisenform auf die Vermehrung

Aufgrund der schlechten Qualität der Sprosse der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' wurde ein Versuch angelegt, bei dem sowohl die Art der Eisenform verändert wurde als auch eine weitere Nährsalzzusammensetzung getestet wurde (Tabelle 2-11). Die Chelatform Fe-Na-EDTA wurde durch den Eisendünger SEQUESTREN<sup>®</sup> der Firma Syngenta, der die Chelatform Fe-EDDHA enthält, ersetzt. Alle Medien enthielten B5-Vitamine (Tabelle 2-7) und folgende Zusätze:

- 1 mg/l GA<sub>3</sub>,
- 0,2 mg/l BAP,
- 10 g/l Saccharose,
- 15 g/l Glukose und
- 3,8 g/l Gelrite.

**Tabelle 2-11: Versuchsparameter zum Einfluss der Eisenform auf die Vermehrung**

Nährsalze	Eisenform	Konzentration (mg/l)	Molarität (µM)
1/2 MS	Fe-Na-EDTA	36,7	100
1/2 MS	Fe-EDDHA	42,82	100
1/2 MS	Fe-EDDHA	85,64	200
1/2 DKW	Fe-Na-EDTA	36,7	100

### 2.1.5.4 Einfluss des Verfestigungsmittels auf die Vermehrung

In dieser Versuchsreihe erfolgte eine Variation des Verfestigungsmittels. Es wurden Medien mit dem bisher verwendeten Plant Agar (8 g/l) (Duchefa) mit Medien, denen Gelrite (3,8 g/l) (Duchefa) als Verfestigungsmittel zugefügt wurde, verglichen. Als Grundmedium wurde 1/2-MS Medium (Tabelle 2-2) mit B5-Vitaminen (Tabelle 2-7) 10 g Saccharose, 15 g/l Glukose, 36,7 mg/l Fe-Na-EDTA, 0,2 mg/l BAP und 1 mg/l GA<sub>3</sub> verwendet. Als Explantate dienten Sprossspitzen von *H. macrophylla* 'Nachtigall'.

### 2.1.5.5 Vergleich der Kultur auf Festmedium mit der Kultur in einem permanenten bzw. temporären Immersionssystem

Im Versuch mit der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' wurde die Kultur auf Festmedium, mit der Kultur bei permanenter (PIS, permanent immersion system) sowie temporärer Immersion (TIS, temporary immersion system) verglichen (DOIL ET AL. 2008). Als Kulturmedium wurde MS-Medium (Tabelle 2-2) mit B5-Vitaminen (Tabelle 2-7) sowie 1 mg/l GA<sub>3</sub>, 0,2 mg/l BAP, 10 g/l Saccharose, 15 g/l Glukose und 36,7 mg/l Fe-Na-

EDTA verwendet. Für die Kultur auf Festmedium wurden dem Medium 8 g/l Plant Agar zugefügt. Die weiteren Versuchsparameter sind Tabelle 2-12 zu entnehmen.

Tabelle 2-12: Versuchsvarianten zum Einfluss der Kulturmethode auf die Vermehrung von *H. macrophylla* 'Nachtigall'

Variante	Kulturmethode	Anzahl und Art der Kulturgefäße	Medienmenge	Anzahl In-vitro-Kopfstecklinge
1	TIS: 1 x 16 min/d geflutet	3 RITA-Gefäße	175 ml	14
2	TIS: 2 x 8 min/d geflutet	3 RITA-Gefäße	175 ml	14
3	TIS: 4 x 4 min/d geflutet	3 RITA-Gefäße	175 ml	14
4	Festkultur	10 Glasgefäße	25 ml	2
5	PIS	10 Glasgefäße	25 ml	2

TIS - temporary immersion system  
 PIS - permanent immersion system

Die permanente Immersion (PIS) wurde auf einem Schüttler bei 60 rpm realisiert. Die temporäre Immersion (TIS) wurde in RITA<sup>®</sup>-Gefäßen durchgeführt, in denen ähnlich wie bei der Ebbe-Flut-Kultur im Gewächshaus die Explantate zeitweise von Medium umspült werden. Im Folgenden wird die Funktionsweise der temporären Immersion im RITA<sup>®</sup>-Gefäß erläutert (Abbildung 2-3).

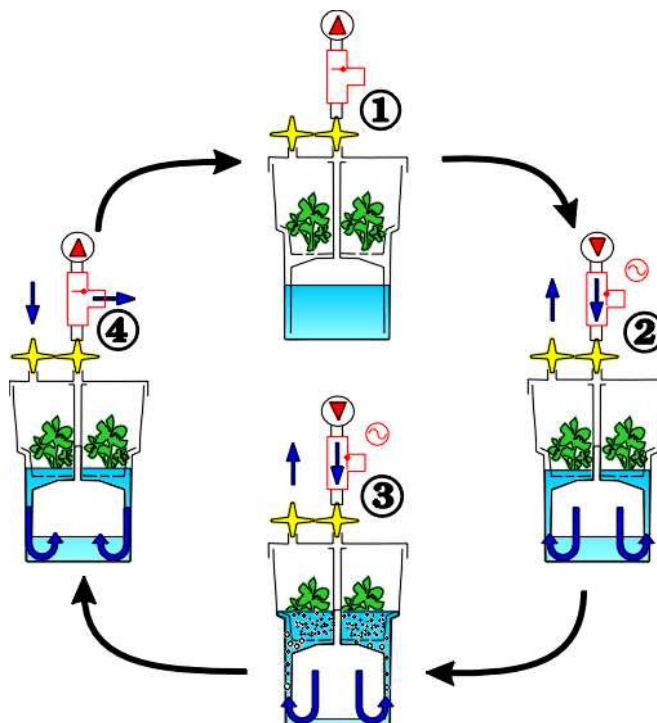


Abbildung 2-3: Funktionsweise der temporären Immersion in einem RITA<sup>®</sup>-Gefäß

Erläuterung siehe Text, Quelle: <http://pagesperso-orange.fr/vitropic/rita/en/fonction.htm>,  
 13.10.08

Im oberen Bereich des Gefäßes liegen die Pflanzen auf Filterpapier. An dem Deckel des RITA<sup>®</sup>-Gefäßes sind zwei Sterilfilter (1) angeschlossen. Ein Filter ist mit einem Pumpensystem verbunden, welches Umgebungsluft in das System pumpt (2). Durch den entstehenden Überdruck wird das Medium in das Pflanzenkompartiment gedrückt, die dabei verdrängte Luft entweicht durch den zweiten Filter. Die Luft im Gefäß wird auf diesem Wege regelmäßig erneuert (3). Beim Stoppen der Pumpe kommt es zum Druckausgleich und das Medium läuft wieder in den unteren Bereich (4).

Da davon ausgegangen wurde, dass die Nährstoffe im Flüssigmedium schneller aufgenommen werden, erfolgten der Medienwechsel und auch die Bonitur der Sprosse, sowohl bei der Kultur in permanenter bzw. temporärer Immersion als auch bei der Kultur auf Festmedium, nach zwei Wochen. Bei der Bonitur wurde nur die Anzahl der gebildeten Seitensprosse nicht jedoch die Anzahl der möglichen In-vitro-Teil- bzw. Basisstecklinge notiert. Die gesamte Kulturdauer betrug dreimal zwei Wochen.

Da auf Festmedium nur eine geringe Vermehrung der *in vitro* etablierten Sprosse der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' stattfand, sollte im zweiten Versuch die Möglichkeit einer Steigerung der Vermehrung in der temporären Immersionskultur untersucht werden. Als Kulturmedium wurde 1/2 MS-Medium (Tabelle 2-2) mit B5-Vitaminen (Tabelle 2-7), dem 1 mg/l GA<sub>3</sub>, 0,2 mg/l BAP, 10 g/l Saccharose, 15 g/l Glukose und 85,6 mg/l Fe-EDDHA und bei Kultur auf Festmedium 3,8 g/l Gelrite beigelegt wurden, verwendet. In den RITA<sup>®</sup>-Gefäßen befanden sich 175 ml Medium und 5 Explantate, so dass jedem Explantat ca. 35 ml Medium zur Verfügung standen. Um den Pflanzen auf Festmedium, die in 500 ml Plastikbechern kultiviert wurden, die gleiche Menge an Medium zur Verfügung zu stellen, wurden je zwei Explantate pro Becher verwendet. Die Flutung der Pflanzen in den RITA<sup>®</sup>-Gefäßen erfolgte viermal pro Tag für vier Minuten. Auf die Kultur bei permanenter Immersion wurde in diesem Versuch, aufgrund der im ersten Versuch erzielten geringen Pflanzenqualität verzichtet.

Der Medienwechsel und die Bonitur der Sprosse erfolgten in beiden Kulturvarianten nach zwei Wochen. Die gesamte Kulturdauer betrug zweimal zwei Wochen. In diesem Versuch wurden sowohl In-vitro-Kopf- als auch Teilstecklinge verwendet. Mangels Pflanzenmaterial konnte nur eine eingeschränkte Anzahl Kulturgefäße bestückt werden (Tabelle 2-13). Auf eine statistische Verrechnung der Daten wurden daher verzichtet.

Tabelle 2-13: Anzahl der Kulturgefäße und Explantatarten des Versuches zum Vergleich der Kulturmethode mit der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle'

Explantatart	Kulturmethode	Anzahl	
		Kulturgefäße	Explantate/Gefäß
In-vitro-Kopfstecklinge	TIS	2	5
	Festmedium	2	2
In-vitro-Teilstecklinge	TIS	3	5
	Festmedium	3	2

### 2.1.6 Versuche zur Regeneration über Organogenese und somatische Embryogenese

Mit dem Ziel, ein geeignetes Nährmedium für die Neubildung von Sprossen an Blattexplantaten zu identifizieren, wurden drei verschiedene Einflussfaktoren untersucht. Dies waren die Nährsalze, die Wachstumsregulatoren sowie die Kohlenhydratquelle.

Für die Regeneration von Adventivsprossen wurden Blattexplantate von In-vitro-Sprossen mit einer Größe von 0,5 x 0,5 mm und in einigen Versuchen auch Stängelsegmente ohne Nodien mit einer Dicke von 1 bis 2 mm verwendet. Pro Medienvariante wurden sechs Petrischalen (6 cm) mit je fünf Explantaten belegt. Nach vier Wochen wurden die Explantate auf frisches Nährmedium derselben Zusammensetzung überführt. Durch Kontaminationen während der Kultur reduzierte sich die Anzahl der Petrischalen in einzelnen Versuchen. Die Bonitur wurde nur an sterilen Explantaten durchgeführt. Die Anzahl (n) der zur Verfügung stehenden Petrischalen ist in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

Nach vier und nach acht Wochen wurden die Explantate auf Kallus- und Sprossbildung sowie auf Verbräunungen bonitiert. Zur objektiveren Beurteilung der Verbräunung wurde dieses Merkmal in die in Abbildung 2-4 beispielhaft dargestellten Klassen eingeteilt.

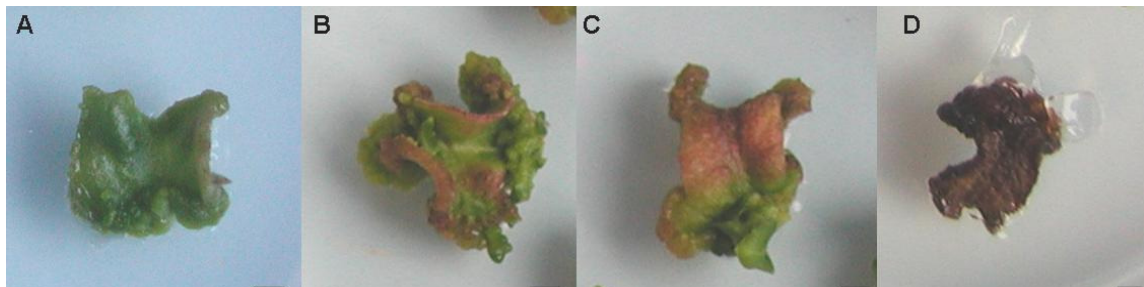


Abbildung 2-4: Einteilung der Klassen für die Bonitur der Explantatverbräunung

- A - Klasse I: Explantat grün
  - B - Klasse II: Verbräunungen am Explantatrand
  - C - Klasse III: bis 50 % des Explantats verbräunt
  - D - Klasse IV: bis 100 % des Explantats verbräunt
- (Balken entsprechen 1 mm)

Die Sprossregenerationsraten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Sprossregenerationsrate (\%)} = \frac{\text{Anzahl Explantate mit Sprossbildung}}{\text{Anzahl aller sterilen Explantate}} * 100$$

Die Berechnung der Kallusbildungsraten erfolgte entsprechend.

Die Anzahl der durchschnittlichen gebildeten Sprosse pro regenerierendem Explantat wurde wie folgt berechnet:

$$\text{durchschnittl. Anzahl Sprosse / reg. Explantat} = \frac{\text{Anzahl regenerierter Sprosse}}{\text{Anzahl Expl. mit Sprossregeneration}}$$

### 2.1.6.1 Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Regeneration von Adventivsprossen

In dieser Versuchsreihe wurden zwei Nährsalzzusammensetzungen jeweils in halber und voller Nährstoffkonzentration getestet. Zum einen kam das Nährmedium nach MURASHIGE UND SKOOG (MS) (1962) (Tabelle 2-2) und zum anderen das Nährmedium nach GAMBORG ET AL. (B5) (1968) (Tabelle 2-3) zur Anwendung. Allen Medien wurden 2 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA sowie 10 g/l Saccharose und 15 g/l Glukose zugefügt. Vitamine wurden nach GAMBORG ET AL. (B5) (1968) (Tabelle 2-7) verwendet. In der Regel wurden den Medien 8 g/l Plant Agar zur Verfestigung beigefügt. Im dritten Durchgang des Versuchs mit Explantaten von *H. macrophylla* 'Libelle' wurden dem Medium anstelle von Plant Agar 3,8 g/l Gelrite beigefügt. Außerdem wurden 36,7 mg/l Fe-Na-EDTA (100 µM) durch 85,64 mg/l Fe-EDDHA (200 µM) ersetzt.

Der Versuch mit Blattexplantaten wurde mit den Sorten *H. macrophylla*: 'Nachtigall', 'Libelle', 'Adria' und 'Blaumeise' angelegt. Der Einfluss der verwendeten Nährmedien auf die Regeneration an Blattexplantaten der Sorte 'Libelle' wurde in drei Versuchsdurchgängen (à 6 Petrischalen pro Medienvariante), der Einfluss auf Explantate der anderen Sorten in zwei Versuchsdurchgängen (à 6 Petrischalen pro Medienvariante) untersucht.



### 2.1.6.2 Einfluss der Wachstumsregulatoren auf die Regeneration von Adventivsprossen

Die in dieser Versuchsreihe verwendeten *Hydrangea*-Arten und -Sorten, die Anzahl der Versuchsdurchgänge, die Explantatart sowie die Medienzusätze sind in Tabelle 2-14 aufgeführt. Aufgrund der Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen zum Einfluss der Grundmedienzusammensetzung wurde in den Versuchen eins bis acht (Tabelle 2-14) das Grundmedium nach GAMBORG ET AL. (B5) (1968) (Tabelle 2-3) in halber Nährstoffkonzentration sowie die Vitamine nach GAMBORG ET AL. (B5) (1968) (Tabelle 2-7) verwendet. Weiterhin wurden allen Medienvarianten der Versuche eins bis acht 0,1 mg/l NAA sowie 10 g/l Saccharose und 15 g/l Glukose zugefügt. Die Verwendung von Fe-Na-EDTA/Fe-EDDHA bzw. Plant Agar/Gelrite ist Tabelle 2-14 zu entnehmen.

Die Versuche neun und zehn wurden in Anlehnung an LEDBETTER & PREECE (2004) durchgeführt. Es wurden Nährsalze nach MURASHIGE UND SKOOG (MS) (1962) (Tabelle 2-2) in voller Nährstoffkonzentration sowie Vitamine nach MURASHIGE UND SKOOG (MS) (1962) (Tabelle 2-6) verwendet. Außerdem wurden den Medien 30 g/l Saccharose und 0,2 mg/l IBA zugefügt. Zur Verfestigung enthielten die Medien 8 g/l Plant Agar.

Tabelle 2-14: Versuchsnummern, Anzahl der Versuchsdurchgänge, Pflanzensorten, Explantatarten sowie Medienzusätze der Versuche zum Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die Adventivprossregeneration

Vers.- nr.	Wieder- holung	Pflanzenart/-sorte	Expl. art	Medienvariante	Eisenquelle	Verfestigungs- mittel	Bemerkungen
Reg 1	1 + 2	<i>H. macrophylla</i> 'Nachtigall'	Blatt	1 + 2 mg/l BAP 0,5 + 1 mg/l TDZ 1 + 2 mg/l Top	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar	
Reg 2	1 + 2	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	Blatt	1 + 2 mg/l BAP 0,5 + 1 mg/l TDZ 1 + 2 mg/l Top	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar	
Reg 3	1 + 2	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	Blatt	1 + 2 mg/l BAP 1 + 1,5 mg/l TDZ 1 + 2 mg/l Zea	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar	
Reg 4	1	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'		0,5 mg/l BAP 1 mg/l 2IP 1 mg/l Kin 0,5 mg/l BAP+1 mg/l 2IP+1 mg/l Kin	85,64 mg/l Fe-EDDHA	8 g/l Plant Agar	
Reg 5	1	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	Blatt	1 + 2 mg/l BAP 1 + 1,5 mg/l TDZ 1 + 2 mg/l Top 1 + 2 mg/l Zea	85,64 mg/l Fe-EDDHA	8 g/l Plant Agar	
Reg 6	1	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	Blatt	2 mg/l GA <sub>3</sub> + 2 mg/l BAP 8,5 mg/l PCIB + 2 mg/l BAP 0,5 mg/l Flurprimidol + 2 mg/l BAP 2 mg/l BAP	85,64 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite	
Reg 7	1 + 2	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	Blatt	1 + 2 mg/l BAP 0,5 + 1 mg/l TDZ 1 + 2 mg/l Top	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar	
Reg 8	1	<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	Blatt und Stiel	1 + 2 mg/l BAP 1 + 1,5 mg/l TDZ 1 + 2 mg/l Top	85,64 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite	4 PS bzw. 20 Stielexplantate pro Medienvariante
Reg 9	1	<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	Blatt	0,1 + 1 mg/l TDZ 2 mg/l 2IP 2 mg/l BAP	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar	nach Ledbetter & Preece (2004): Grund- medium und Vitamine nach MURASHIGE UND SKOOG (1962), Zusatz von 0,2 mg/l IBA und 30 g/l Saccharose
Reg 10	1 + 2	<i>H. quercifolia</i> 'Pee Wee'	Blatt	0,1 + 1 mg/l TDZ 2 mg/l 2IP 2 mg/l BAP	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar	nach Ledbetter & Preece (2004): Grund- medium und Vitamine nach MURASHIGE UND SKOOG (1962), Zusatz von 0,2 mg/l IBA und 30 g/l Saccharose

### 2.1.6.3 Einfluss der Kohlenhydratquelle auf die Regeneration von Adventivsprossen

Für diese Versuche wurden Explantate der Sorten *H. macrophylla* 'Libelle' und 'Blaumeise' sowie *H. arborescens* 'Annabelle' verwendet. Nährsalze (in halber Konzentration) sowie Vitamine wurden nach GAMBORG ET AL. (B5) (1968) (Tabelle 2-3, Tabelle 2-7) verwendet. Alle Medien enthielten 2 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA. Es kamen sechs verschiedene Medienvarianten zum Einsatz, die sich in der Zuckerart bzw. -konzentration unterschieden. Als Kohlenhydratquelle dienten Saccharose (20 und 30 g/l), Glukose (20 g/l) und Maltose (20 g/l). Außerdem wurden die Kombinationen Saccharose (20 g/l) mit Glukose (10 g/l) sowie Saccharose (20 g/l) mit Maltose (10 g/l) getestet. Eine Übersicht über die Versuchsdurchgänge, Explantatarten, Eisenform sowie über das verwendete Verfestigungsmittel gibt Tabelle 2-15.

**Tabelle 2-15: Versuchsnummern, Anzahl der Versuchsdurchgänge, Pflanzensorten, Explantatart sowie Medienbestandteile der Versuche zum Einfluss der Kohlenhydratquelle auf die Regeneration von Adventivsprossen**

Vers.nr.	Versuchs- durchgang	Pflanzensorte	Explantat art	Eisenform	Verfestigungs- mittel
Reg 11	1	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	Blatt	85,64 mg/l Fe-EDDHA	8 g/l Plant Agar
Reg 12	1 + 2	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	Blatt	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	8 g/l Plant Agar
	3	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	Blatt	85,64 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite
Reg 13	1	<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	Blatt und Stängel	85,64 mg/l Fe-EDDHA	3,8 g/l Gelrite

### 2.1.6.4 Regeneration über somatische Embryogenese

In der Literatur lassen sich keine Berichte über somatische Embryogenese bei *Hydrangea* finden. Es ist jedoch bekannt, dass die Kombination von Cytokinin und Auxin bei einer Vielzahl von Pflanzen die Bildung von embryogenen Zellen bedingt (VON ARNOLD 2008). Daher wurden verschiedene Auxin/Cytokinin-Kombinationen in dieser Versuchsreihe getestet. Weiterhin wurde beschrieben, dass bei vielen anderen Pflanzenarten die Kultur bei Dunkelheit für die somatische Embryogenese förderlicher ist. Daher wurde sowohl die Kultur im Hell/Dunkelrhythmus von 16/8 h als auch die Kultur im Dauerdunkel getestet. Als Spenderpflanzen dienten bereits in vitro etablierte Sprosskulturen. Ausnahme stellen die Versuche drei und neun dar. In Versuch drei wurden Blüten von Gewächshauspflanzen verwendet und in Versuch neun wurde Kallus, der sich an Plazentateilen nach der Fruchtknotenpräparation gebildet hatte, verwendet. Die Kultur der

Explantate erfolgte in 6 cm-Petrischalen (5 Explantate/Petrischale). In der Regel wurden die Explantate alle vier Wochen auf frisches Nährmedium überführt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte ebenfalls die Bonitur der Explantate auf Verbräunung, Kallusbildung, -farbe und -struktur sowie auf Bildung von somatischen Embryonen. Die Bonitur der Verbräunung sowie die Berechnung der Kallusbildungsraten erfolgte wie in Kap. 2.1.6 beschrieben.

Bis auf das Nährmedium T in Versuch 9 hatten alle verwendeten Nährmedien die gleiche Grundzusammensetzung (Tabelle 2-16) und variierten in der Zusammensetzung der Wachstumsregulatoren (Tabelle 2-17). Die Zusammensetzung des Mediums T ist Tabelle 2-19 zu entnehmen.

**Tabelle 2-16: Grundzusammensetzung der Kulturmedien der Versuchsreihe zur Regeneration über somatische Embryogenese**

Makro- und Mikronährsalze	nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) (Tabelle 2-2)
Vitamine	nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) (Tabelle 2-6) +250 mg/l Pepton aus Casein (Duchefa)
Eisenform	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA
Zucker	10 g/l Saccharose 15 g/l Glukose
Verfestigungsmittel	3,8 g/l Gelrite
pH-Wert	5,7

Tabelle 2-17: Versuchsmedien der Versuche zur Regeneration über somatische Embryogenese sowie die Versuche, in denen sie Anwendung fanden

Medien- bezeichnung	Wachstumsregulatoren	getestet in Versuch Nummer
A	2 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2iP	1,2
B	1 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2iP	1,2
C	0,8 mg/l 2iP	1,2
D	0,4 mg/l 2iP	1,2
E	1 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2iP	2
F	0,5 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2iP	2
G	0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l 2iP	3
H	1 mg/l TDZ +0,5 mg/l 2,4-D	4
I	2 mg/l Kinetin +0,5 mg/l 2,4-D	4
J	2 mg/l 2iP +0,5 mg/l 2,4-D	4
K	2 mg/l BAP +0,5 mg/l 2,4-D	4,6
L	2 mg/l Zeatin +0,5 mg/l 2,4-D	4,6
M	0,5 mg/l BAP + 0,004 mg/l NAA + 0,1 mg/l GA <sub>3</sub>	5,6,7,8
N	0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l IAA	5,6,7,8
P	1 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA	6
Q	2 mg/l 2iP	9
R	2 mg/l Zeatin	9
S	1 mg/l TDZ	9
T	ohne (veränderte Grundzusammensetzung d. Mediums)	9
0	ohne	1,4

Einen Überblick über die in dieser Versuchsreihe verwendeten Sorten, Explantatarten und die in den jeweiligen Versuchen verwendeten Nährmedien gibt Tabelle 2-18.

Tabelle 2-18: Versuchsnummern, Pflanzensorten, Explantattypen und Medienvarianten der Versuchsreihe zur Regeneration über somatische Embryogenese

Versuchs- nummer	Sorte	Explantattyp	Medienvariante
sE 1	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	Blatt	A, B, C, D, 0
sE 2	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	Blatt	A, B, C, D, E, F
sE 3	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	Blütenböden	G
sE 4	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	Blatt	H, I, J,K, L, 0
sE 5	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	Blatt	M, N
sE 6	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	Blatt	K, L, M, N, P
sE 7	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	Blatt	M, N
sE 8	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	Blattspitzen	M, N
sE 9	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	Kallus an Plazentastücken	Q, R, S, T

Im Verlauf der Kultur wurde an einigen Explantaten der Austritt von Endophyten beobachtet. Bei Auftreten von Unsterilitäten wurden die entsprechenden Petrischalen aus dem Versuch entfernt.

Versuch sE1:

In diesem Versuch mit Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' wurde eine Auxin/Cytokininkombination in zwei Konzentrationen zur Induktion und anschließenden Vermehrung von embryogenen Zellen getestet. Zur Anwendung kam die Kombination 2 mg/l 2,4-D und 0,8 mg/l 2iP (Medium A) bzw. die Kombination 1 mg/l 2,4-D und 0,4 mg/l 2iP (Medium B) (Tabelle 2-17). Ferner erfolgte in der Induktionsphase eine Variation des Faktors Licht. So wurde zum einen die Kultur bei einem Hell/Dunkelrhythmus von 16/8 h und zum anderen eine Kultur bei anfänglichem Dauerdunkel (für sechs bzw. acht Wochen) und anschließendem Hell/Dunkelrhythmus (16/8 h) realisiert (Abbildung 2-5).

An die Induktions- und die Vermehrungsphase auf Medien mit Wachstumsregulatoren wurde eine Kultur auf Medium ohne Wachstumsregulatoren (Medium 0) angeschlossen, um eine Differenzierung somatischer Embryonen zu erzielen. Da dies jedoch nicht gelang, erfolgte eine abschließende Kultur auf Medien mit 0,8 (Medium C) bzw. 0,4 mg/l 2iP (Medium D) (Tabelle 2-17). Das Verfestigungsmittel wurde in diesem Versuch verändert, statt 3,8 g/l Gelrite wurden 8 g/l Plant Agar verwendet.

Pro Medien- und Belichtungsvariante (Hell/Dunkelrhythmus bzw. anfängliche Kultur im Dauerdunkel) wurden 150 Explantate (30 PS) kultiviert.

Die Abbildung 2-5 zeigt das Kulturschema für diesen Versuch. Dargestellt sind nur Medienwechsel bei denen sich die Zusammensetzung der Medien änderte. Ein Überführen der Explantate auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung erfolgte alle vier Wochen. Während der Kultur wurden an einigen Explantaten runde Strukturen beobachtet, die sich von der Struktur des gebildeten Kallus unterschieden. Einige dieser Explantate aus der durchgängigen Kultur im Hell/Dunkelrhythmus wurden auf hormon-freies Medium überführt und sind nicht in den Kulturschemata enthalten. Beim Überbringen der Explantate aus dem Dauerdunkel ins Licht wurden die Petrischalen zu Beginn zwei Tage mit Zellstoffpapier abgedeckt, um sie an die Lichtverhältnisse im Kulturraum anzupassen.

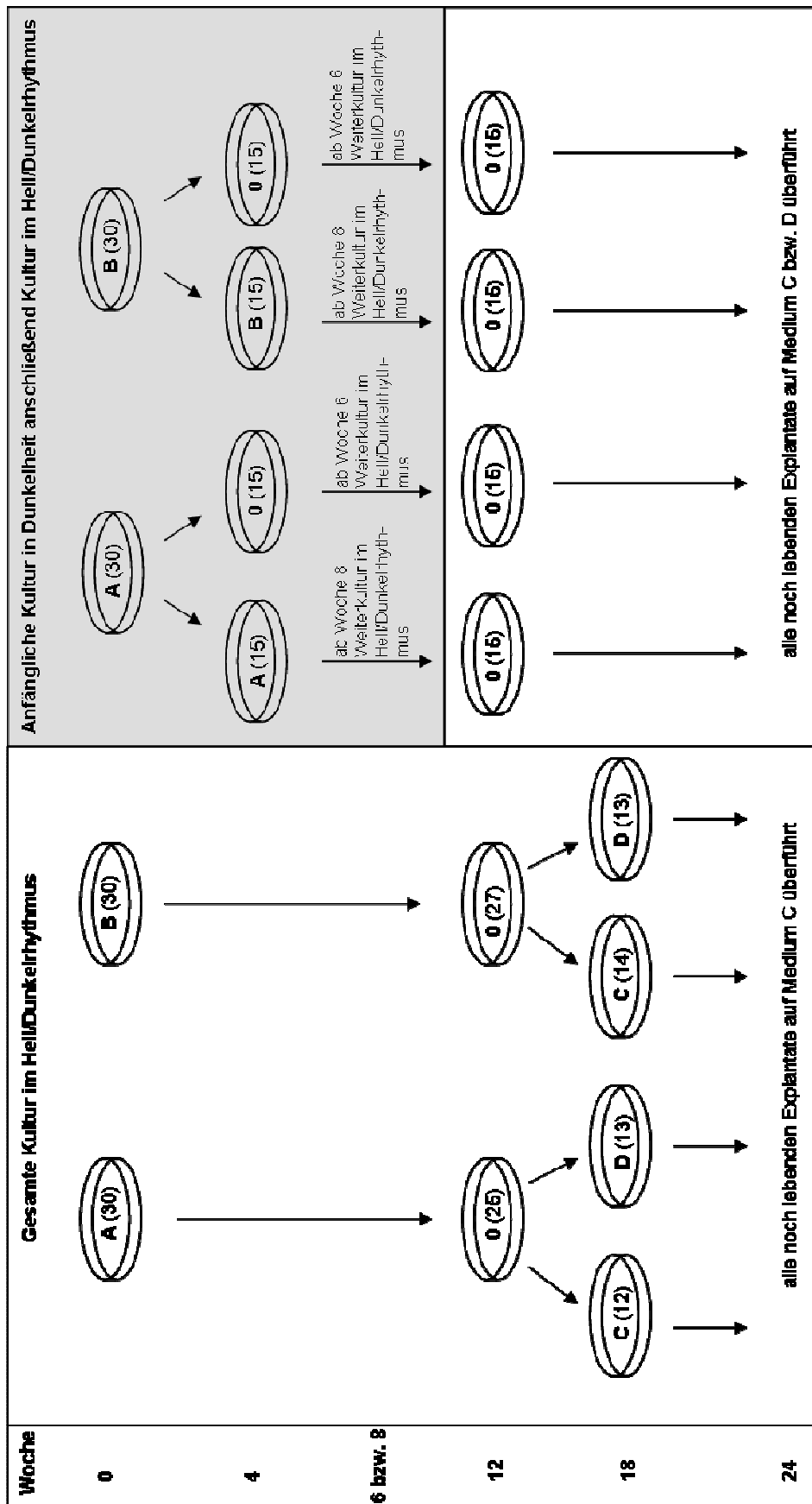


Abbildung 2-5: Kulturschema zum Versuch sE 1 zur Regeneration über somatische Embryogenese  
 Medienvarianten A, B, C, D und 0 siehe Tabelle 2-17 (In Klammern ist die Anzahl der Petrischalen dargestellt.)

### Versuch sE 2:

Im zweiten Versuch wurden ebenfalls Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blau-meise' verwendet. Für die Induktion von embryogenen Zellen wurden die Medienvarianten A und B (Tabelle 2-17), die beide eine Kombination von 2,4-D und 2iP unterschiedlicher Konzentrationen enthielten, verwendet. Insgesamt wurden 56 Petrischalen von jedem Medium belegt (je 5 Explantate) und jeweils die Hälfte (28 Petrischalen) bei Dauerdunkel bzw. einem Hell/Dunkelrhythmus (16/8 h) für sechs Wochen kultiviert. Nach drei Wochen wurden die Explantate auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung überführt und Verbräunung und Kallusbildung bonitiert.

Im Anschluss an die Induktionsphase von sechs Wochen wurden die Explantate von Medium A und B auf die Medien C, D, E und F verteilt (Tabelle 2-17). Die Explantate, die bisher im Dauerdunkel kultiviert worden waren, wurden weiterhin im Dunkeln belassen. Die Bonitur und die Überführung auf frisches Nährmedium derselben Zusammensetzung erfolgten alle vier Wochen.

### Versuch sE 3:

In diesem Versuch wurden Blütenböden von Gewächshauspflanzen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' als Ausgangsmaterial zur Induktion embryogener Zellen genutzt. Zur Oberflächensterilisation wurden die Explantate für 1 min in 70 % Ethanol und anschließend für 10 min in 3 % NaOCl mit einigen Tropfen Tween getaucht. Das Waschen der Explantate erfolgte in sterilem Wasser für 1, 2 und 5 min. Anschließend wurden der Blütenstiel unterhalb des Blütenbodens sowie die Blütenblätter entfernt. Die so präparierten Explantate wurden auf Medium G mit 0,5 mg/l 2,4-D und 2 mg/l 2iP (Tabelle 2-17) so platziert, dass der Blütenboden auf dem Medium auflag. Die Kultur der Explantate erfolgte in 6 cm-Petrischalen im Hell/Dunkelrhythmus (10 Petrischalen á 5 Explantate) und im Dauerdunkel (ebenfalls 10 Petrischalen á 5 Explantate). Die Überführung der Explantate auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung erfolgte wie die Bonitur der Kallusbildung und der Explantatverbräunung alle vier Wochen.

### Versuch sE 4:

Im vierten Versuch wurden Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' verwendet. In der Induktionsphase wurden fünf Cytokinine in Kombination mit dem Auxin 2,4-D (0,5 mg/l) getestet. Zur Anwendung kamen 1 mg/l TDZ (Medium H), 2 mg/l Kinetin (Medium I), 2 mg/l 2iP (Medium J), 2 mg/l BAP (Medium K) und 2 mg/l Zeatin (Me-



dium L) (Tabelle 2-17). Von jeder Medienvariante wurden 20 PS á 5 Explantate belegt und jeweils 10 PS im Dauerdunkel bzw. bei einem Hell/Dunkelrhythmus von 16/8 h kultiviert. Die Bonitur erfolgte wie oben beschrieben alle vier Wochen. Nach der zweiten Kulturpassage wurden die Explantate auf Medium ohne Wachstumsregulatoren (Medium 0) zur Differenzierung möglicher induzierter somatischer Embryonen überführt.

### Versuch sE 5:

Bei der In-vitro-Etablierung der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' wurden Strukturen beobachtet, die vermutlich somatische Embryonen gewesen sind (A. Schum, JKI Groß Lüsewitz, persönliche Mitteilung). Daher wurden in diesem Versuch die Kombinationen und Konzentration der Wachstumsregulatoren aus den durch Frau Schum durchgeführten Etablierungsversuchen verwendet. Während der ersten beiden Kulturpassagen von je vier Wochen wurden Blattexplantate der Sorte 'Adria' auf Medium M mit 0,5 mg/l BAP; 0,004 mg/l NAA und 0,1 mg/l GA<sub>3</sub> kultiviert (Tabelle 2-17). Im Anschluss erfolgte die Kultur auf Medium N mit 0,2 mg/l BAP und 0,2 mg/l IAA für ebenfalls zwei Kulturpassagen à vier Wochen. Es wurden 14 Petrischalen (á 5 Explantate) im Hell/Dunkelrhythmus (16/8 h) und ebenso viele Petrischalen durchgängig im Dauerdunkel kultiviert.

### Versuch sE 6:

Im sechsten Versuch wurden Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' verwendet. Die Kultur der Explantate erfolgte zu Beginn auf dem bereits in Versuch fünf verwendeten Medium M (Tabelle 2-17) und auf zwei weiteren Medien mit Wachstumsregulatoren, die bereits zu Kallusbildung in vorhergehenden Versuchen geführt hatten. Zum einen wurde die Kombination 2 mg/l Zeatin mit 0,5 mg/l 2,4-D (Medium L) und zum anderen 2 mg/l BAP mit 0,5 mg/l 2,4-D (Medium K) verwendet. Pro Medienvariante (M, L, K) wurden 12 Petrischalen mit je fünf Explantaten belegt. Die Hälfte wurde im Hell/Dunkelrhythmus (16/8 h) und die andere Hälfte im Dauerdunkel kultiviert.

Nach der ersten Kulturpassage von vier Wochen wurde die Hälfte der Explantate von Medium M auf das bereits in Versuch fünf verwendete Nährmedium N überführt. Die andere Hälfte wurde auf frischem Nährmedium der ursprünglichen Zusammensetzung (Medium M) weiterkultiviert. Die Hälfte der Explantate von den Medien K bzw. L aus beiden Lichtbedingungen wurden auf ein Medium (P) mit Wachstumsregulatoren nach GOPI UND PONMURUGAN (2006) überführt. Dieses Medium enthielt 1 mg/l BAP, 0,5 mg/l Kinetin und 1 mg/l NAA (Medium P). Die andere Hälfte der Explantate wurde

auf frisches Medium der zuvor verwendeten Zusammensetzung (K bzw. L) überführt. Nach einer weiteren Kulturpassage von vier Wochen wurden die restlichen Explantate von den Medien M bzw. K und L auf die Medien N bzw. P überführt.

### Versuch sE 7:

Dieser Versuch fand in zwei Durchgängen statt. Beide Versuchsdurchgänge wurden mit Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' mit den bereits in den Versuchen 5 und 6 verwendeten Medien M und N (Tabelle 2-17) durchgeführt. Die Anzahl der Petrischalen im ersten Versuchsdurchgang betrug 10 und im zweiten Versuchsdurchgang 14. Die Bonitur und das Überführen der Explantate des ersten Versuchsdurchganges erfolgten alle vier Wochen. Nach zwei Kulturpassagen auf Medium M wurden alle Explantate auf Medium N überführt. Die Kultur der Explantate, die bisher in Dauerdunkelheit stattfand, wurde im Hell/Dunkelrhythmus weitergeführt. Im Gegensatz zum ersten Versuchsdurchgang erfolgten die erste Bonitur und der erste Medienwechsel im zweiten Versuchsdurchgang erst nach einer Kulturdauer von acht Wochen. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Kultur aller Explantate im Hell/Dunkelrhythmus. Die Überführung der Explantate auf Medium N erfolgte erst nach einer weiteren Kulturpassage von vier Wochen auf Medium M.

### Versuch sE 8:

Dieser Versuch wurde wie der erste Versuchsdurchgang des Versuchs sieben durchgeführt. Nur die Explantatart wurde variiert. Verwendet wurden Blattspitzen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle'. Die Explantate waren 0,4 bis 0,8 cm lang und 0,8 bis 1 cm breit.

### Versuch sE 9:

Während der Arbeiten zur Hybridisierung von *Hydrangea*-Arten wurden Fruchtknoten nach der Bestäubung geerntet und die Plazenta mit den Samen präpariert und auf Nährmedium überführt. Auf diesem Nährmedium, welches keine Wachstumsregulatoren enthielt, hatten sich an einigen Teilen der Plazenta von Fruchtknoten aus der Kreuzung *H. macrophylla* 'Adria' x *H. paniculata* 'Unique' verschiedene Arten von Kallus gebildet. Dieser an den Plazentateilen gebildete Kallus wurde in die Versuche zur Regeneration über somatische Embryogenese miteinbezogen.

Der gebildete Kallus wurde 12 Wochen nach Präparation der Plazenta und der Samen auf drei verschiedene Medien überführt. Alle Medien waren in ihrer Grundzusammen-

setzung identisch (Tabelle 2-16), enthielten jedoch verschiedene Wachstumsregulatoren. Medium Q wurde mit 2 mg/l 2iP, Medium R mit 2 mg/l Zeatin und Medium S mit 1 mg/l TDZ angereichert. Die Überführung auf frisches Nährmedium der gleichen Zusammensetzung erfolgte in unregelmäßigen Abständen von vier bis acht Wochen. Um zu testen, ob der Kallus embryogen ist, wurde zu verschiedenen Zeiten Teile des Kallus auf Medium T (Tabelle 2-19) (ohne Wachstumsregulatoren) überführt und die weitere Entwicklung beobachtet.

**Tabelle 2-19: Zusammensetzung des Kulturmediums T des Versuchs sE 9**

Makro- und Mikronährsalze	nach Murashige und Skoog (1962) (Tabelle 2-2) in halber Nährstoffkonzentration
Vitamine	nach Murashige und Skoog (1962) (Tabelle 2-6)
Eisenform	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA
Zucker	30 g/l Saccharose 2 g/l Glukose
Verfestigungsmittel	3,8 g/l Gelrite
pH-Wert	5,6

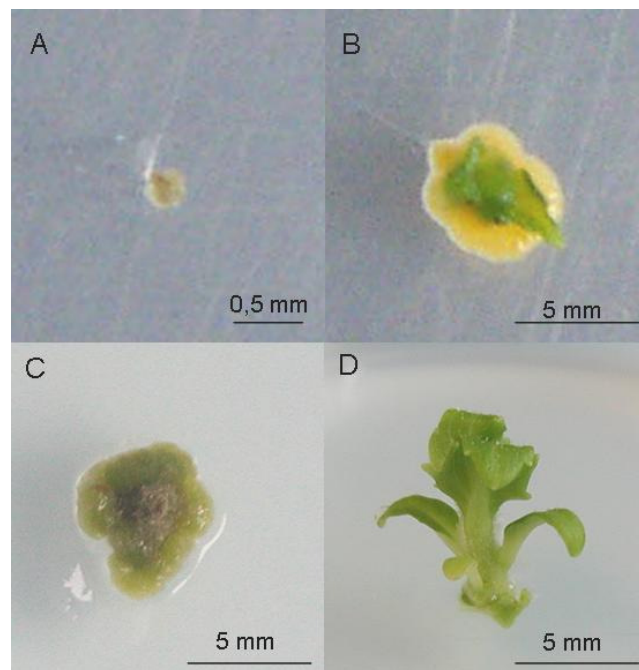
### 2.1.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem frei verfügbaren Programm "R" (<http://www.R-project.org>). Die statistische Analyse der Daten aus den Versuchen zur Regeneration und Vermehrung erfolgte bei normalverteilten und varianzhomogenen Daten nach Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Bei nicht vorliegender Normalverteilung wurde ein nicht-parametrisches Testverfahren nach Wilcoxon ( $p \leq 0,05$ ) angewendet. Daten, bei denen keine Varianzhomogenität vorlag, wurden mit Hilfe des Welch-t-Tests ( $p \leq 0,05$ ) ausgewertet. Das jeweils verwendete Verfahren ist im Ergebniskapitel angegeben. In den meisten Fällen wurden multiple Vergleiche durchgeführt, daher erfolgte im Anschluss eine  $\alpha$ -Adjustierung nach Bonferroni. In der Regel stellt ein Kulturgefäß eine Wiederholung (n) dar und es wurden Mittelwerte für ein Gefäß berechnet. Daten aus zwei Versuchsdurchgängen wurden nur gemeinsam verrechnet, wenn keine Wechselwirkungen zwischen Versuchsdurchgang und Medienvariante vorlagen. Die gemeinsame Verrechnung ist an der höheren Anzahl der Wiederholungen (n), die jeweils angegeben wird, erkennbar. Die Erstellung der Diagramme sowie Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Office Excel.

## 2.2 Ergebnisse

### 2.2.1 Etablierung von *Hydrangea*-Arten in vitro

Die Entwicklung der präparierten Sprossspitzen wurde zwei und vier Wochen nach Präparation und anschließend alle vier Wochen dokumentiert. Bonitiert wurden das Absterben der Explantate, das Austreten von Kontaminationen, Kallus- bzw. Blattbildung und die Entwicklung von Sprossen. Die Boniturstufen werden exemplarisch in Abbildung 2-6 dargestellt. Nicht gezeigt ist die Variante bei der sich nur Blätter entwickelten.



**Abbildung 2-6: Boniturstufen der Explantate für die In-vitro-Etablierung**

A - abgestorben, B - Kontamination, C - nur Kallusbildung, D - Sprossbildung

In der Regel wurden Apikalknospen zur Präparation der Explantate herangezogen. Bei der Sorte *H. macrophylla* 'Sensation 75' wurden zusätzlich Axillarknospen präpariert.

Im Verlauf der Kultur konnte bei allen Sorten beobachtet werden, dass eine Braunfärbung der Explantate eine Weiterentwicklung ausschloss und alle braunen Explantate abstarben. Entwicklung von Sprossen erfolgte ausschließlich aus grünen Explantaten.

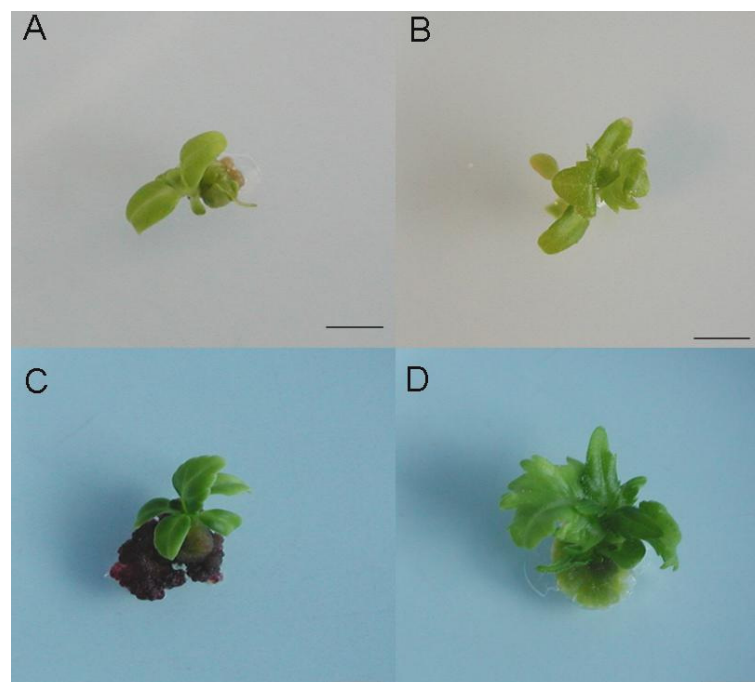
Beim Vergleich der Entwicklung der Explantate von Axillar- bzw. Apikalknospen der Sorte '**Sensation 75**' konnte kein Unterschied festgestellt werden (Tabelle 2-20). In beiden Fällen konnten fast identisch viele Sprosse erfolgreich etabliert werden (8 bzw. 9 %). Sprossbildung trat bei beiden Knospentypen frühestens nach acht Wochen Kultur auf. Diese Sprosse waren in der Regel sehr klein, so dass sie noch durchschnittlich ein bis zwei weitere Kulturpassagen (vier bis acht Wochen) auf dem Etablierungsmedium in

Petrischalen belassen wurden und erst im Anschluss in Gläser mit dem in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Medium überführt wurden (Abbildung 2-7).

Bei der Etablierung der Sorte '**Libelle**' war ein hoher Anteil der Explantate (71 %) kontaminiert. An 4 % der Explantate bildete sich Kallus. Bereits vier Wochen nach Präparation war eine Sprossentwicklung sichtbar. Am Ende der Kultur hatten sich 20 % der Explantate zu Sprossen weiterentwickelt (Tabelle 2-20, Abbildung 2-7).

Nach der Präparation von Explantaten der Sorte '**Adria**' starb circa die Hälfte (51 %) aller Explantate ab. Kontaminationen traten bei 24 % auf. Die Entwicklung von Sprossen konnte nach vier bis acht Wochen beobachtet werden. Insgesamt bildet ein Viertel (25 %) der Explantate Sprosse (Tabelle 2-20, Abbildung 2-7).

Die Präparation von Explantaten der Sorte '**Blaumeise**' war mit einer Etablierungsrate von 42 % sehr erfolgreich. Bereits nach zwei Wochen war die Bildung von Sprossen erkennbar. Im Gegensatz zu den Sprossen der anderen Sorten entwickelten sich die Sprosse der Sorte 'Blaumeise' deutlich schneller. Durch Absterben fielen 16 % und durch endogene Kontaminationen 42 % der Explantate aus (Tabelle 2-20, Abbildung 2-7).



**Abbildung 2-7: Erfolgreich in vitro etablierte Sprosse**

- A: *H. macrophylla* 'Sensation 75', zehn Wochen nach Präparation
- B: *H. macrophylla* 'Libelle', zehn Wochen nach Präparation
- C: *H. macrophylla* 'Adria', zehn Wochen nach Präparation
- D: *H. macrophylla* 'Blaumeise', vierzehn Wochen nach Präparation

Die Präparation von Explantaten der Sorte '**Doris**' erfolgte an vier Terminen von Juli bis September 2005 und erneut zu einem Termin im Mai 2006. Zu keinem Zeitpunkt

konnten Sprosse erfolgreich in vitro etabliert werden. An 41 % der Explantate konnte zwar Sprossbildung beobachtet werden, die Sprosse starben jedoch nach vier bis acht Wochen ab (Abbildung 2-8). Austritt von Mikroorganismen wurde bei 53 % der Explantate beobachtet. An einem Explantat bildete sich Kallus, der im Verlauf der Kultur nicht abstarb, jedoch auch keine Entwicklung von Sprossen zeigte. An sechs Explantaten kam es zur Entwicklung von Blättern, jedoch nicht zu Sprossen (Tabelle 2-20).

Sprossspitzen von *H. arborescens* 'Annabelle' konnten sehr erfolgreich mit einer Etablierungsrate von 58 % etabliert werden. Nur 5 % der Explantate starben ab und bei 16 % traten Mikroorganismen aus. An einer Vielzahl von Explantaten (21 %) kam es zu Kallusbildung ohne Sprossentwicklung (Tabelle 2-20).

Tabelle 2-20: Entwicklung der Explantate, die zur Etablierung der *Hydrangea*-Arten und -Sorten in vitro präpariert wurden, nach 20 Wochen Kultur.

Art	Sorte	Explantattyp	Explantate gesamt	Anteil Explantate					mit Sprossaustrieb
				abgestorben	kontaminiert	lebend, aber nur Kallusbildung	nur Blattbildung		
<i>H. macrophylla</i>	'Sensation 75'	Apikalknospen	54	58 %	33 %	0 %	0 %	9 %	
<i>H. macrophylla</i>	'Sensation 75'	Axillarknospen	50	66 %	22 %	4 %	0 %	8 %	
<i>H. macrophylla</i>	'Libelle'	Apikalknospen	55	9 %	71 %	0 %	0 %	20 %	
<i>H. macrophylla</i>	'Adria'	Apikalknospen	45	51 %	24 %	0 %	0 %	25 %	
<i>H. macrophylla</i>	'Blaumeise'	Apikalknospen	38	16 %	42 %	0 %	0 %	42 %	
<i>H. macrophylla</i>	'Doris'	Apikalknospen	121	41 %	53 %	1 %	5 %	0 %	
<i>H. arborescens</i>	'Annabelle'	Apikalknospen	19	5 %	16 %	21 %	0 %	58 %	

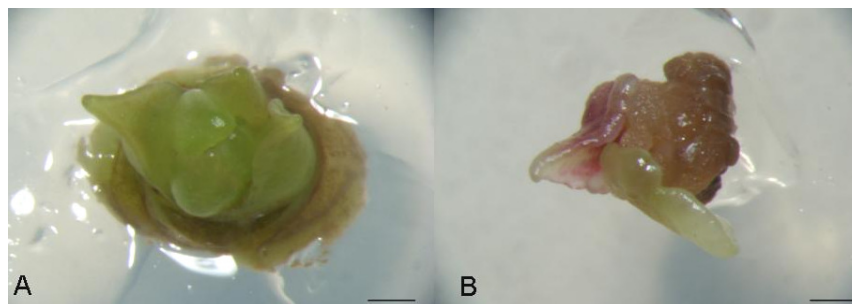


Abbildung 2-8: Explantate der Sorte *H. macrophylla* 'Doris' mit Sprossentwicklung und deutlicher Verbräunung vier (A) bzw. acht (B) Wochen nach Präparation (Balken entspricht 1 mm)

Mit dem Ziel den Einfluss des Explantatdurchmessers auf den Etablierungserfolg zu untersuchen wurden die Explantate nach der Präparation vermessen. Exemplarisch ist die Verteilung der kontaminierten bzw. abgestorbenen Explantate und der Explantate mit erfolgreicher Sprossbildung in Abhängigkeit von ihrem Durchmesser in Abbildung 2-9 für die Sorte 'Libelle' dargestellt. Sprossbildung fand bei Explantaten ab einer Größe von 0,8 mm statt. Bei Explantaten, die größer als 0,8 mm waren konnte kein Einfluss der Größe auf Sprossbildung oder Kontamination festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen Explantatgröße und Etablierungserfolg konnte auch bei den anderen Sorten nicht festgestellt werden (Abbildung A 1 bis Abbildung A 5).

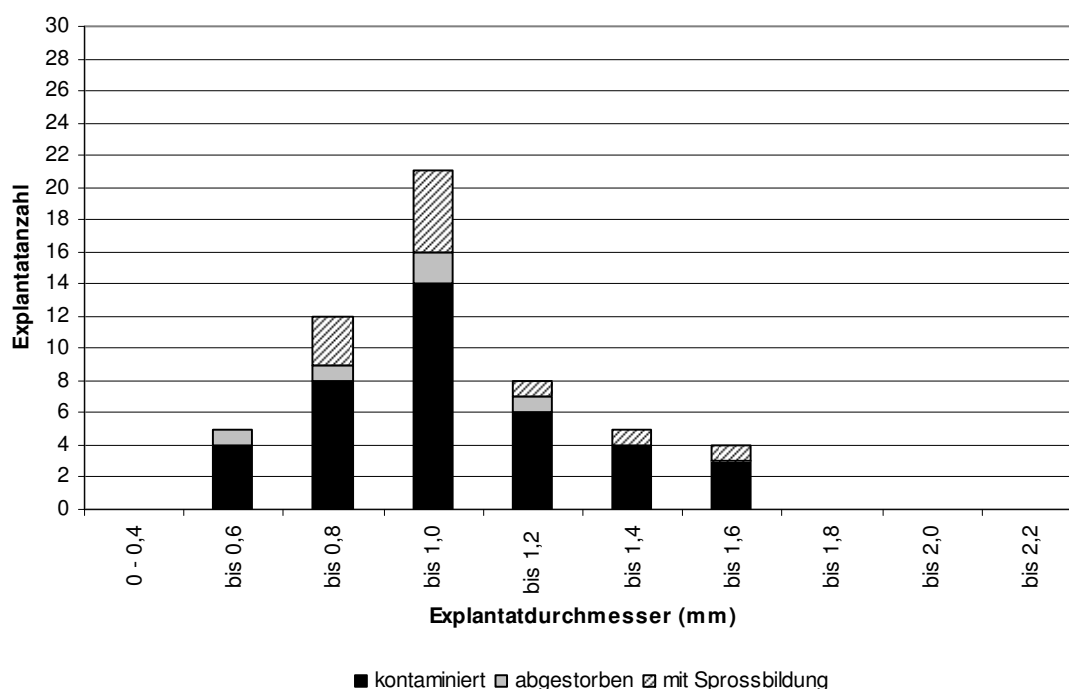


Abbildung 2-9: Entwicklung der Explantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit vom Explantatdurchmesser



### 2.2.2 Versuche zur axillaren Sprossvermehrung

An die In-vitro-Etablierung schlossen sich Untersuchungen zur Vermehrung über axillare Seitensprosse an. Als einige der wichtigsten Faktoren wurden in dieser Versuchsreihe die Zusammensetzung der Nährsalze, der Einfluss der Wachstumsregulatoren, die Eisenform und die Art des Verfestigungsmittels untersucht. Zusätzlich wurde neben der Kultur auf Festmedium die Kultur in einem temporärem Immersionssystem durchgeführt. Die vermehrten Sprosse sowie die gewonnenen Erkenntnisse zur Vermehrung der Sorten wurden an den Kooperationspartner, das Julius Kühn Institut in Quedlinburg, abgegeben. Dort dienten die Sprosse als Ausgangsmaterial für Versuche zur Mutationsinduktion und Polyploidisierung.

Im Verlauf der Kultur bildeten sich an einer Vielzahl der Sprosse Wurzeln. Die Bewurzelung von In-vitro-Sprossen wird in der Regel durch eine, sich an die Vermehrungsphase anschließende Kultur auf Bewurzelungsmedium realisiert und war nicht Ziel der hier beschriebenen Vermehrungsversuche. Da jedoch die Bewurzelung an vielen Sprossen bereits auf dem Vermehrungsmedium beobachtet wurde, wurde die Bewurzelungsrate in die Bonitur aufgenommen.

#### 2.2.2.1 Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Vermehrung

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von zwei verschiedenen Nährmedien (MS und B5), jeweils in voller und halber Konzentration, auf die Vermehrung von drei *H. macrophylla*-Sorten (Tabelle 2-9) untersucht.

Im ersten Versuchsdurchgang mit der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' konnten bei beiden verwendeten Konzentrationsstufen der Nährsalze nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) höhere Vermehrungsraten erzielt werden als bei Verwendung der Medien nach GAMBORG ET AL. (1968) (Abbildung 2-10). Die größte Anzahl an In-vitro-Stecklingen konnte auf MS-Medium in voller Nährstoffkonzentration geerntet werden. Auf den MS-Medien war ebenfalls die Sprosstreckung am größten (1,8 bzw. 1,5 cm bei Verwendung von MS- bzw. 1/2 MS-Medium) (Tabelle 2-21). Die Anzahl der Pflanzen, die Kallus bzw. Wurzeln bildeten, war auf 1/2 B5-Medium signifikant geringer als auf den anderen Medien (Tabelle 2-22). Die höchste Anzahl bewurzelter Pflanzen konnte auf MS-Medium in beiden Konzentrationen beobachtet werden (89 bzw. 93 %) (Tabelle 2-22).

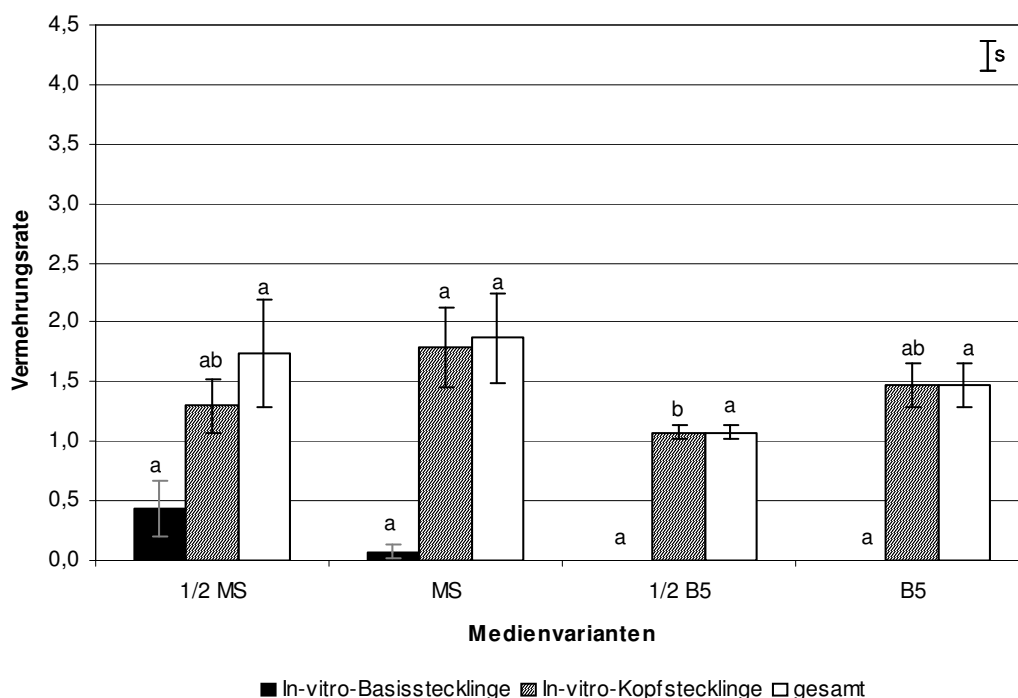


Abbildung 2-10: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 1, Versuchsdurchgang 1)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Tabelle 2-21: Sprosslängen von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 1, Versuchsdurchgang 1)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach paarweisen t-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Sprosslänge (cm)	
	$\bar{x}$	s
1/2 MS	1,8 <sup>a</sup>	± 0,5
MS	1,5 <sup>a</sup>	± 0,2
1/2 B5	1,0 <sup>a</sup>	± 0,0
B5	1,1 <sup>a</sup>	± 0,1

Tabelle 2-22: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 1, Versuchsdurchgang 1)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1/2 MS	79 <sup>a</sup>	± 9	89 <sup>a</sup>	± 9
MS	93 <sup>a</sup>	± 5	93 <sup>a</sup>	± 5
1/2 B5	25 <sup>b</sup>	± 17	22 <sup>b</sup>	± 14
B5	72 <sup>a</sup>	± 18	75 <sup>a</sup>	± 15

Aufgrund der Steigerung der Pflanzenqualität durch den Austausch von Fe-Na-EDTA bzw. Plant Agar durch Fe-EDDHA bzw. Gelrite bei den Sorten 'Adria' bzw. 'Nachtigall' (Kap. 2.2.2.3 und 2.2.2.4) wurden diese im zweiten Versuchsdurchgang verwendet. Auf allen Medien war eine deutlich größere Sprosstreckung als im ersten Versuch zu beobachten (Tabelle 2-21, Tabelle 2-23 )

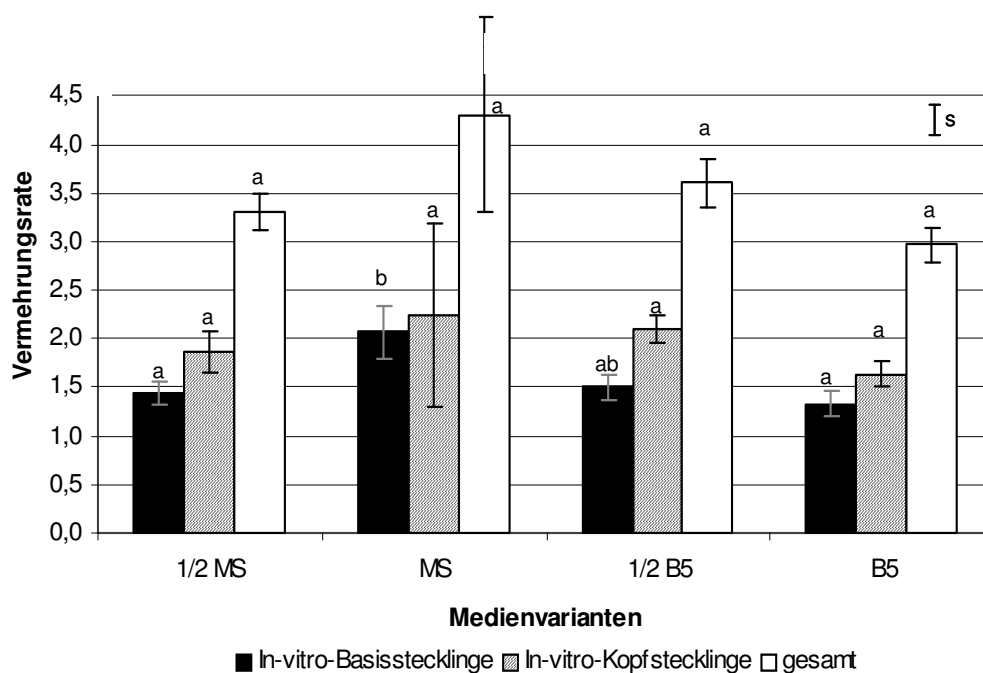
**Tabelle 2-23: Sprosslängen von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 1, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach paarweisen Wilcoxon-Test bei  $p \leq 0,05$ ; n = 6 Wiederholungen

Medienvariante	Sprosslänge (cm)	
	$\bar{x}$	s
1/2 MS	3,9 <sup>a</sup>	±0,2
MS	4,7 <sup>b</sup>	±0,5
1/2 B5	2,7 <sup>c</sup>	±0,2
B5	2,9 <sup>c</sup>	±0,2

Ebenso war die Anzahl der geernteten In-vitro-Stecklinge nach dem zweiten Versuchsdurchgang auf allen Medien deutlich größer als nach dem ersten. Wie bereits im ersten Durchgang war die Kultur auf MS-Medium am erfolgreichsten (4,3 Stecklinge) (Abbildung 2-11). Während im ersten Versuchsdurchgang eine Kultur auf 1/2 B5-Medium zu den geringsten Vermehrungsraten (1,1) führte, konnte im zweiten Versuchsdurchgang ein deutlich besseres Ergebnis auf diesem Medium erzielt werden. Die geringste Anzahl Stecklinge (3,0) wurde von Pflanzen auf B5-Medium geerntet (Abbildung 2-11).

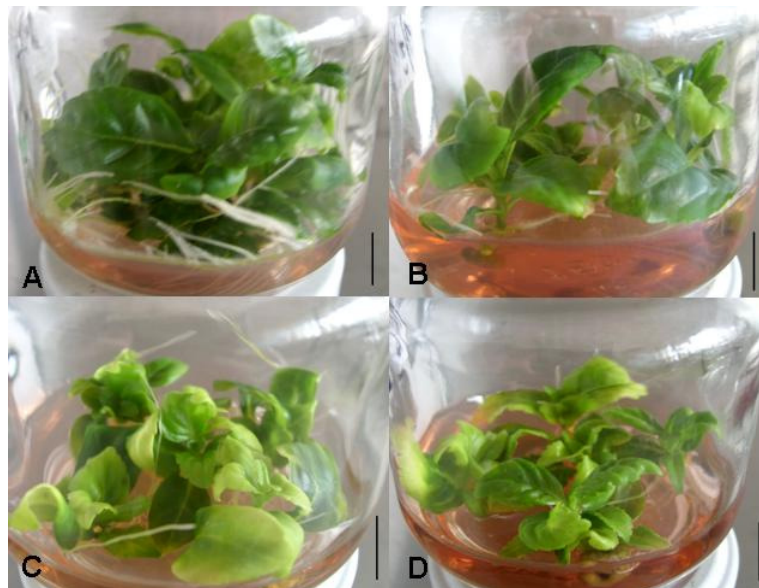
Alle Sprosse bildeten unabhängig vom Kulturmedium Kallus und Wurzeln.



**Abbildung 2-11: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 1, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

In beiden Versuchsdurchgängen waren deutliche Unterschiede in der Pflanzenqualität zu beobachten (Abbildung 2-12). Sprosse, die auf MS-Medien kultiviert wurden, wiesen eine deutlich bessere Qualität auf. So waren die Blätter nicht nur von intensiverer Grünfärbung, sondern auch größer als bei den Sprossen, die auf B5-Medium kultiviert wurden. Ebenso war das Wurzelsystem besser ausgeprägt.



**Abbildung 2-12: Pflanzen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' mit unterschiedlicher Qualität nach zwei sechswöchigen Kulturpassagen auf verschiedenen Nährmedien**

- A - MS-Medium mit voller Nährstoffkonzentration
  - B - MS-Medium mit halber Nährstoffkonzentration
  - C - B5-Medium mit voller Nährstoffkonzentration
  - D - B5-Medium mit halber Nährstoffkonzentration
- (Balken entsprechen 1 cm)

In den Vermehrungsversuchen mit der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' wurde in beiden Versuchsdurchgängen Fe-EDDHA als Eisenform genutzt. Im ersten Versuchsdurchgang erfolgte die Pflanzenkultur auf Medien, die mit Plant Agar (8 g/l) verfestigt wurden. Im zweiten Durchgang diente Gelrite (3,8 g/l) zur Verfestigung.

Die Ergebnisse bezüglich der Vermehrungsraten und der Sprosslänge waren in beiden Versuchsdurchgängen ähnlich, so dass im Folgenden nur die Ergebnisse des ersten Versuchsdurchgangs dargestellt werden. Die Ergebnisse des zweiten Versuchsdurchgangs sind im Anhang (Abbildung A 6) zu finden.

Die gesteigerte Sprosslänge (2,6 bzw. 3,8 cm) (Tabelle A 1) bei Kultur auf den beiden MS-Medien führte dazu, dass eine höhere Anzahl an In-vitro-Basisstecklingen geerntet werden konnte. Die signifikant geringste Anzahl an Seitensprossen wurde an Pflanzen auf B5-Medium gebildet. Bei Betrachtung der In-vitro-Basis- und Kopfstecklinge (Stecklinge gesamt) zeigte sich, wie bereits bei Untersuchungen mit der Sorte 'Libelle', eine bessere Eignung der MS-Medien gegenüber den B5-Medien, wobei eine Kultur auf Medium mit voller Nährstoffkonzentration zu einer höheren Vermehrungsrate (3,0) führte als die Kultur auf Medien mit halber Konzentration der MS-Salze (Vermehrungsrate von 2,4) (Abbildung 2-13).

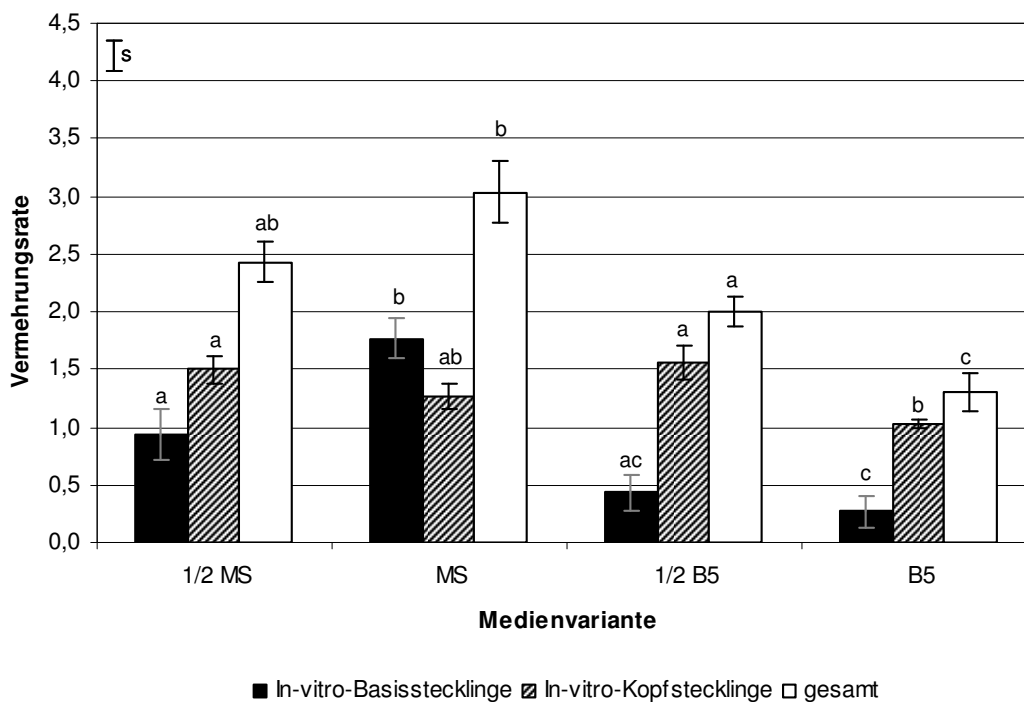


Abbildung 2-13: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 2, Versuchsdurchgang 1)

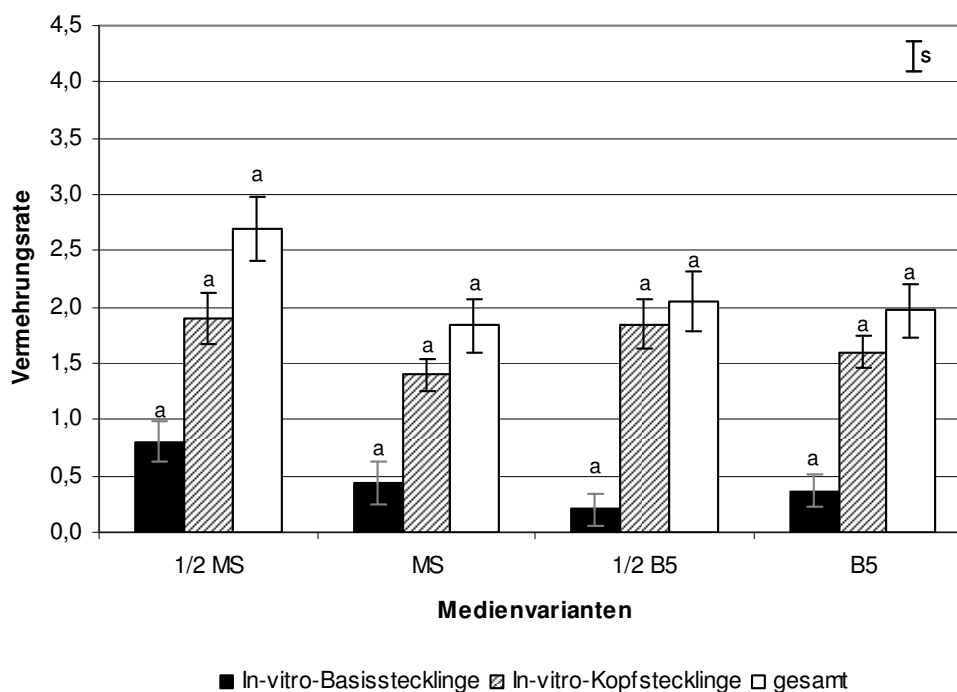
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Ein Einfluss der Nährsalze auf die Bewurzelung von Pflanzen der Sorte 'Adria' war nicht zu beobachten. In beiden Versuchsdurchgängen wurden Wurzeln an allen Sprossen gebildet. Das Niveau der Kallusbildung variierte zwischen den Versuchsdurchgängen sehr stark auf beiden Medien nach MURASHIGE & SKOOG (1962) (Tabelle A 2). Im ersten Versuchsdurchgang wurde Kallus an allen Sprossen beobachtet, im zweiten Versuchsdurchgang bildeten deutlich weniger Sprosse Kallus (60 %). Diese starken Unterschiede zwischen den Versuchsdurchgängen konnten jedoch nicht bei Kultur auf B5-Medien beobachtet werden (Tabelle A 2).

In beiden Versuchsdurchgängen war wie bereits in den Versuchen mit der Sorte 'Libelle' die Grünfärbung der Blätter von Pflanzen, die auf den MS-Medien kultiviert wurden, deutlich intensiver als die Blattfärbung bei den Pflanzen, die auf den B5-Medien kultiviert wurden.

In der Versuchsreihe zum Einfluss der Nährsalze wurden ebenfalls Sprossspitzen von *H. macrophylla* 'Blaumeise' untersucht. Im ersten Versuchsdurchgang wurden den Medien Fe-Na-EDTA und Plant Agar hinzugegeben. Im zweiten Versuchsdurchgang wurden hingegen Fe-EDDHA und Gelrite verwendet.

Die am besten geeignete Nährsalzformulierung war im ersten Versuchsdurchgang die nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) in halber Nährstoffkonzentration (Abbildung 2-14). Nach Kultur auf diesem Medium konnten sowohl die meisten Basis- als auch Kopfstecklinge geerntet werden, so dass eine durchschnittliche Vermehrungsrate (Stecklinge gesamt) von 2,7 erzielt werden konnte. Die Kultur auf den anderen Medien führte zu niedrigeren Raten von durchschnittlich 1,8 bei Kultur auf MS-Medium bzw. 2,0 bei Kultur auf B5-Medium und 2,1 bei Kultur auf 1/2 B5-Medium (Abbildung 2-14). Bezügliche der Sprosslängen konnten keine Unterschiede zwischen den Medienvarianten beobachtet werden. Durchschnittlich wurden Sprosslängen zwischen 2,4 und 2,8 cm gemessen.



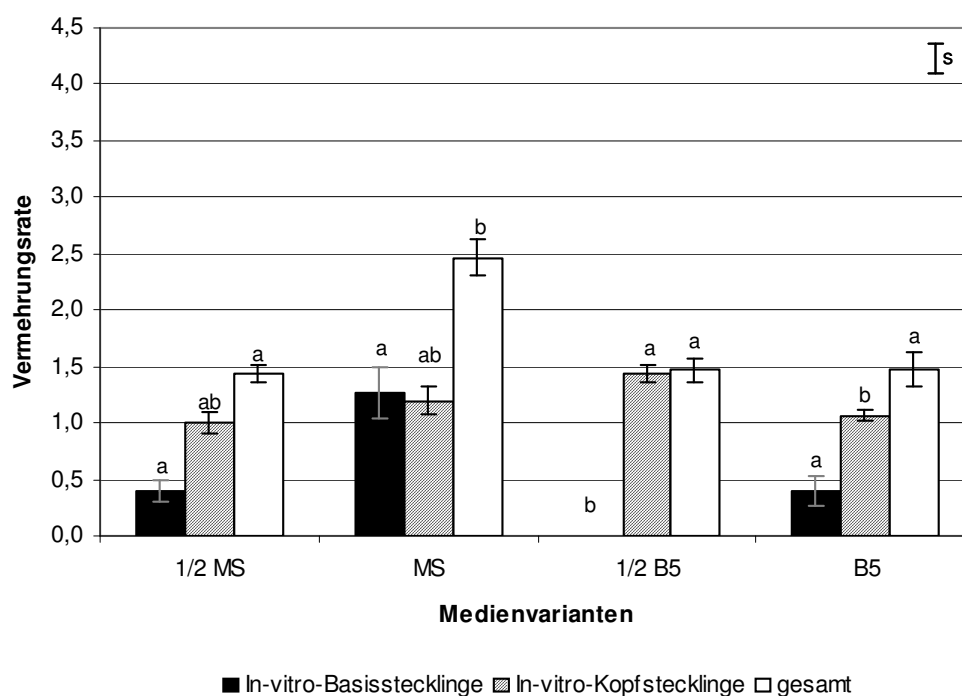
**Abbildung 2-14: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 3, Versuchsdurchgang 1)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Ein signifikanter Einfluss der Nährsalze konnte weder bei der Kallusbildung noch bei der Bewurzelung der Sprosse festgestellt werden. 85 bis 96 % aller Pflanzen bildeten unabhängig vom Medium Wurzeln und 90 bis 97 % der Sprosse bildeten Kallus (Tabelle A 4).

Im zweiten Versuchsdurchgang war, wie bereits im ersten Durchgang, die Kultur auf einem Nährmedium nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) am erfolgreichsten (Abbildung

2-15). Im Gegensatz zum ersten Durchgang war jedoch eine volle Konzentration der Nährsalze besser geeignet und führte, vor allem durch die längeren Sprosse (Tabelle A 5), zu einer signifikant höheren Anzahl In-vitro-Stecklinge pro Spross (2,5 Stecklinge gesamt). Auf allen drei anderen verwendeten Medien betrug die Vermehrungsrate 1,4 bzw. 1,5 (Abbildung 2-15).



**Abbildung 2-15: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 3, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Der Anteil Pflanzen mit Wurzelbildung (37 %) war auf B5-Medium mit halber Nährstoffkonzentration deutlich geringer als bei Kultur auf den anderen Medien (80 bis 97 %). Ebenso wie im ersten konnte auch im zweiten Versuchsdurchgang kein Einfluss der Nährsalzformulierung auf die Kallusbildung festgestellt werden (Tabelle A 6).

Die Messung der pH-Werte in den Kulturmedien am Ende der Kulturpassage zeigte, einen Wert um 5. Einzig in den Kulturmedien mit der halben Nährstoffkonzentration nach GAMBORG ET AL. (1968) wurde ein deutlich höherer Wert von 6,4 gemessen (Tabelle 2-24).



**Tabelle 2-24: pH-Werte der Kulturmedien aus dem Versuch zum Einfluss der Makro- und Mikronährstoffe auf die Vermehrung von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' (Versuch 3, Versuchsdurchgang 2) nach einer Kulturpassage von sechs Wochen**

Medienvariante	pH-Wert des Mediums	
	$\bar{x}$	s
1/2 MS	4,8	± 0,1
MS	5,0	± 0,1
1/2 B5	6,4	± 0,4
B5	5,4	± 0,1

(n = 6 Wiederholungen)

In allen Versuchen zum Einfluss der Nährsalzzusammensetzung konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Nährsalzen nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) für die Vermehrung der untersuchten *H. macrophylla* Sorten besser geeignet war als die Nährsalze nach GAMBORG ET AL. (1968). In der Regel war die Vermehrung bei Kultur der Sprosse auf Medien, die die MS-Salze in voller Konzentration enthielten, höher als auf den anderen Medien. Zusätzlich war die Qualität dieser Sprosse aufgrund der intensiveren Blattfärbung größer.

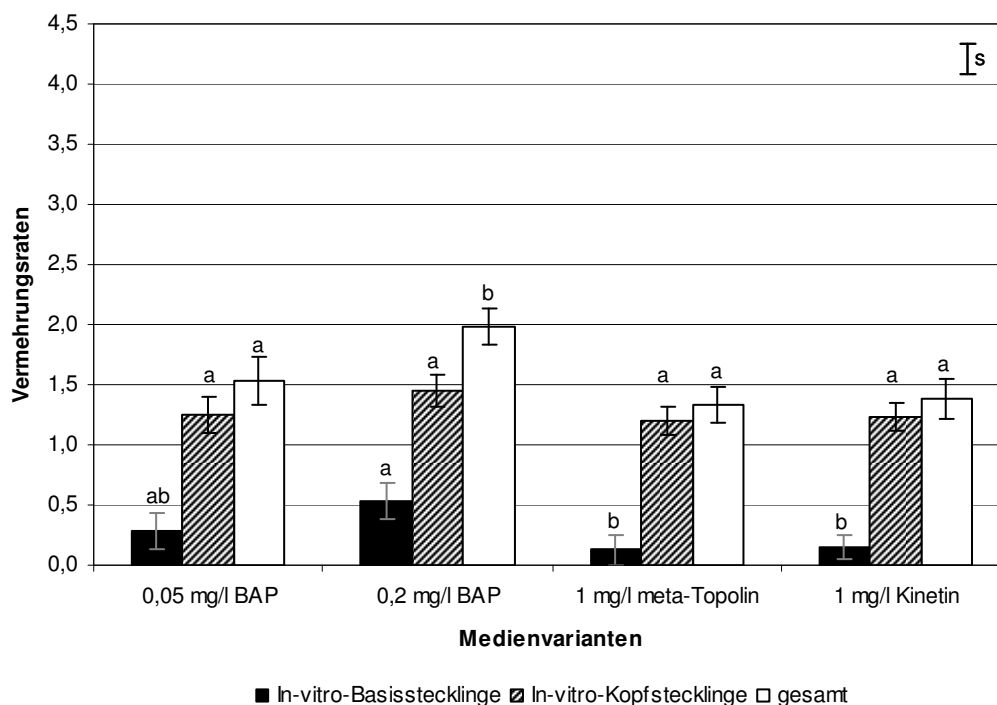
#### 2.2.2.2 Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die Vermehrung

Neben der Zusammensetzung der Makro- und Mikronährstoffe wurde der Einfluss einiger Wachstumsregulatoren auf die Vermehrung der Pflanzen untersucht. In den ersten Versuchen wurde Benzylaminopurin (BAP) in den Konzentrationen 0,05 sowie 0,2 mg/l untersucht. Weiterhin kamen 1 mg/l meta-Topolin und 1 mg/l Kinetin zum Einsatz. Die untersuchten Sorten waren *H. macrophylla* 'Adria', 'Libelle' sowie 'Blaumeise'. Aufgrund der Tatsache, dass es bisher nicht gelungen war, Seitensprosse an Pflanzen der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' auf Medium mit BAP zu induzieren, wurden zudem Versuche mit Flurprimidol durchgeführt. Da die Sprosse eine starke Streckung aufwiesen, sollte untersucht werden, ob eine Hemmung der Sprosstreckung durch die Zugabe des Gibberellinbiosynthesehemmers Flurprimidol zur Bildung von Seitensprossen führt.

In beiden Versuchsdurchgängen mit der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' wurden Fe-EDDHA und Gelrite verwendet. Die Ergebnisse aus beiden Durchgängen ließen eine gemeinsame statistische Verrechnung zu, so dass Mittelwerte und Standardabweichungen aus beiden Durchgängen gezeigt werden.

Bei Kultur auf den BAP-haltigen Medien konnten die meisten In-vitro-Stecklinge geerntet werden. Eine erhöhte Konzentration an BAP (0,2 mg/l) führte zu einer höheren Anzahl sowohl an In-vitro-Basis- als auch an Kopfstecklingen, so dass eine Vermeh-

rungsrate von insgesamt 2,0 erreicht wurde. Die Sprosskultur auf Medien mit 0,05 mg/l BAP bzw. mit je 1 mg/l meta-Topolin und Kinetin führte zu einer signifikant geringeren Vermehrung (1,3 bis 1,5) (Abbildung 2-16).



**Abbildung 2-16: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 4)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage aus zwei Versuchsdurchgängen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 12$  Wiederholungen

Ein signifikanter Unterschied der Sprosslängen konnte nicht beobachtet werden. Alle Sprosse waren zwischen 1,3 und 2,0 cm lang (Tabelle A 7). Ein Einfluss des Wachstumsregulators auf die Wurzelbildung konnte nicht gezeigt werden. Auf allen Medien war die Bewurzelung mit 97 bis 100 % sehr hoch. Eine höhere BAP-Konzentration (0,2 mg/l) führte zu einer höheren Anzahl Sprosse mit Kallus (93 %). Der geringste Pflanzenanteil mit Kallusbildung (73 %) wurde bei Kultur auf Medien mit 0,05 mg/l BAP beobachtet. Die beiden anderen verwendeten Wachstumsregulatoren führten zu 85 % (Kinetin) bzw. 89 % (meta-Topolin) Pflanzen mit Kallus (Tabelle 2-25).

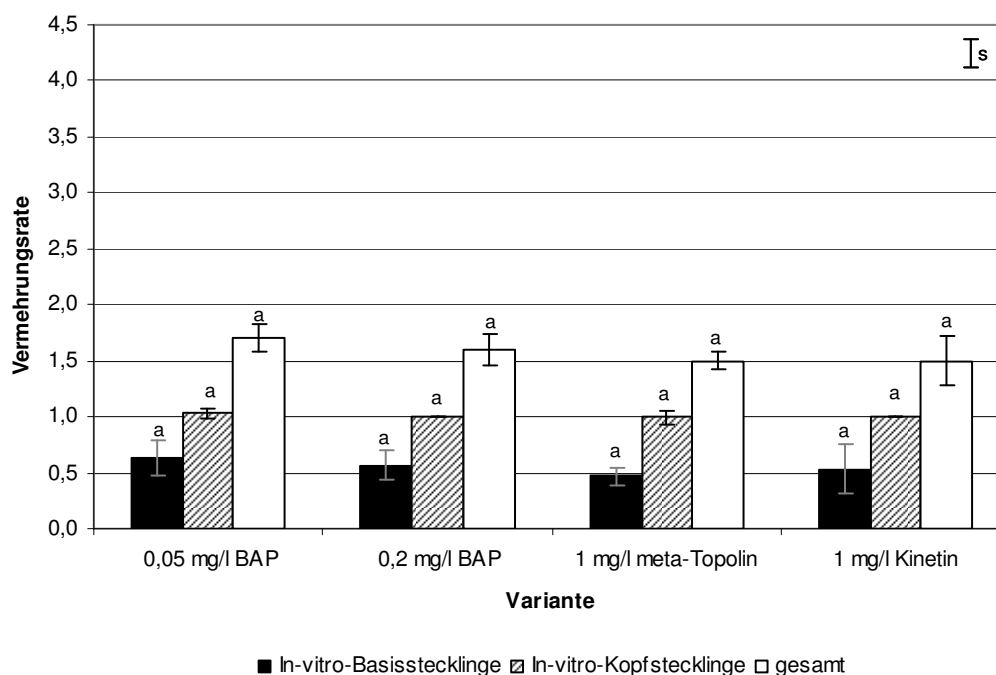
**Tabelle 2-25: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 4)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage aus zwei Versuchsdurchgängen. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach paarweisen Wilcoxon-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 12$  Wiederholungen

Variante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
0,05 mg/l BAP	73 <sup>a</sup>	± 14	98 <sup>a</sup>	± 3
0,2 mg/l BAP	93 <sup>a</sup>	± 5	97 <sup>a</sup>	± 4
1 mg/l meta-Topolin	89 <sup>a</sup>	± 8	98 <sup>a</sup>	± 3
1 mg/l Kinetin	85 <sup>a</sup>	± 10	100 <sup>a</sup>	0

Im ersten Versuchsdurchgang mit der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' wurde Fe-Na-EDTA (36,7 mg/l) und Plant Agar (8 g/l) verwendet im zweiten Versuchsdurchgang Fe-EDDHA (85,6 mg/l) sowie Gelrite (3,8 g/l).

Die Daten beider Versuchsdurchgänge waren ähnlich, daher werden exemplarisch die Daten des zweiten Versuchsdurchgangs gezeigt. Die Ergebnisse des ersten Durchgangs sind im Anhang zu finden (Abbildung A 7 und Tabelle A 8). Auf allen Medien betrug die durchschnittliche Sprosslänge 2 cm. Es konnte kein signifikanter Einfluss der verwendeten Wachstumsregulatoren auf die Vermehrung von Sprossen der Sorte 'Adria' festgestellt werden (Vermehrungsraten zwischen 1,5 und 1,7) (Abbildung 2-17).



**Abbildung 2-17: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 5, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach paarweisen Wilcoxon-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Auf allen Medien bewurzelten 100 % der Pflanzen (Tabelle A 9). Kallus bildete nur ein geringer Teil der Pflanzen (13 bis 20 %).

Der pH-Wert am Ende der Kulturpassage war in allen Medien mit Werten zwischen 3,9 und 4,5 ähnlich, jedoch erheblich niedriger als der zu Versuchsbeginn eingestellte pH-Wert von 5,7 (Tabelle 2-26).

**Tabelle 2-26: pH-Werte der Kulturmedien aus dem Versuch zum Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die Vermehrung von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' (Versuch Verm 5, Versuchsdurchgang 1) nach einer Kulturpassage von sechs Wochen**

Variante	pH-Wert des Mediums	
	$\bar{x}$	s
0,05 mg/l BAP	4,4	± 0,1
0,2 mg/l BAP	4,5	± 0,1
1 mg/l meta-Topolin	3,9	± 0,1
1 mg/l Kinetin	4,4	± 0,1

(n = 6 Wiederholungen)

Im dritten Versuch dieser Versuchsreihe wurden Sprosse der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' untersucht. Im ersten Versuchsdurchgang erfolgte die Kultur auf Medien, die Fe-Na-EDTA und Plant Agar enthielten. Im zweiten Durchgang wurde den Medien Fe-EDDHA und Gelrite zugegeben.

Nach dem ersten Versuchsdurchgang konnten von Medien mit meta-Topolin bzw. Kinetin Sprosse geerntet werden, die durchschnittlich 2 cm lang waren. Dadurch stieg die Anzahl der zu gewinnenden In-vitro-Basisstecklinge (0,8 bzw. 0,9) im Vergleich mit Pflanzen von BAP-haltigen Medien, die durchschnittlich 1 cm lang waren. Einen deutlichen Effekt auf die Bildung von Seitensprossen (In-vitro-Kopfstecklingen) hatte BAP in der höheren Konzentration (0,2 mg/l). Durchschnittlich konnten auf diesen Medien 2,0 In-vitro-Kopfstecklinge geerntet werden und damit signifikant mehr als auf den drei anderen Medien. Bei dem Vergleich der Summe von In-vitro-Basis- und Kopfstecklingen war die Kultur auf 0,2 mg/l BAP am erfolgreichsten. Die geringste Vermehrung wurde durch Verwendung von 0,05 mg/l BAP erreicht (Abbildung 2-18).

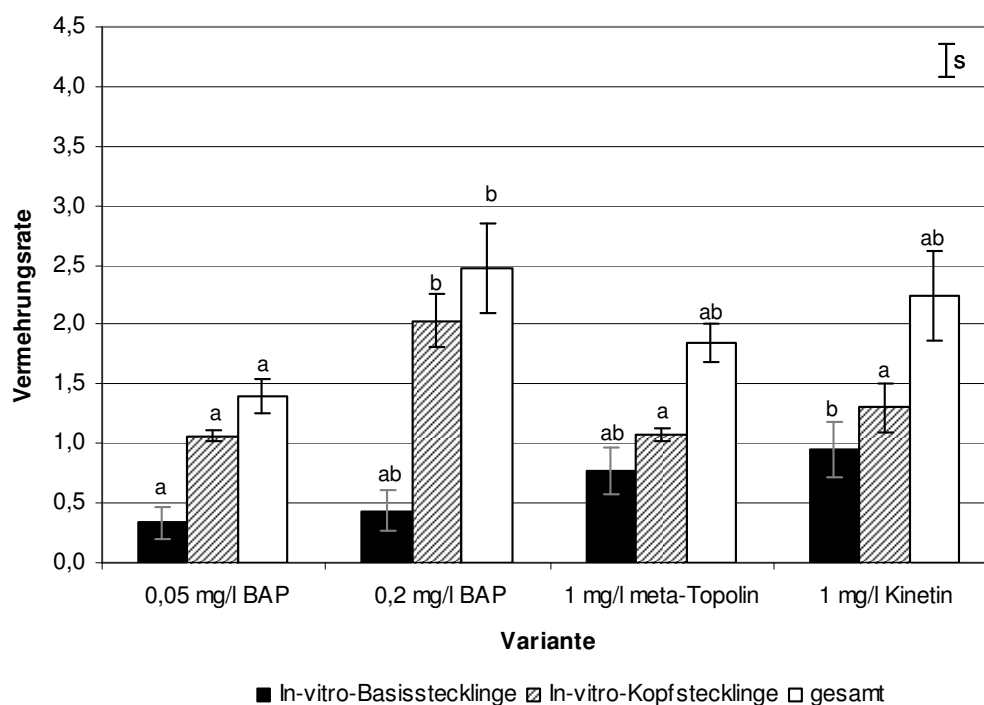


Abbildung 2-18: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 6, Versuchsdurchgang 1)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Kallusbildung wurde an deutlich weniger Sprossen (53 %) auf Medien mit 0,05 mg/l BAP beobachtet als auf Medien mit der höheren BAP Konzentration bzw. meta-Topolin oder Kinetin (90 bzw. 97 %). Die Bewurzelung war mit 87 bis 100 % auf allen Medien ähnlich (Tabelle 2-27).

Tabelle 2-27: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 6, Versuchsdurchgang 1)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Variante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
0,05 mg/l BAP	53 <sup>a</sup>	± 14	87 <sup>a</sup>	± 10
0,2 mg/l BAP	97 <sup>b</sup>	± 4	97 <sup>a</sup>	± 4
1 mg/l meta-Topolin	97 <sup>b</sup>	± 4	100 <sup>a</sup>	0
1 mg/l Kinetin	90 <sup>b</sup>	± 8	100 <sup>a</sup>	0

Die pH-Werte aller Medien schwankten um den Wert 5. Ein deutlicher Unterschied konnte nicht beobachtet werden (Tabelle 2-28).

Tabelle 2-28: pH-Werte der Kulturmedien aus Versuch Verm 6, Versuchsdurchgang 1 nach einer Kulturpassage von sechs Wochen

Variante	pH-Wert im Nährmedium	
	$\bar{x}$	s
0,05 mg/l BAP	4,7	± 0,6
0,2 mg/l BAP	4,6	± 0,6
1 mg/l Kinetin	5,0	± 0,4
1 mg/l meta-Topolin	5,2	± 0,5

(n = 6 Wiederholungen)

Da die Ergebnisse bezüglich der Vermehrungsraten im zweiten Versuchsdurchgang ähnlich denen des ersten waren, werden sie nur im Anhang gezeigt (Abbildung A 8). Bewurzelung sowie Kallusbildung konnten im zweiten Durchgang unabhängig vom verwendeten Wachstumsregulator an allen Sprossen beobachtet werden.

Ziel des vierten Versuchs in dieser Reihe war die Bildung von Axillarsprossen an Pflanzen der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle'. Es wurden Medien mit und ohne 0,5 mg/l Flurprimidol verwendet. Außerdem enthielten die Medien 85,6 mg/l Fe-EDDHA und 3,8 g/l Gelrite sowie 0,2 mg/l BAP, jedoch kein GA<sub>3</sub>. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Pflanzenmaterial konnte dieser Versuch nur mit drei Kulturgefäßen mit je vier Sprossen realisiert werden.

Eine Vermehrung durch Bildung von Seitensprossen konnte nicht erreicht werden. Die Kultur auf Medien mit Flurprimidol führte zu einem verminderten Längenwachstum (1 cm gegenüber 3 cm bei Kultur auf Medium ohne Flurprimidol) (Abbildung 2-19). Aufgrund der verminderten Sprosslänge konnte auch keine Vermehrung durch Ernte von In-vitro-Basisstecklingen erzielt werden (Abbildung 2-20). Ein Einfluss des Flurprimidols auf die Bewurzelung der Sprosse konnte nicht festgestellt werden. Kallus wurde an 11 % der Sprosse, die auf Medien mit 0,5 mg/l Flurprimidol kultiviert wurden gebildet. Die Kultur auf Medien ohne Flurprimidol führte zu keiner Kallusbildung.

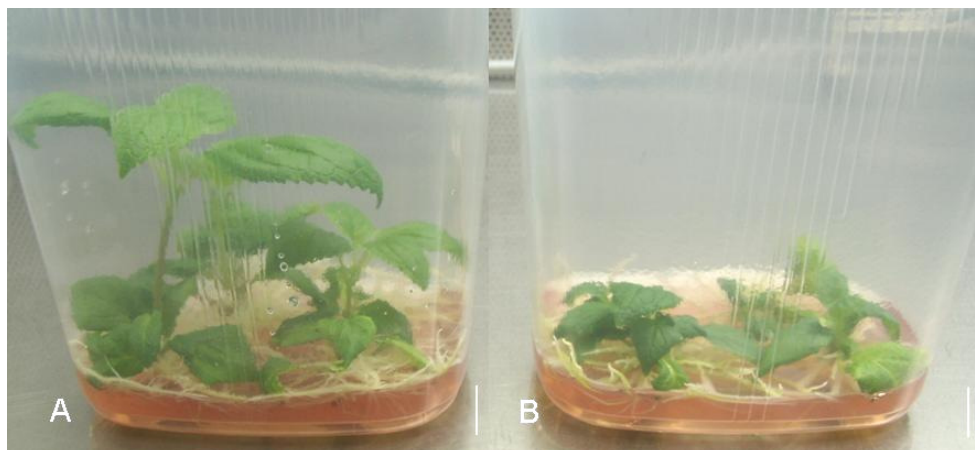


Abbildung 2-19: Sprosse von *H. arborescens* 'Annabelle' nach der zweiten sechswöchigen Kulturpassage auf Medium ohne (A) und mit (B) 0,5 mg/l Flurprimidol (Versuch Verm 7) (Balken entsprechen 1 cm)

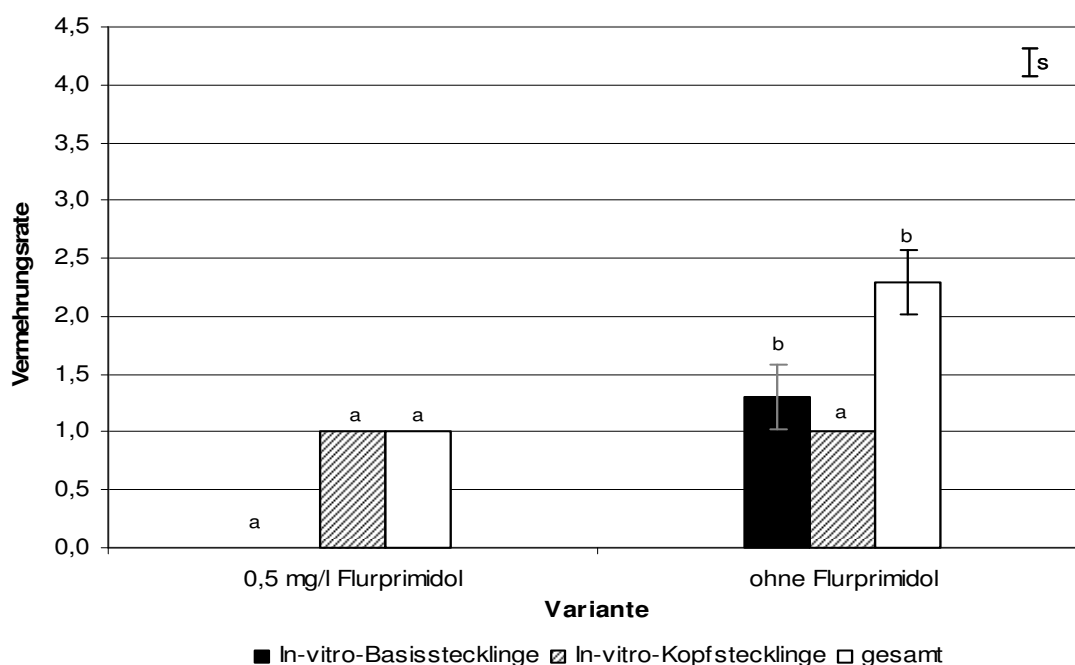


Abbildung 2-20: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 7)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  Kulturgefäße mit je 4 Sprossen

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Kultur auf Medien, welche 0,2 mg/l BAP enthielten, am erfolgreichsten war und fast immer in der höchsten Vermehrungsrate resultierte. Die Verwendung von 0,5 mg/l Flurprimidol führte nicht zu der angestrebten gesteigerten Bildung von Seitensprossen.

### 2.2.2.3 Einfluss der Eisenform auf die Vermehrung

Im Verlauf der Kultur wiesen die Sprosse der Sorte 'Adria' lanzettförmige, deutlich chlorotische Blätter auf, die einen Nährstoffmangel vermuten ließen. Um die Qualität zu steigern, wurden neben dem bisher verwendeten Kulturmedium nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) in halber Nährstoffkonzentration mit 100  $\mu\text{M}$  Fe-Na-EDTA zwei weitere Medien, bei denen die Art und Konzentration der Eisenform (100 und 200  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA) geändert wurde, und ein Medium mit Nährsalzen nach DRIVER UND KUNIYUKI (DKW) (1984) (Tabelle 2-11) getestet.

Abbildung 2-21 zeigt die Unterschiede der Pflanzenqualität bei Kultur auf den verschiedenen Nährmedien. Durch Ersetzen von 100  $\mu\text{M}$  Fe-Na-EDTA mit Fe-EDDHA in gleicher Konzentration konnte die Pflanzenqualität verbessert werden. Die Konzentrationsverdopplung von Fe-EDDHA auf 200  $\mu\text{M}$  führte zu einer weiteren Steigerung der Pflanzenqualität (Vgl. Abbildung 2-21 A, B, C). Die Verwendung der Nährstoffzusammensetzung nach DRIVER UND KUNIYUKI (1984) war hingegen nicht förderlich (Vgl. Abbildung 2-21 A und D).

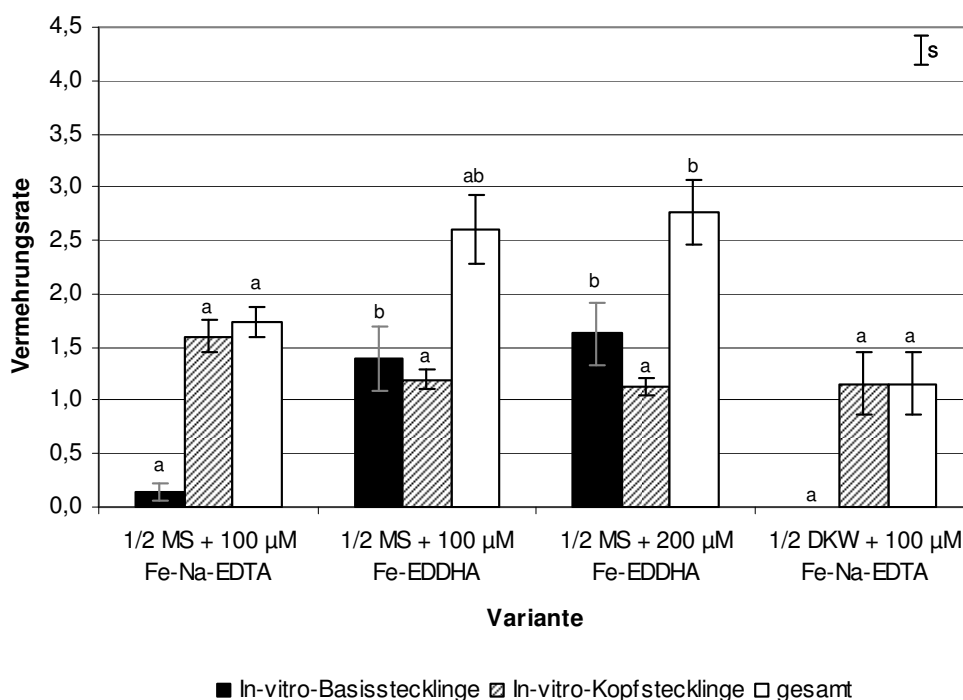


Abbildung 2-21: Sprosse der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' nach zwei Kulturpassagen von je sechs Wochen auf unterschiedlichen Nährmedien

- A - 1/2 MS + 100  $\mu\text{M}$  Fe-Na-EDTA
  - B - 1/2 MS + 100  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA
  - C - 1/2 MS + 200  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA
  - D - 1/2 DKW + 100  $\mu\text{M}$  Fe-Na-EDTA
- (Balken entspricht 1 cm)

Neben der deutlichen Verbesserung der phänotypischen Merkmale wurde auch eine Steigerung der Vermehrung bei Kultur auf den Medien mit Fe-EDDHA erzielt (Abbildung 2-22). Durch die deutlich bessere Streckung der Sprosse (Tabelle 2-29) konnten erheblich mehr In-vitro-Basisstecklinge geerntet werden, so dass Gesamtvermehrungsraten von 2,6 bzw. 2,8 erzielt werden konnten.





**Abbildung 2-22: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Art und der Konzentration der Eisenform bzw. der Nährsalze**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

**Tabelle 2-29: Sprosslängen von Sprossen der Sorte *Hydrangea macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Art und der Konzentration der Eisenform bzw. der Nährsalze**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach paarweisen t-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Variante	Sprosslänge (cm)	
	$\bar{x}$	s
1/2 MS + 100 µM Fe-Na-EDTA	1,3 <sup>a</sup>	± 0,2
1/2 MS + 100 µM Fe-EDDHA	3,0 <sup>b</sup>	± 0,4
1/2 MS + 200 µM Fe-EDDHA	3,6 <sup>b</sup>	± 0,3
1/2 DKW + 100 µM Fe-Na-EDTA	1,0 <sup>a</sup>	± 0,0

Auf Medien mit Fe-EDDHA war im Vergleich mit Medien mit Fe-Na-EDTA eine signifikant höhere Anzahl Sprosse bewurzelt (Tabelle A 10). Kallus wurde auf diesen Medien in ähnlichem Umfang wie auf 1/2 MS- bzw. 1/2 DKW-Medium mit Fe-Na-EDTA gebildet.

Aufgrund der deutlichen Qualitätssteigerung der Pflanzen der Sorte 'Adria' wurden alle in Kultur befindlichen Sorten auf Medien mit 200 µM Fe-EDDHA kultiviert. Bei Pflanzen der Sorte 'Libelle', die ebenfalls vermehrt hellgrüne Blätter aufwiesen, konnte dadurch ebenfalls eine deutlich intensivere Färbung der Blätter erzielt werden.

#### 2.2.2.4 Einfluss des Verfestigungsmittels auf die Vermehrung

Im Verlauf der Pflanzenkultur wurde ein Einrollen der Blattränder beobachtet. Als Ursache wurde Wassermangel vermutet. Deshalb wurden in diesem Versuch In-vitro-Kopfstecklinge von *H. macrophylla* 'Nachtigall' auf Medien, denen statt des bisher verwendeten Plant Agars (8 g/l) Gelrite (3,8 g/l) zugegeben wurde, kultiviert.

Abbildung 2-23 A zeigt Pflanzen mit stark eingerollten Blättern nach Kultur auf Nährmedium mit Plant Agar. Durch die Kultur auf Medien bei denen Gelrite zur Verfestigung eingesetzt wurde konnte dieses Einrollen weitgehend verhindert werden (Abbildung 2-23 B).

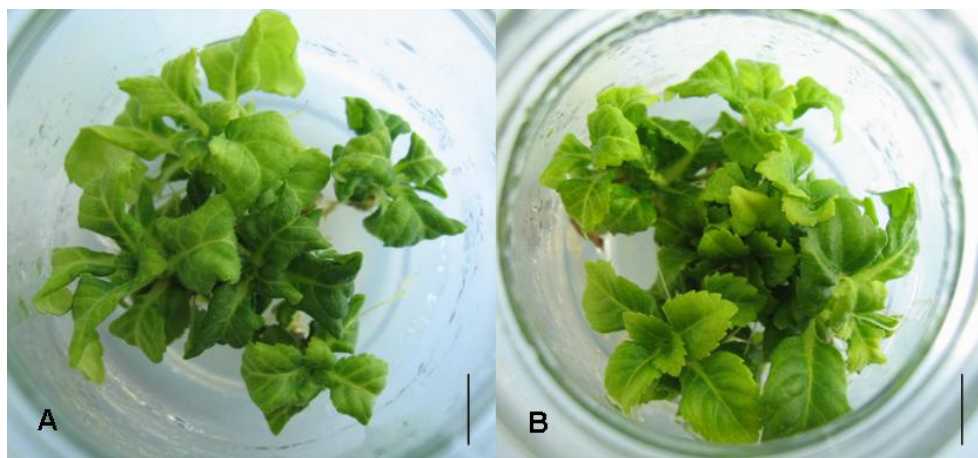
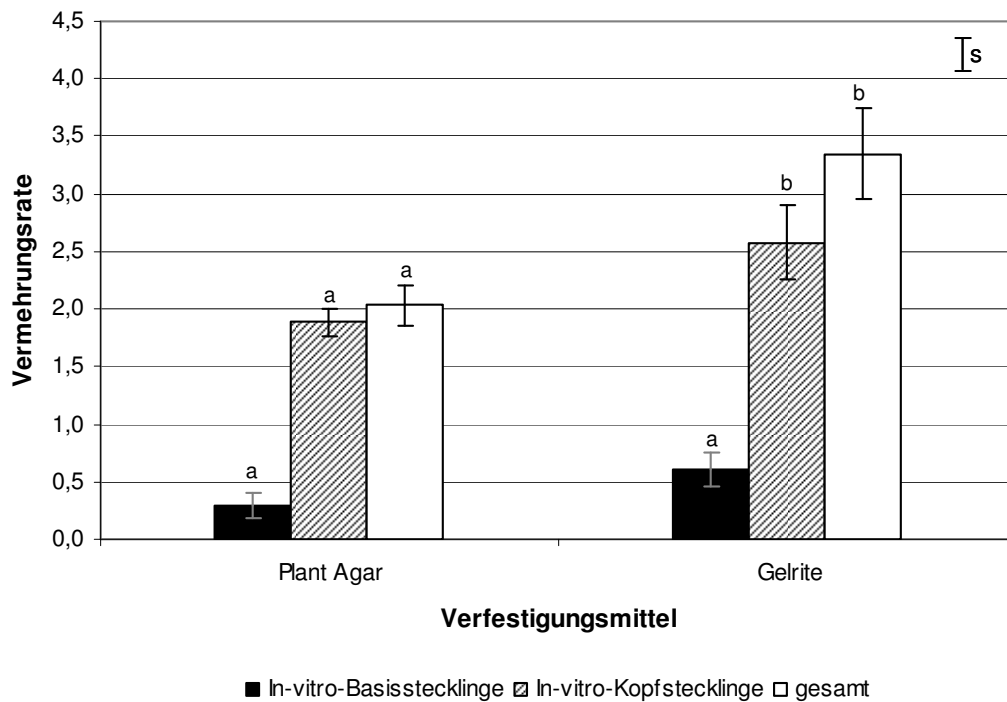


Abbildung 2-23: Sprosse von *H. macrophylla* 'Nachtigall' aus Kultur auf Medium mit 8 g/l Plant Agar (A) bzw. 3,8 g/l Gelrite (B)  
(Balken entsprechen 1 cm)

Neben der phänotypischen Verbesserung der Blätter konnte durch Kultur auf Gelrite verfestigten Medien eine Förderung der Seitensprossbildung von durchschnittlich 1,6 auf 2,8 Kopfstecklinge pro Pflanze (Abbildung 2-24) sowie eine Förderung des Längenwachstums von 1,0 auf 2,3 cm erzielt werden. Die Verwendung von Gelrite führte zu einer verminderten Anzahl an bewurzelten Sprossen. Während die Kultur auf Medium mit Plant Agar zu einer Bewurzelungsrate von 90 % führte, waren nur 60 % der Sprosse, die auf Medium mit Gelrite kultiviert wurden, bewurzelt. Ein Einfluss auf die Kallusbildung wurde nicht beobachtet (Kallusbildungsraten von 98 bzw. 100 %) (Tabelle A 11).



**Abbildung 2-24: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit vom Verfestigungsmittel**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Durch Verwendung von Gelrite anstelle von Plant Agar konnte das Einrollen der Blätter weitestgehend verhindert werden. Zusätzlich konnte auch eine Steigerung der Vermehrung erzielt werden. Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, konnten diese Beobachtungen auch bei den anderen verwendeten Sorten gemacht werden.

#### 2.2.2.5 Vergleich der Kultur auf Festmedium mit der Kultur in einem permanenten bzw. einem temporären Immersionsystem

Die Frage, ob durch eine Änderung des Kultursystems eine Steigerung der Vermehrung erzielt werden kann, stand im Mittelpunkt dieser Versuchsreihe. Neben der bisher verwendeten Kulturmethode auf verfestigten Medien, kamen die permanente Immersion des Pflanzenmaterials und die Kultur in RITA<sup>®</sup>-Gefäßen, in denen eine temporäre Flutung (Vgl. 2.1.5.5) realisiert werden kann, zum Einsatz.

Im ersten Versuch erfolgte die Kultur von In-vitro-Kopfstecklingen der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall'. Die in den jeweiligen Kultursystemen erzielten Vermehrungsraten sind in Abbildung 2-25 dargestellt. Die höchste Vermehrungsrate von 5,3 wurde durch

Kultur in permanenter Immersion erzielt. Allerdings war die Qualität der vermehrten Sprosse aufgrund von Blattvergilbungen und Hyperhydrizität sehr gering (Abbildung 2-26). Sprosse von deutlich höherer Qualität wurden in der temporären Immersion gebildet. Die Vermehrungsrate war von der Flutungshäufigkeit und -dauer abhängig. Ein viermaliges Fluten täglich über vier Minuten führte zu einer Steigerung der Vermehrungsrate von 1,3 auf 3,6.

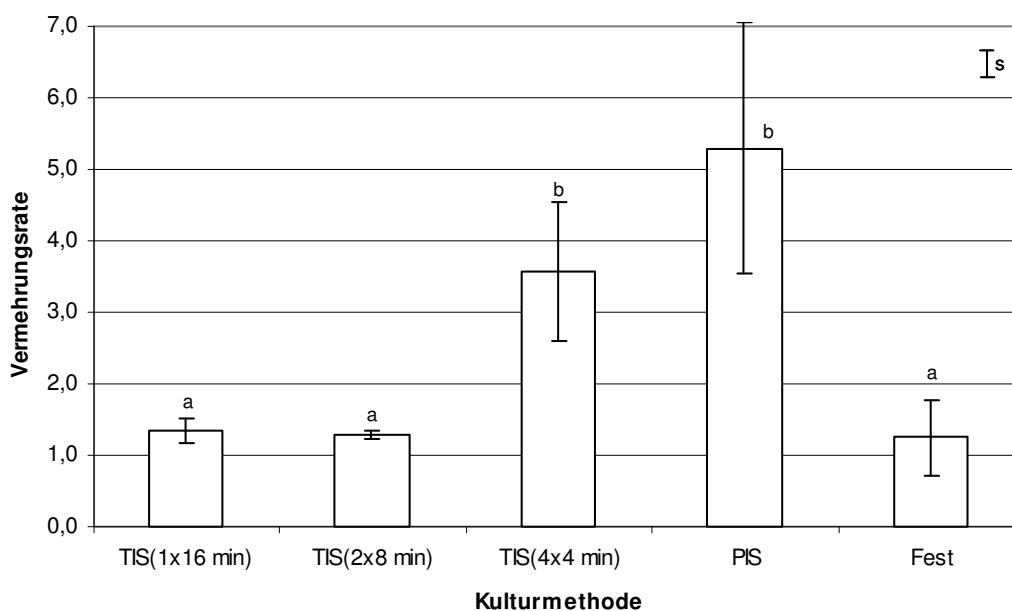


Abbildung 2-25: Vermehrungsraten von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit von der Kulturmethode

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der dritten zweiwöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$  Gefäße mit je 15 Pflanzen bei Kultur in TIS bzw. 10 Gefäße mit je 2 Pflanzen bei Kultur in PIS und auf Festmedium.

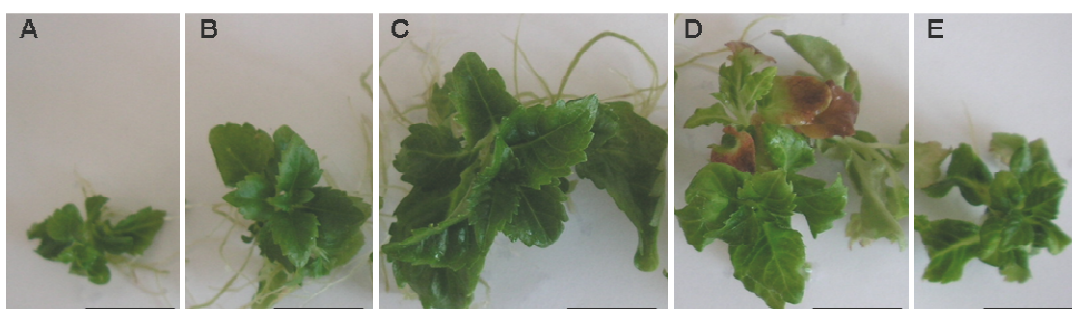


Abbildung 2-26: Einfluss der Kulturmethode auf die Pflanzenqualität von *H. macrophylla* 'Nachtigall'

- A - TIS 1x16 min
  - B - TIS 2x8 min
  - C - TIS 4x4 min
  - D - PIS
  - E - Festmedium
- (Balken entsprechen 1 cm)

Die signifikant längsten Sprosse wurden bei Kultur in der TIS Variante (3,4 cm), die viermal täglich für vier Minuten geflutet wurde und in der Variante mit permanenter Immersion (2,8 cm) gebildet (Tabelle A 12). Ein signifikanter Einfluss auf die Bewurzelung konnte nicht beobachtet werden.

Im zweiten Versuch wurden In-vitro-Kopfstecklinge und In-vitro-Teilstecklinge von *H. arborescens* 'Annabelle' verwendet. Während der ersten Kulturpassage von zwei Wochen fanden noch keine Vermehrung und kaum Sprosslängenwachstum statt. Im Verlauf der zweiten Kulturpassage erfolgte eine deutliche Streckung der Sprosse, die in den RITA<sup>®</sup>-Gefäßen kultiviert wurden. Die Vermehrungsraten nach der zweiten Kulturpassage sind in Abbildung 2-27 dargestellt. Bei Verwendung von In-vitro-Teilstecklingen, die alle jeweils zwei Axillarknospen besaßen, kam es zum Austrieb von nur einer Axillarknospe, so dass pro Explantat nur ein In-vitro-Kopfsteckling geerntet werden konnte. Die Steigerung der Vermehrungsrate in der temporären Immersionskultur ist auf die Sprosstreckung zurückzuführen, die eine Ernte von In-vitro-Basisstecklingen ermöglichte. Die durchschnittliche Sprosslänge bei Kultur in TIS betrug bei Verwendung von In-vitro-Teilstecklingen 12 cm. Demgegenüber fand keine Sprosstreckung auf Festmedium statt. Bei Verwendung von In-vitro-Kopfstecklingen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Seitensprosse wurden nicht gebildet. Auch hier geht die gesteigerte Vermehrungsrate bei Kultur in temporärer Immersion auf eine gesteigerte Sprosslänge (11 cm) und dadurch auf eine höhere Anzahl an verfügbaren In-vitro-Basisstecklingen zurück (Abbildung 2-27, Abbildung 2-28).

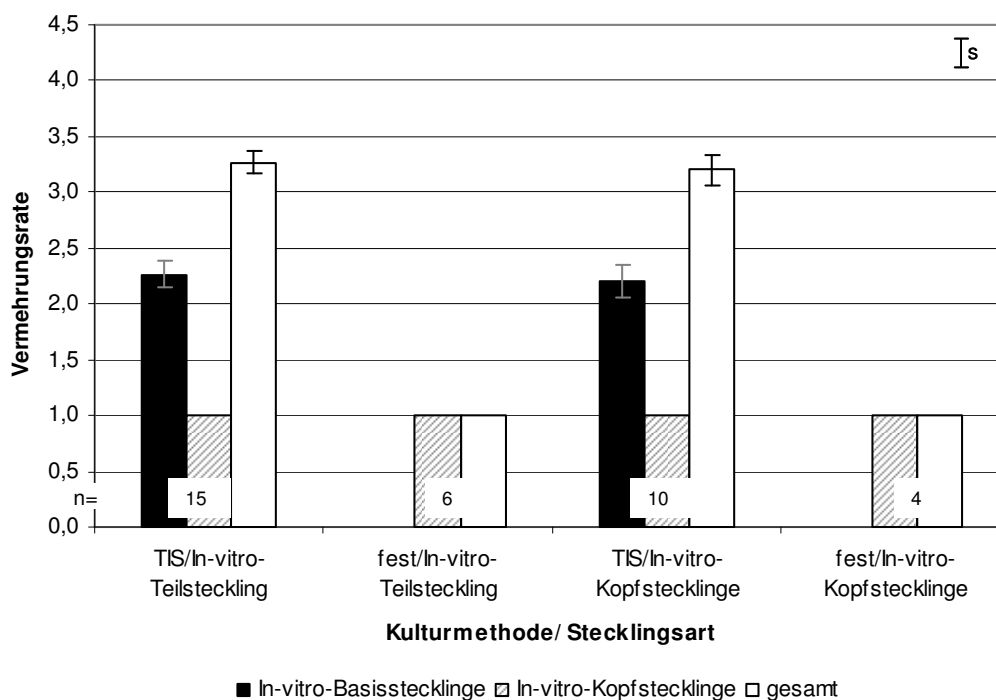


Abbildung 2-27: Vermehrungsraten von In-vitro-Kopf- bzw. In-vitro-Teilstecklingen der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' in Abhängigkeit von der Kulturmethode

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten zweiwöchigen Kulturpassage. Aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen wurde auf eine statistische Verrechnung verzichtet. n = Anzahl der Pflanzen



Abbildung 2-28: Sprosse von *H. arborescens* 'Annabelle' nach zwei Kulturpassagen von je zwei Wochen

A - aus temporärer Immersionskultur  
 B - aus Kultur auf Festmedium  
 (Balken entsprechen 1 cm)

Die Kallusbildung sowie die Bewurzelung sind in Tabelle 2-30 dargestellt. Bei Verwendung von In-vitro-Teilstecklingen, die auf Festmedium kultiviert wurden, war sowohl die Kallusbildung als auch die Bewurzelung etwas reduziert (83 gegenüber 100 %).

**Tabelle 2-30: Kallus- bzw. Wurzelbildung an In-vitro-Kopfstecklingen bzw. -Teilstecklingen der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' nach zwei Kulturpassagen von je zwei Wochen in verschiedenen Kultursystemen**

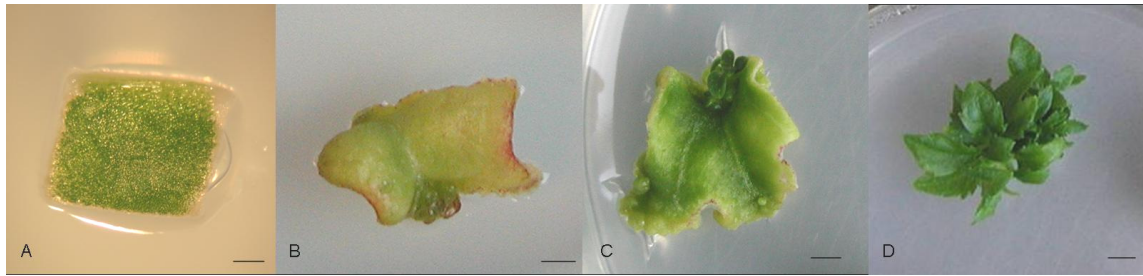
Kulturmedthode/Explantatart	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	<b>s</b>	$\bar{x}$	<b>s</b>
TIS/In-vitro-Teilstecklinge	100	0	100	0
fest/In-vitro-Teilstecklinge	83	± 14	83	± 14
TIS/In-vitro-Kopfstecklinge	100	0	100	0
fest/In-vitro-Kopfstecklinge	100	0	100	0

Im ersten Versuch konnte gezeigt werden, dass eine Kultur in temporärer Immersion zu Sprossen von deutlich besserer Qualität als die Kultur in permanenter Immersion oder auf Festmedium führte. Die höchste Vermehrungsrate wurde bei einer höheren Flutungsfrequenz und gleichzeitig kürzerer Flutungsdauer (viermal täglich für vier Minuten) erzielt. Im zweiten Versuch wurden ebenfalls bei Kultur in temporärer Immersion die höchsten Vermehrungsraten im Vergleich mit der Kultur auf Festmedium erzielt.

### 2.2.3 Versuche zur Regeneration über Organogenese und somatische Embryogenese

Die Regeneration von Adventivsprossen kann durch eine Vielzahl von Einflussfaktoren wie z.B. die Explantatart, die Kultur bei Dunkelheit oder Licht, beeinflusst werden. Als einer der Faktoren mit dem größten Einfluss wurde in dieser Arbeit die Zusammensetzung des Kulturmediums untersucht. Neben der Identifikation eines geeigneten Grundmediums (Makro- und Mikronährstoffe), war die Testung verschiedener Wachstumsregulatoren sowie verschiedener Kohlenhydratquellen Inhalt dieser Versuchsreihe.

In der Regel wurden Blattexplantate der Größe 5 x 5 mm aufgelegt (Abbildung 2-29 A). Beginnende Kallusbildung konnte nach durchschnittlich einer Woche an den Schnittkanten der Explantate beobachtet werden (Abbildung 2-29 B). Am Ende der ersten vierwöchigen Kulturpassage hatten in der Regel 50 bis 100 % der Explantate Kallus gebildet. Regeneration von Adventivsprossen an Blattexplantaten von gut regenerierenden Sorten wie z. B. 'Blaumeise' fand bereits in geringem Umfang nach vier Wochen statt (Abbildung 2-29 C). Die meisten Regenerationsereignisse wurden jedoch im Verlauf der zweiten Kulturpassage beobachtet (Abbildung 2-29 D).



**Abbildung 2-29: Entwicklung von Blattexplantaten**

- A - Blattexplantat 3 Tage nach Präparation
- B - Blattexplantat mit beginnender Kallusbildung nach zweiwöchiger Kultur
- C - Blattexplantat mit Kallusbildung und Adventivsprossregeneration nach einer vierwöchigen Kulturpassage
- D - Blattexplantat mit guter Sprossregeneration nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen (Balken entsprechen 1 mm)

### 2.2.3.1 Einfluss der Nährsalzzusammensetzung auf die Regeneration von Adventivsprossen

In diesen Versuchen wurde der Einfluss verschiedener Nährsalze auf die Adventivsprossregeneration der vier *Hydrangea macrophylla* Sorten 'Nachtigall', 'Libelle', 'Adria' und 'Blaumeise' untersucht. Zur Anwendung kam zum einen eine Nährsalzkombination nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) (Tabelle 2-2) und zum anderen nach GAMBORG ET AL. (1968) (Tabelle 2-3). Beide Nährmedien fanden in halber und voller Konzentration der Nährsalze Verwendung.

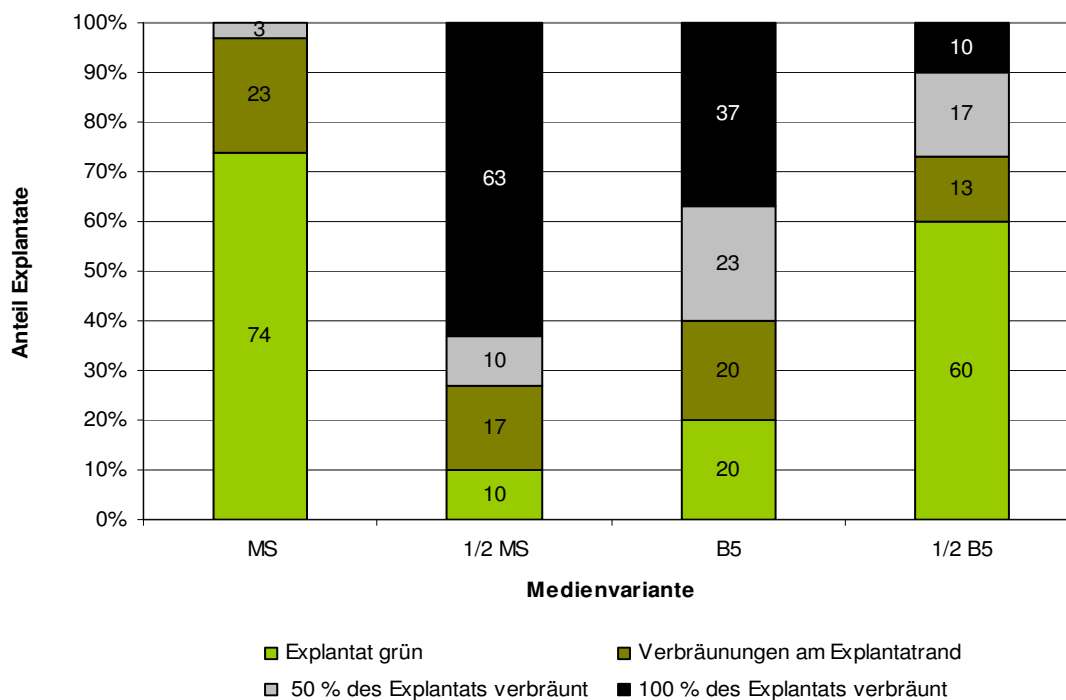
Die Ergebnisse bezüglich der Anzahl gebildeter Sprosse und der Sprossregenerationsrate aus beiden Versuchsdurchgängen mit der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' waren ähnlich und ließen eine gemeinsame statistische Verrechnung zu. In Abbildung 2-32 sind daher Mittelwerte und Standardabweichungen aus beiden Versuchsdurchgängen dargestellt. Die Darstellung der Boniturergebnisse der Verbräunung der Explantate sowie der Kallusbildung erfolgt für beide Versuchsdurchgänge getrennt.

Innerhalb der ersten Kulturpassage von vier Wochen hatten bereits nahezu alle Explantate auf allen Medien grünen kugelig strukturierten Kallus gebildet. Nach der zweiten Kulturpassage hatten alle Explantate Kallus gebildet, außer in Versuchsdurchgang 1 bei Verwendung des Mediums nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) in voller Nährstoffkonzentration auf dem eine Kallusbildungsrate von 80 % beobachtet wurde. Teilweise begann der Kallus sich braun zu verfärben. Dies trat auf allen verwendeten Medien auf.

Im ersten Versuchsdurchgang hatten 90 % der Explantate, die auf 1/2 MS Medium kultiviert wurden Verbräunungserscheinungen. Bei Kultur auf MS Medium in voller Nährstoffkonzentration waren es dagegen nur 26 %. Die Verwendung der B5 Nährsalze in halber Nährstoffkonzentration führte zu einer geringeren Anzahl verbräunter Explantate

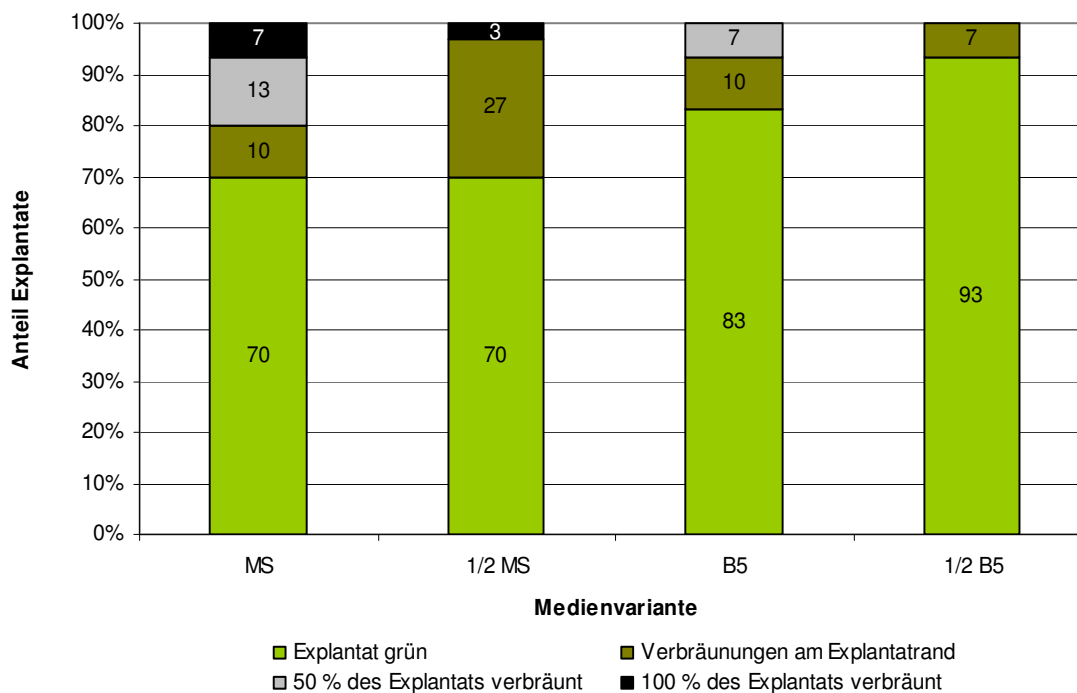


als bei Verwendung in voller Konzentration (Abbildung 2-30). Im zweiten Versuchsdurchgang traten in allen Varianten deutlich weniger Verbräunungen auf. Unabhängig vom Nährmedium waren mindestens 70 % der Explantate zu Versuchsende grün (Abbildung 2-31).



**Abbildung 2-30:** Grad der Verbräunung der Blatexplantate des Genotyps *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit vom verwendeten Grundmedium und dessen Konzentration (Versuch 1, Versuchsdurchgang 1)

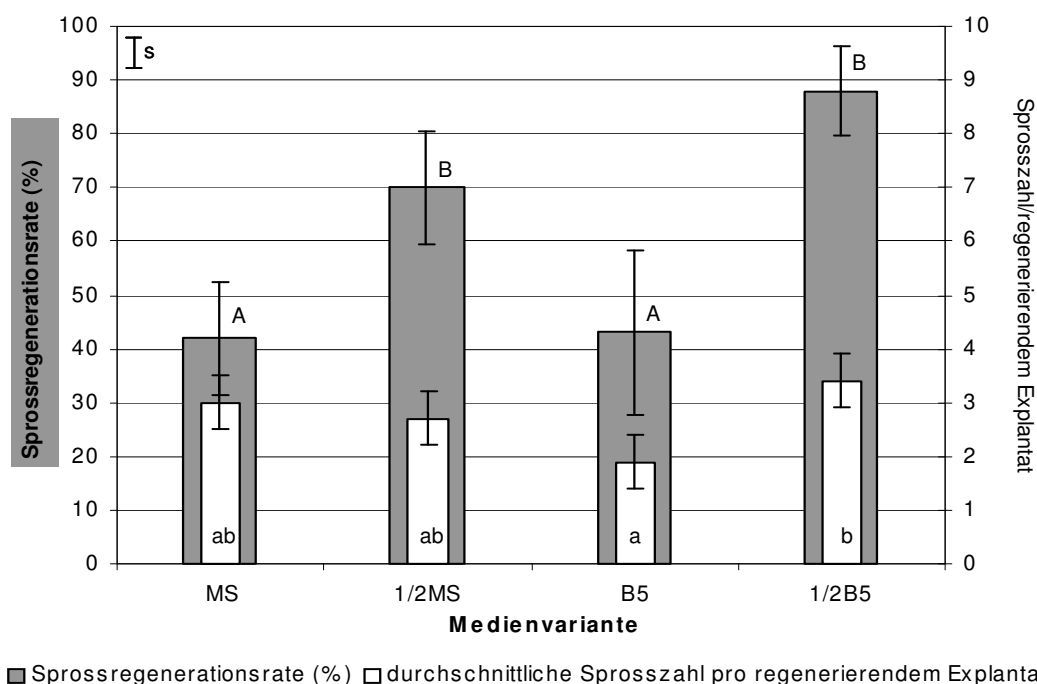
Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen (n = 6 Wiederholungen)



**Abbildung 2-31: Grad der Verbräunung der Blattexplantate des Genotyps *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit vom verwendeten Grundmedium und dessen Konzentration (Versuch 1, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen (n = 6 Wiederholungen)

Der Vergleich der Regeneration von Adventivsprossen auf den vier verschiedenen Medien zeigte, dass bei Verwendung der jeweiligen Nährsalze in voller Konzentration eine signifikant niedrigere Anzahl Explantate Sprosse bildete als bei Verwendung der Medien mit halber Nährstoffkonzentration. Die höchste Regenerationsrate (88 %) sowie die höchste Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat (3,4) wurde bei Kultur auf 1/2 B5-Gamborg Medium erzielt (Abbildung 2-32).



**Abbildung 2-32: Sprossregeneration an Blattexplantaten von *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit von der Nährstoffzusammensetzung und -konzentration (Versuch 1)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen. Großbuchstaben ermöglichen den Vergleich der Regenerationsraten, Kleinbuchstaben ermöglichen den Vergleich zwischen der durchschnittlich gebildeten Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 12$  Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge á 6 Petrischalen)

Beim Vergleich der pH-Werte der Kulturmedien konnte beobachtet werden, dass die pH-Werte der Medien, die eine signifikant höhere Sprossregenerationsrate aufwiesen (1/2 MS bzw. 1/2 B5), im Mittel bei 6,4 und 6,8 lagen. Die pH-Werte der Medien, auf denen weniger Explantate Sprosse regenerierten, lagen entweder unter diesem Bereich (MS-Medium, pH-Wert 5,9) bzw. deutlich darüber (B5-Medium, pH-Wert 7,7) (Tabelle 2-31).

**Tabelle 2-31: pH-Werte der Kulturmedien nach vierwöchiger Kultur von Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall'**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n = 6$  Wiederholungen

Medium	Versuchsdurchgang 1		Versuchsdurchgang 2		Mittel aus beiden Versuchsdurchgängen	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
MS	6,0	± 0,5	5,8	± 0,2	5,9	± 0,2
1/2 MS	6,4	± 0,6	6,4	± 0,3	6,4	± 0,3
B5	7,9	± 0,3	7,5	± 0,3	7,7	± 0,2
1/2 B5	7,1	± 0,2	6,5	± 0,4	6,8	± 0,3

Die Ergebnisse aus insgesamt drei Versuchsdurchgängen zur Adventivsprossbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' sind in Tabelle 2-32 dargestellt. In jedem der drei Versuchsdurchgänge hatten 100 % der Explantate, die auf 1/2 B5-Medium kultiviert wurden, am Versuchsende Kallus gebildet. Die geringste Kallusbildung wurde auf MS-Medium beobachtet. Die Verwendung von Gelrite als Verfestigungsmittel und Fe-EDDHA als Eisenform im dritten Versuchsdurchgang führte zu einer höheren Anzahl an Explantaten mit Kallus vor allem auf den MS-Medien, die in den ersten beiden Versuchsdurchgängen geringere Kallusbildung zeigten. In allen Versuchsdurchgängen verfärbte sich der Kallus auf allen Medien zum Versuchsende stellenweise braun. Außerdem war nur eine geringe Verbräunung der Blattexplantate zu beobachten. Durchschnittlich waren am Ende der achtwöchigen Versuchsdauer unabhängig vom Kulturmedium noch 82 bis 96 % der Explantate grün.

Es konnten nur sehr wenige Sprossregenerationsereignisse beobachtet werden. In den ersten beiden Versuchsdurchgängen wurden Sprosse ausschließlich auf 1/2 B5-Medium bzw. 1/2 MS-Medium gebildet. Die Regenerationsraten waren in beiden Versuchsdurchgängen mit je 3 % jedoch sehr gering. Im dritten Durchgang des Versuchs, bei dem Gelrite und Fe-EDDHA verwendet wurden, konnten im Gegensatz zu den ersten beiden Versuchsdurchgängen auf allen vier Medien Regenerationsereignisse beobachtet werden. Es zeigte sich eine bessere Eignung der B5-Nährsalze gegenüber den MS-Salzen. Die höchste Regenerationsrate (18 %) sowie die höchste Anzahl Sprosse pro regenerierendem Explantat (1,4) wurde, wie für die Sorte 'Nachtigall', bei Verwendung der B5-Salze in halber Konzentration erzielt (Tabelle 2-32).

Tabelle 2-32: Sprossgenerationsraten und Anzahl gebildeter Sprosse an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle'

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Gleiche Buchstaben innerhalb einer Spalte zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medienvarianten innerhalb eines Versuchsdurchgangs nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 6$  Wiederholungen

Versuchsdurchgang	Medienvariante	Verfestigungsmittel	Eisenform	Kallusbildungsrate (%)		Sprossgenerationsrate (%)		Sprosszahl/reg. Explantat	
				$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	MS	8 g/l Plant Agar	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	62 <sup>a</sup>	± 11	0 <sup>a</sup>	0	-	-
	1/2 MS	8 g/l Plant Agar	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	87 <sup>b</sup>	± 8	0 <sup>a</sup>	0	-	-
	B5	8 g/l Plant Agar	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	93 <sup>b</sup>	± 5	0 <sup>a</sup>	0	-	-
	1/2 B5	8 g/l Plant Agar	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	100 <sup>b</sup>	0	3 <sup>a</sup>	± 4,1	1,0	0
2	MS	8 g/l Plant Agar	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	37 <sup>a</sup>	± 8	0 <sup>a</sup>	0	-	-
	1/2 MS	8 g/l Plant Agar	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	83 <sup>b</sup>	± 4	3 <sup>a</sup>	± 4,1	1,0	0
	B5	8 g/l Plant Agar	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	93 <sup>bc</sup>	± 5	0 <sup>a</sup>	0	-	-
	1/2 B5	8 g/l Plant Agar	36,7 mg/l Fe-Na-EDTA	100 <sup>c</sup>	0	0 <sup>a</sup>	0	-	-
3	MS	3,8 g/l Gelrite	85,64 mg/l Fe-EDDHA	88 <sup>a</sup>	± 5	8 <sup>a</sup>	± 8,9	1,0	0
	1/2 MS	3,8 g/l Gelrite	85,64 mg/l Fe-EDDHA	97 <sup>ab</sup>	± 4	8 <sup>a</sup>	± 5,2	1,0 <sup>a</sup>	0
	B5	3,8 g/l Gelrite	85,64 mg/l Fe-EDDHA	100 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	± 5,5	1,3 <sup>a</sup>	± 0,3
	1/2 B5	3,8 g/l Gelrite	85,64 mg/l Fe-EDDHA	100 <sup>a</sup>	0	18 <sup>a</sup>	± 7,7	1,4 <sup>a</sup>	± 0,2

Die pH-Werte der Medien aus diesem Versuch entsprachen denen aus dem ersten Versuch mit Blattexplantaten der Sorte 'Nachtigall' (Tabelle 2-33).

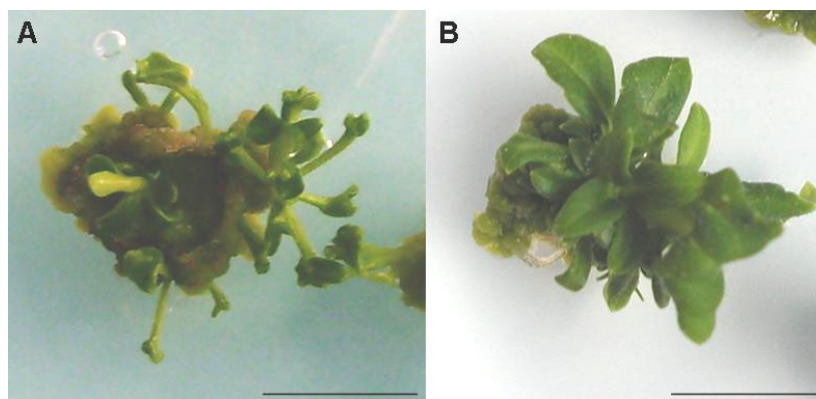
**Tabelle 2-33: pH-Werte der Kulturmedien nach vierwöchiger Kultur von Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle'**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung des zweiten Versuchsdurchgangs, n = 6

Medienvariante	pH-Wert	
	$\bar{x}$	s
MS	5,8	0,3
1/2 MS	6,4	0,3
B5	7,5	0,5
1/2 B5	6,5	0,2

Bei Regenerationsversuchen mit der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' wurde Kallus bei Verwendung aller vier Medienvarianten an nahezu allen Blattexplantaten gebildet (Kallusbildungsraten von 93 bis 100 % nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen). Die Verwendung der B5-Medien führte zu einer deutlich geringen Anzahl verbräunter Explantate, wohingegen die Kultur auf Medien nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) zu starken Verbräunungserscheinungen führte (Abbildung A 9).

In keinem der beiden Versuchsdurchgänge konnte die Regeneration von normalen Sprossen beobachtet werden. Regeneration von verwachsenen, sukkulenten Sprossen bzw. Blättern (Abbildung 2-33) konnte im zweiten Versuchsdurchgang an 10 % der Explantate auf dem Nährmedium nach GAMBORG ET AL. (1968) in halber Nährstoffkonzentration beobachtet werden.

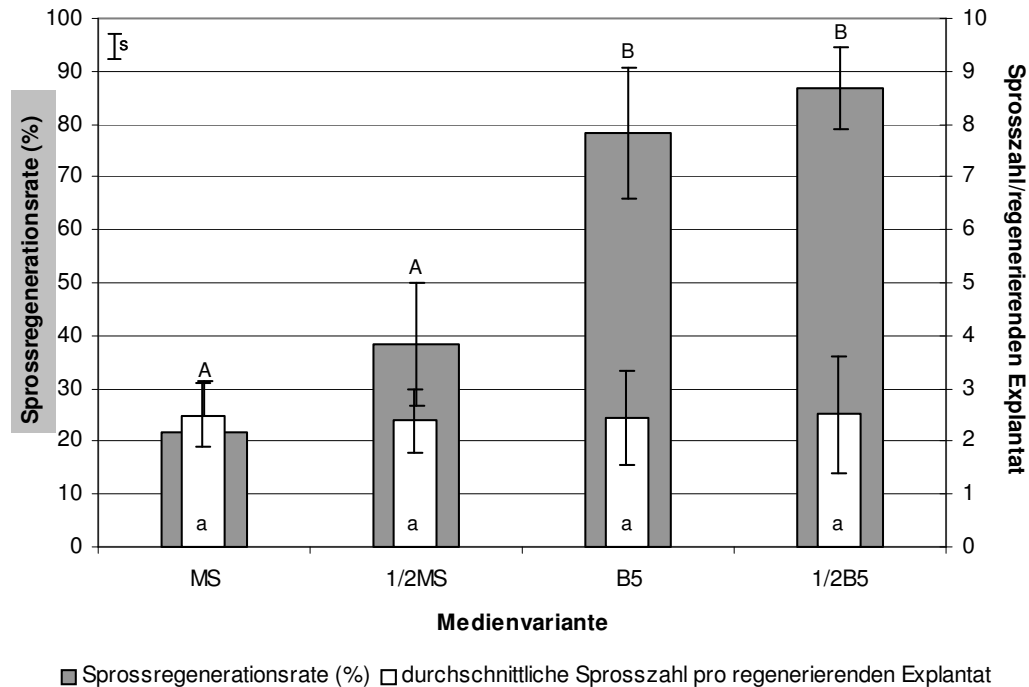


**Abbildung 2-33: Vergleich von sukkulenten Adventivsprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' (A) mit Adventivsprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' mit normalen Wuchs (B)**

Sprosse regeneriert nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen auf 1/2 B5-Medium mit 2 mg/l BAP. (Balken entsprechen 0,5 cm)

In zwei Versuchsdurchgängen wurde die Regeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' getestet. Kallusbildung fand auf allen Medien in beiden Versuchsdurchgängen zu 97 bis 100 % statt. Ausnahme bildeten Explantate, die im ersten Versuchsdurchgang auf MS-Medium in voller Konzentration kultiviert wurden, hier

bildeten 70 % der Explantate Kallus (Tabelle A 14). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorher beschriebenen Sorten 'Adria' und 'Libelle' zeigten Blattexplantate der Sorte 'Blaumeise' deutlich bessere Sprossregenerationseigenschaften (Abbildung 2-34).

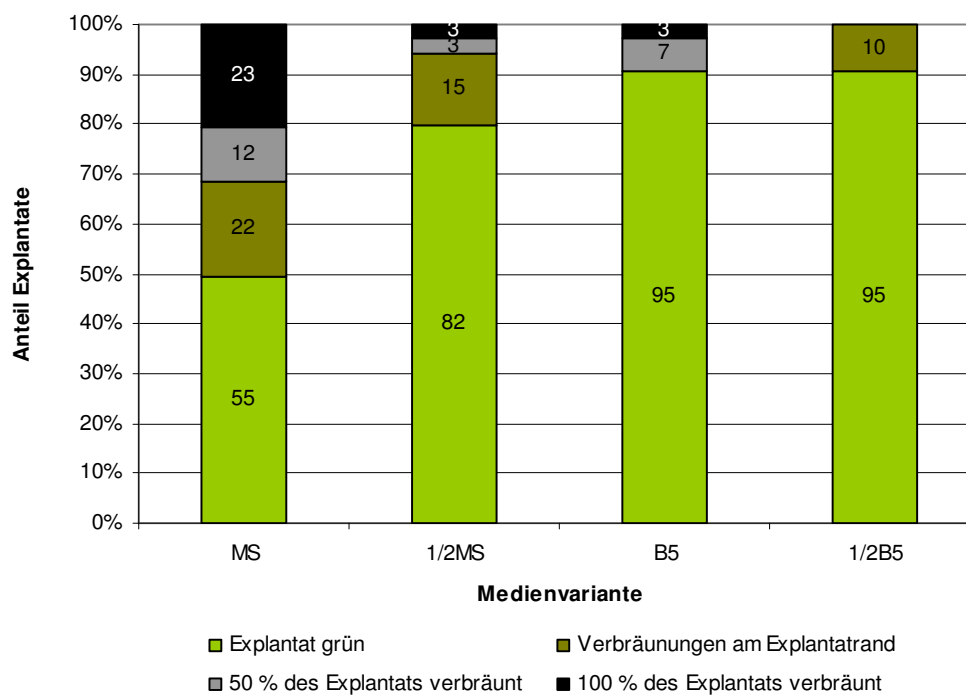


**Abbildung 2-34: Sprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Nährstoffzusammensetzung und -konzentration**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchgängen nach je zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Großbuchstaben dienen dem Vergleich der Regenerationsraten, Kleinbuchstaben ermöglichen den Vergleich der durchschnittlich gebildeten Sprosse pro regenerierendem Explantat. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 12$  Petrischalen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

Während es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der regenerierten Sprosse gab, zeigte sich eine deutlich höhere Regenerationsrate bei Kultur auf Medien nach GAMBORG ET AL. (1968). Bei Verwendung dieser Nährsalze in halber Konzentration bildeten 87 % der kultivierten Blattexplantate Sprosse (Abbildung 2-34).

Bei der Bonitur der Blattexplantate auf Verbräunungserscheinungen konnte beobachtet werden, dass in den Varianten, die die beste Regeneration aufwiesen auch am wenigsten Explantate verbräunt waren (Abbildung 2-35).



**Abbildung 2-35: Grad der Verbräunung der Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit vom verwendeten Grundmedium und dessen Konzentration**

Dargestellt ist das Mittel aus zwei Versuchsdurchgängen nach je zwei vierwöchigen Kulturpassagen, n = 12 Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

Das Medium auf dem die meisten Explantate Sprosse bildeten (1/2 B5-Medium) hatte einen pH-Wert von 7,1. Das in diesem Versuch am schlechtesten geeignete Medium (MS) hatte einen deutlich niedrigeren pH-Wert von 5,4 (Tabelle 2-34).

**Tabelle 2-34: pH-Werte der Kulturmedien nach vierwöchiger Kultur von Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise'**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung des ersten Versuchsdurchgangs. n = 6

Medienvariante	pH-Wert	
	$\bar{x}$	s
MS	5,4	± 0,2
1/2 MS	6,5	± 0,6
B5	8,0	± 0,2
1/2 B5	7,1	± 0,3



### 2.2.3.2 Einfluss von Wachstumsregulatoren auf die Regeneration von Adventivsprossen

In diesen Versuchen kamen Explantate von vier Sorten der Art *H. macrophylla* zur Verwendung. Zusätzlich wurden zwei weitere Arten, *H. arborescens* 'Annabelle' sowie *H. quercifolia* 'Pee Wee' in diese Versuchsreihe aufgenommen.

Aus den Ergebnissen der Versuche zur Identifizierung eines geeigneten Grundmediums wurde 1/2 B5-Medium für alle Sorten als geeignet ausgewählt und in den folgenden Versuchen, sofern nicht anders beschrieben, verwendet. Variiert wurden in dieser Versuchsreihe die Konzentration und die Art des Wachstumsregulators. Falls nicht anders angegeben, wurden dem Medium 36,7 mg/l Fe-Na-EDTA und 8 g/l Plant Agar beige-fügt.

Im ersten Versuch wurden Blattexplantate von *H. macrophylla* 'Nachtigall' auf verschiedene Nährmedien aufgelegt und der Einfluss dreier verschiedener Wachstumsregulatoren in jeweils zwei Konzentrationen auf die Sprossregeneration untersucht (Tabelle 2-14).

Die Zugabe von BAP und TDZ führte unabhängig von der Konzentration zu Kallusbildungsraten zwischen 95 und 100 %. Bei Zugabe von meta-Topolin sank die Kallusbildungsrate von 100 auf 80 % bei Erhöhung der Konzentration von 1 auf 2 mg/l (Tabelle 2-35). Wurzelbildung trat auf allen Medienvarianten in geringem Umfang auf.

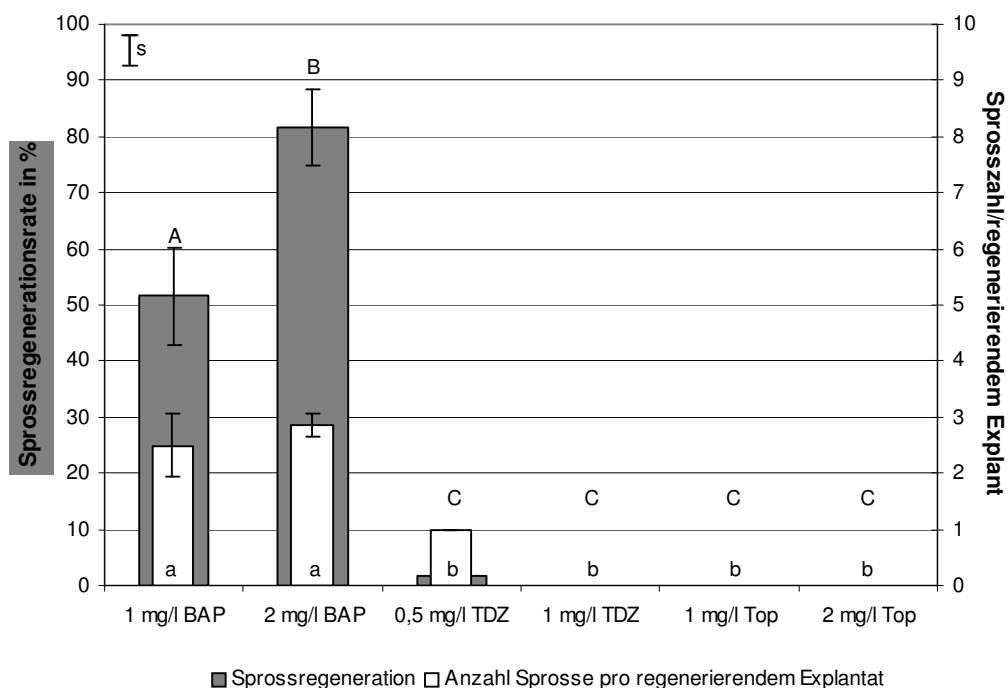
Bei über 80 % der Explantate, die auf TDZ-haltigem Medium kultiviert wurden, zeigten sich im Verlauf der Kultur Verbräunungen. Im Gegensatz dazu war dies bei maximal 34 % der Explantate auf BAP bzw. meta-Topolin-haltigen Medien der Fall (Abbildung A 10).

**Tabelle 2-35: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator und dessen Konzentration**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 12$  Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

Cytokininart und -konzentration	Kallusbildungsrate (%)	
	$\bar{x}$	s
1 mg/l BAP	98 <sup>a</sup>	± 3
2 mg/l BAP	100 <sup>a</sup>	0
0,5 mg/l TDZ	95 <sup>ab</sup>	± 6
1 mg/l TDZ	97 <sup>a</sup>	0
1 mg/l meta-Topolin	100 <sup>a</sup>	± 4
2 mg/l meta-Topolin	80 <sup>b</sup>	± 13

Sprosse regenerierten besser auf Medien mit 2 mg/l BAP (Regenerationsrate 82 %) als auf Medien mit 1 mg/l BAP (52 %) (Abbildung 2-36). Beide Konzentrationsvarianten resultierten in einer ähnlich hohen Anzahl Sprosse pro Explantat (2,5 bei Zugabe von 1 mg/l BAP bzw. 2,9 bei Zugabe von 2 mg/l BAP). Die Regenerationsrate auf Medium mit 0,5 mg/l TDZ war vernachlässigbar gering. Die Zugabe von meta-Topolin war in keiner der verwendeten Konzentrationen (0,5 und 1 mg/l) erfolgreich (Abbildung 2-36).



**Abbildung 2-36: Sprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator und dessen Konzentration**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchsdurchgängen nach je zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Großbuchstaben dienen dem Vergleich der Regenerationsraten, Kleinbuchstaben ermöglichen den Vergleich der durchschnittlich gebildeten Sprosse pro regenerierendem Explantat. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 12$  Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

Bei Messungen der pH-Werte in den Kulturmedien wurden Unterschiede zwischen den Medien beobachtet. Der niedrigste pH-Wert (4,9) wurde bei Medien mit 0,5 mg/l TDZ und der höchste pH-Wert (6,2) bei Verwendung von 2 mg/l BAP festgestellt. Bei Verwendung von meta-Topolin wurde in den Medien beider Konzentrationsstufen ein pH-Wert von 5,0 gemessen (Tabelle 2-36).

**Tabelle 2-36: pH-Werte der Kulturmedien nach vierwöchiger Kultur von Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall'**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuchsdurchgang, n = 6 Wiederholungen

Cytokininart und - konzentration	pH-Wert	
	$\bar{x}$	s
1 mg/l BAP	5,5	± 0,4
2 mg/l BAP	6,2	± 0,1
0,5 mg/l TDZ	4,9	± 0,1
1 mg/l TDZ	5,3	± 0,1
1 mg/l meta-Topolin	5,0	± 0,1
2 mg/l meta-Topolin	5,0	± 0,2

Im zweiten Versuch wurden Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' auf den gleichen Medien wie in dem vorhergehenden Versuch mit 'Nachtigall' kultiviert.

Im ersten Durchgang lag auf allen Medienvarianten eine Kallusbildungsrate von 87 bis 100 % vor. Im zweiten Versuchsdurchgang wurden ähnlich hohe Raten beobachtet (83 bis 100 %). Ausnahmen stellten die Explantate auf Medium mit 2 mg/l meta-Topolin dar. Während im ersten Versuchsdurchgang Kallus an 87 % der Explantate gebildet wurde, war im zweiten Durchgang Kallusbildung nur noch an der Hälfte der Explantate sichtbar (Tabelle A 15).

Bezüglich der Verbräunung der Blattexplantate konnte kein Unterschied zwischen den Medien beobachtet werden. In beiden Versuchsdurchgängen wurden Verbräunungen nur an einem geringen Anteil der Explantate beobachtet. Im Mittel blieben 82 bis 95 % nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen grün (Abbildung A 11). Wurzeln wurden an einigen wenigen Explantaten auf allen Nährmedien mit Ausnahme des Mediums mit 1 mg/l BAP gebildet.

Die Regenerationsraten und die Sprosszahlen sind in Tabelle 2-37 dargestellt. Im ersten Versuchsdurchgang konnten mit 2,4 bzw. 2,5 Sprossen je Explantat bei Kultur auf BAP-haltigen Medien die meisten Sprosse regeneriert werden. Bezüglich der Anzahl der Explantate, die Sprosse regenerierten, konnte eine signifikant bessere Regenerationsrate bei Verwendung von 2 mg/l BAP beobachtet werden. Regeneration fand außerdem auf den Kulturmedien mit 2 mg/l meta-Topolin, jedoch nur in geringem Umfang, statt.

Im zweiten Versuchsdurchgang wurden deutlich andere Ergebnisse erzielt. Hier führte nur die Kultur auf Medium mit 2 mg/l BAP zur Entwicklung von Adventivsprossen (Sprossregenerationsrate 10 %) (Tabelle 2-37).

**Tabelle 2-37: Sprossregenerationsraten und Anzahl gebildeter Sprosse an Blattexplantaten von *H. macrophylla* 'Libelle' auf Nährmedien mit unterschiedlichen Cytokiningaben Konzentration**

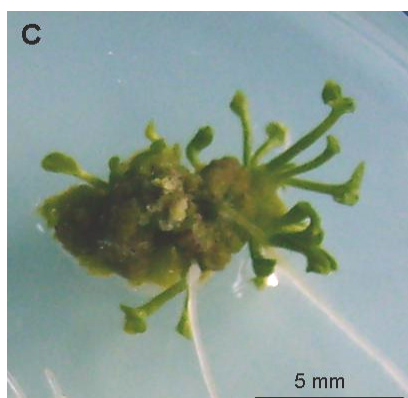
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Cytokininart und -konzentration	Versuchsdurchgang 1				Versuchsdurchgang 2			
	Sprossregenerationsrate (%)		Sprosszahl/reg. Explantat		Sprossregenerationsrate (%)		Sprosszahl/reg. Explantat	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1 mg/l BAP	13 <sup>a</sup>	± 5,2	2,5 <sup>a</sup>	± 0,5	0	0	-	-
2 mg/l BAP	32 <sup>b</sup>	± 6,6	2,4 <sup>a</sup>	± 0,4	10	± 8,4	2,0	0
0,5 mg/l TDZ	0 <sup>a</sup>	0	-	-	0	0	-	-
1 mg/l TDZ	0 <sup>a</sup>	0	-	-	0	0	-	-
1 mg/l meta-Topolin	0 <sup>a</sup>	0,0	-	-	0	0	-	-
2 mg/l meta-Topolin	7 <sup>a</sup>	± 5,2	1,5 <sup>a</sup>	± 0,4	0	0	-	-

Aufgrund der geringen Regenerationserfolge in dem Versuch mit der Sorte 'Libelle' wurde im dritten Versuch Zeatin als ein weiteres Cytokinin in den Konzentrationen 1 und 2 mg/l getestet. TDZ kam in den Konzentrationen von 1 und 1,5 mg/l zur Anwendung. Die Konzentration von BAP blieb unverändert bei 1 und 2 mg/l.

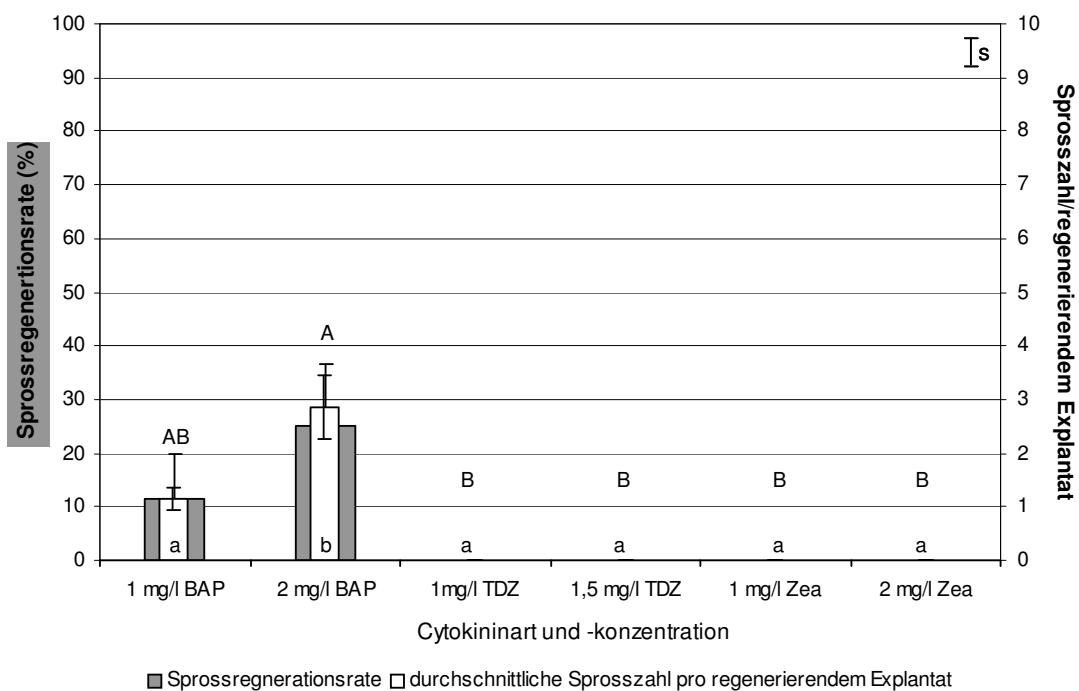
In beiden Versuchsdurchgängen wurde unabhängig vom Nährmedium grüner, kugelförmiger Kallus gebildet. Ein Einfluss der Medienvarianten auf die Explantatverbräunung wurde nicht beobachtet (Abbildung A 12). Wurzelbildung fand auf allen Medien in geringem Umfang statt.

Sprosse wurden nur auf den Medien mit BAP-Zugabe gebildet. Am förderlichsten für die Regeneration von Sprossen war die Konzentration von 2 mg/l BAP (Abbildung 2-38). Die regenerierten Sprosse waren jedoch zum größten Teil von anormalem Wuchs, mit stark verdickten wulstigen Stielen und Blättern (Abbildung 2-37).



**Abbildung 2-37: Adventivsprosse mit sukkulentem Wuchs an Blattexplantat von *H. macrophylla* 'Libelle'**

Sprosse regeneriert nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen auf 1/2 B5-Medium mit 2 mg/l BAP.



**Abbildung 2-38: Sprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Cytokininart und -konzentration**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen. Großbuchstaben dienen dem Vergleich der Regenerationsraten, Kleinbuchstaben dienen dem Vergleich der Sprosszahl pro regenerierendem Explantat. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 12$  Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

In Versuch 4 wurden neben BAP zwei weitere noch nicht getestete Cytokinine, Kinetin und 2iP in einer Konzentration von 1 mg/l, verwendet. Da bei Verwendung von 1 und 2 mg/l BAP vermehrt deformierte Sprosse aufgetreten waren, wurde hier die Konzentration auf 0,5 mg/l reduziert. Zusätzlich kam eine Kombination aller drei Cytokinine zur Anwendung. Außerdem wurde statt Fe-Na-EDTA Fe-EDDHA verwendet.

Auf allen vier Medien wurde Kallusbildung beobachtet, wobei die Verwendung von Kinetin zu der geringsten Rate von 81 % führte. Demgegenüber wurden auf den anderen Medien 93 bis 97 % Explantate mit Kallus verzeichnet (Tabelle A 16). Ähnliche Ergebnisse zeigte die Bonitur der Verbräunung der Blattexplantate. Während nach Zugabe von Kinetin ins Medium nur noch 16 % der Explantate nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen grün waren, zeigten 64 bzw. 83 % der Explantate auf den anderen Medienvarianten keine Verbräunungserscheinungen (Abbildung A 13). In allen Varianten bildete eine Vielzahl der Explantate Wurzeln (Abbildung 2-39).

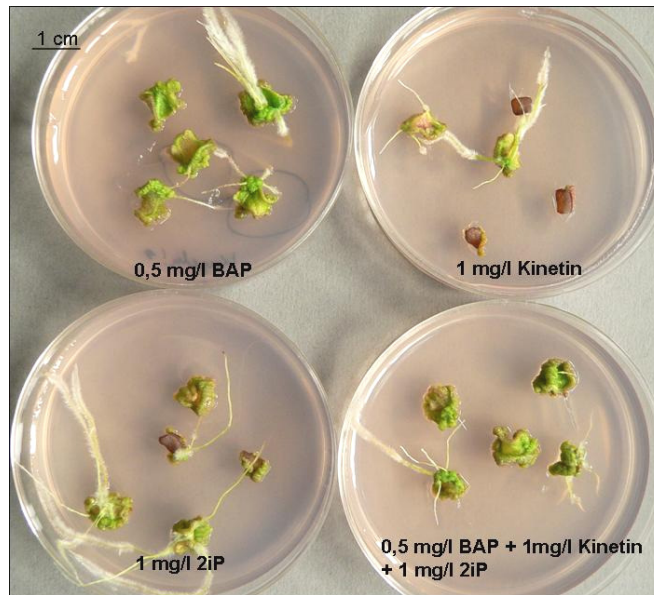


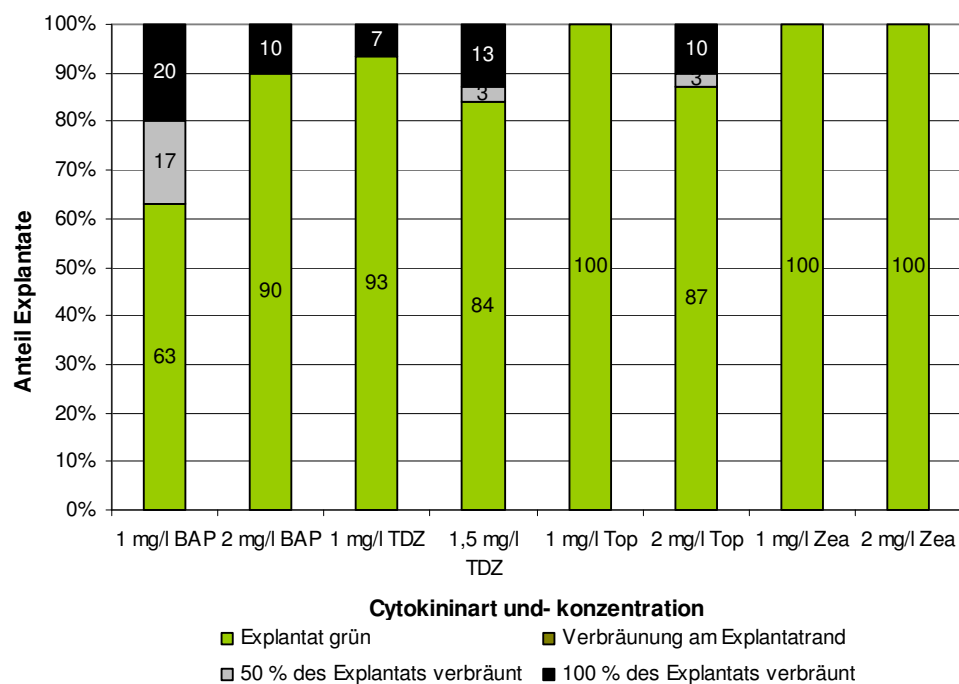
Abbildung 2-39: Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' mit Wurzelregeneration (Versuch Reg 4)

Regeneriert nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen auf Nährmedien mit unterschiedlichen Wachstumsregulatoren.

Die Regeneration von Sprossen konnte weder durch Verwendung eines der verwendeten Cytokinine allein noch durch die Kombination aller drei Wachstumsregulatoren erzielt werden.

Vier verschiedene Cytokinine in jeweils zwei Konzentrationen wurden im fünften Versuch mit Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' verwendet (Tabelle 2-14). Als Eisenform dienten 85,64 mg/l Fe-EDDHA. Verfestigt wurden die Medien mit Plant Agar (8 g/l).

Kallus bildeten 90 % der Explantate auf Medium mit 1 mg/l Zeatin und jeweils 100 % der Explantate auf den anderen Medienvarianten. Die stärkste Verbräunung zeigten Explantate auf 1 mg/l BAP, in den übrigen Varianten waren nach insgesamt acht Wochen Kultur noch 84 bis 100 % ohne Verbräunungen (Abbildung 2-40). Durch keines der verwendeten Cytokinine konnten Sprosse an Blattexplantaten der Sorte 'Adria' induziert werden.



**Abbildung 2-40: Grad der Verbräunung der Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit vom Wachstumsregulator und dessen Konzentration (Versuch 5)**

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. n = 6 Wiederholungen

Da in den Versuchen der anderen *Hydrangea*-Sorten auf Kulturmedien mit einer Zugabe von 2 mg/l BAP fast immer Sprossregeneration induziert werden konnte, wurde diese Variante im sechsten Versuch noch einmal an Blattexplantaten der Sorte 'Adria' getestet. In weiteren Varianten wurden dem Medium außer einem Cytokinin und einem Auxin noch 2 mg/l GA<sub>3</sub> bzw. 8,586 mg/l PCIB (Antiauxin) bzw. 0,5 mg/l Flurprimidol zugefügt.

Beginnende Kallusbildung konnte bereits nach vier Wochen auf allen Medien beobachtet werden. Nach der zweiten Kulturperiode von vier Wochen zeigten alle Explantate auf Medium mit GA<sub>3</sub> bräunlichen bis schwarzen Kallus. Auf dem mit Flurprimidol angereicherten Medium bzw. auf dem Medium ohne weiteren Zusatz hatten 38 bzw. 40 % der Explantate braunen Kallus gebildet, die übrigen Explantate grünen kugelförmigen Kallus. Allein die Verwendung von PCIB-haltigem Medium führte zur Bildung von grünem kugelförmigem Kallus an allen Explantaten. Alle Explantate auf GA<sub>3</sub>-haltigem Medium waren zu 100 % verbräunt. Ebenso waren 50 % der Explantate auf dem Medium mit BAP allein am Ende der Kultur komplett verbräunt. Die Kultur auf Medien mit Flurprimidol bzw. PCIB führte zu einer weniger stark ausgeprägten Verbräunung der Explantate. Am Ende der Kultur waren noch 77 (auf Medium mit Flurprimidol) bzw. 90 % (auf Medium mit PCIB) der Explantate ohne Verbräunung (Abbildung 2-41). Keine der Medienvarianten führte zu einer Adventivsprossbildung.

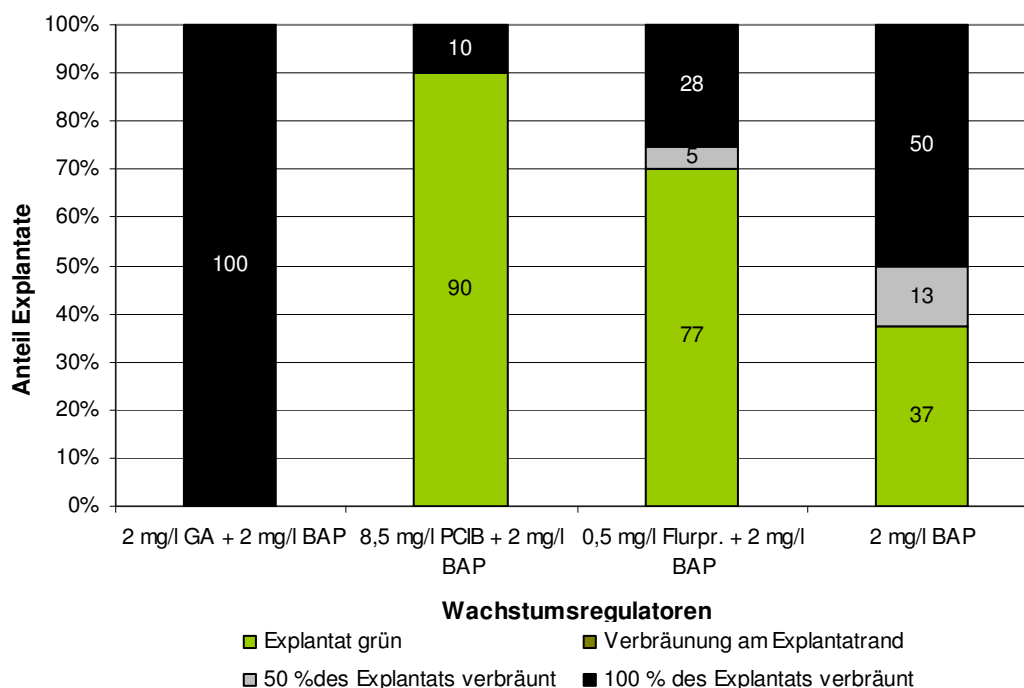


Abbildung 2-41: Grad der Verbräunung der Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von den Wachstumsregulatoren (Versuch Reg 6)

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. n = 8 Wiederholungen

Zur Adventivsprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blau-meise' wurden drei Cytokinine in zwei Kombinationen getestet. Zur Anwendung kamen BAP (1 und 2 mg/l), TDZ (0,5 und 1 mg/l) sowie meta-Topolin (1 und 2 mg/l). Als Eisenform diente Fe-Na-EDTA und verfestigt wurde das Medium mit 8 g/l Plant Agar. Im ersten Versuchsdurchgang erfolgte die Bildung von grünem kugelförmigem Kallus unabhängig von der Cytokininart oder -konzentration zu 100 %. Im zweiten Versuchsdurchgang bildeten 100 % der auf BAP bzw. TDZ kultivierten Explantate Kallus. Wohingegen keines der Blattexplantate auf den mit meta-Topolin angereicherten Medien Kallus bildete (Abbildung 2-42).

Die Kultur auf BAP-haltigen Medien hat zu einer geringeren Anzahl Explantate mit Verbräunungserscheinungen geführt, als die Kultur auf Medien mit den beiden anderen Cytokinin. Die Zugabe von meta-Topolin führte dazu dass, in beiden Konzentrationen ca. die Hälfte aller Explantate komplett verbräunten. Wurzelbildung wurde nur im ersten Versuchsdurchgang und ausschließlich auf TDZ-haltigen Medien beobachtet.



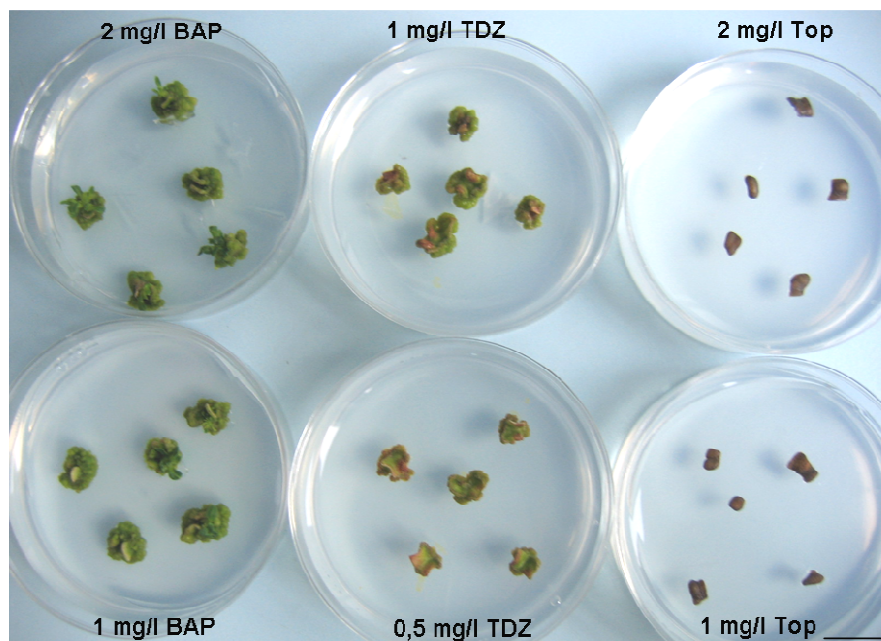


Abbildung 2-42: Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen auf Nährmedien mit unterschiedlichen Cytokiningaben (Versuch Reg 7, Versuchsdurchgang 2)  
Balken entspricht 1 cm

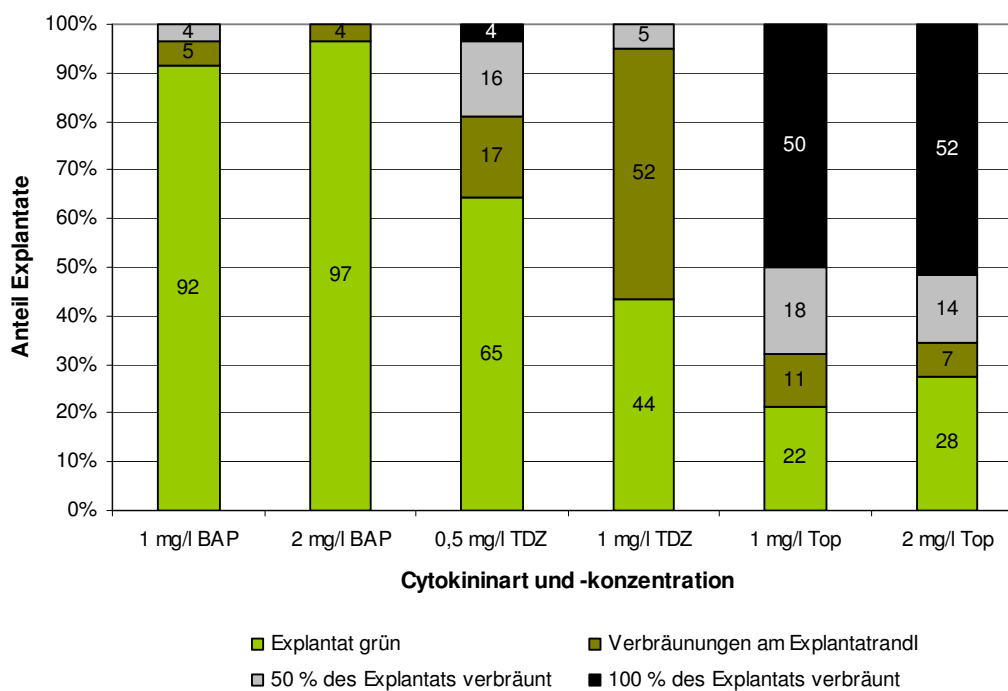
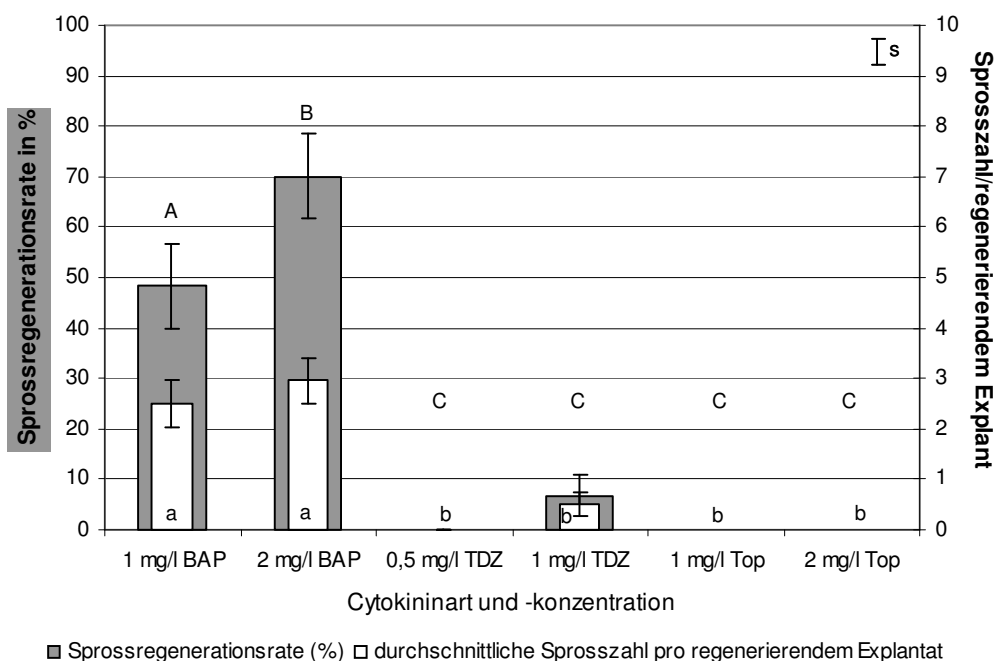


Abbildung 2-43: Grad der Verbräunung der Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit vom verwendeten Cytokinin und dessen Konzentration (Versuch Reg 7)

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen. n = 12 (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

Abbildung 2-44 zeigt den Erfolg der Sprossregeneration gemittelt über zwei Versuchsdurchgänge. Nur die Gabe von BAP führte zu einer zufrieden stellenden Regeneration von Adventivsprossen. Es zeigte sich, dass die höhere BAP Konzentration von 2 mg/l

gegenüber der niedrigeren Konzentration von 1 mg/l zu einer höheren Anzahl Explantate mit Sprossbildung führte. Die Anzahl der durchschnittlich gebildeten Sprosse an diesen Explantaten erhöhte sich jedoch kaum. Durch die Zugabe der anderen Wachstumsregulatoren konnte keine bzw. nur eine sehr geringe Sprossregeneration induziert werden (Abbildung 2-44).



**Abbildung 2-44: Sprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Cytokininart und -konzentration (Versuch Reg 7)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen. Großbuchstaben dienen dem Vergleich der Regenerationsraten, Kleinbuchstaben dienen dem Vergleich der Sprosszahl pro regenerierendem Explantat. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 12$  Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

Der pH-Wert (Tabelle 2-38) der Medien mit BAP bzw. TDZ unterschied sich kaum und betrug im Mittel zwischen 5,7 und 6,2. Bei Verwendung von meta-Topolin zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Versuchsdurchgängen. Während im ersten Durchgang pH-Werte von 5,6 und 6,4 gemessen wurden, waren die pH-Werte der Medien aus dem zweiten Durchgang deutlich niedriger (4,4 bzw. 4,3).

**Tabelle 2-38: pH-Werte der Kulturmedien nach vierwöchiger Kultur von Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise'**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. n = 6 Wiederholungen

Cytokininart und -konzentration	1. Versuchsdurchgang		2. Versuchsdurchgang		Mittel aus beiden Versuchsdurchgängen	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1 mg/l BAP	6,2	0,2	6,2	0,4	6,2	0,3
2 mg/l BAP	5,9	0,4	5,5	0,1	5,7	0,3
0,5 mg/l TDZ	6,0	0,3	5,5	0,1	5,8	0,2
1 mg/l TDZ	6,3	0,1	5,7	0,2	6,0	0,2
1 mg/l meta-Topolin	5,6	0,2	4,4	0,1	5,0	0,1
2 mg/l meta-Topolin	6,4	0,2	4,3	0,1	5,4	0,1

In dem Versuch mit der Art *H. arborescens* 'Annabelle' wurden sowohl Blatt- als auch Stängel explantate zur Regeneration von Adventivsprossen herangezogen. Da in den Versuchen mit den Sorten von *H. macrophylla* gute Ergebnisse mit der Nährstoffzusammensetzung nach GAMBORG ET AL. (1968) erzielt wurden (Vgl. Kap. 2.2.3.1), wurde 1/2 B5-Medium (Tabelle 2-3) als Kulturmedium gewählt. Diesem wurden 85,64 mg/l Fe-EDDHA beigelegt und es wurde mit 3,8 g/l Gelrite verfestigt. Untersucht wurde der Einfluss dreier verschiedener Cytokinine in jeweils zwei Konzentrationen. Zur Anwendung kamen BAP (1 und 2 mg/l), TDZ (1 und 1,5 mg/l) sowie meta-Topolin (1 und 2 mg/l).

Die Kallusbildungsraten der Explantate auf den einzelnen Medien sind in Tabelle 2-39 dargestellt. Die Struktur und Form des Kallus war auf allen Medien und unabhängig von der Explantatart grün bis gelblich und kugelförmig. Nach der ersten Kulturpassage von vier Wochen hatten bereits 90 bis 100 % der Explantate auf den TDZ-haltigen Medien Kallus gebildet. Nach der zweiten Kulturpassage waren es 100 %. Bei Kultur auf den mit BAP bzw. meta-Topolin angereicherten Medien zeigten weniger Stängel explantate Kallus als Blatt explantate.

**Tabelle 2-39: Kallusbildung an Blatt- und Stängel explantaten von *H. arborescens* 'Annabelle' in Abhängigkeit vom verwendeten Cytokinin und dessen Konzentration (Versuch Reg 8)**

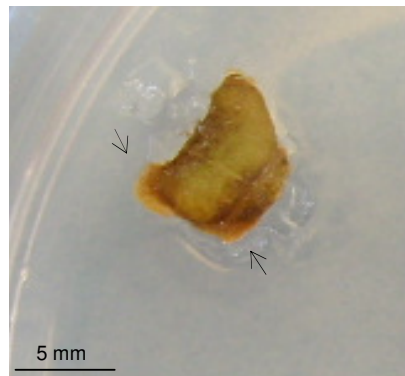
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen mit Blattexplantaten bzw.  $n = 4$  Wiederholungen mit Stängel explantaten

Cytokininart und - konzentration	Kallusbildungsraten (%)			
	an Blattexplantaten		an Stängel explantaten	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1 mg/l BAP	93 <sup>a</sup>	± 5	80 <sup>ab</sup>	± 8
2 mg/l BAP	83 <sup>a</sup>	± 10	80 <sup>ab</sup>	0
1 mg/l TDZ	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0
1,5 mg/l TDZ	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0
1 mg/l meta-Topolin	93 <sup>a</sup>	± 8	60 <sup>b</sup>	± 8
2 mg/l meta-Topolin	97 <sup>a</sup>	± 4	75 <sup>ab</sup>	± 13

Im Verlauf der Kultur wurde eine vermehrte Bildung von Wurzeln an Stängel explantaten beobachtet. Ausnahme sind die Stängel explantate auf Medien mit meta-Topolin, an diesen bildeten sich keine Wurzeln. Im Gegensatz zu den Stängel explantaten bildete nur ein sehr geringer Anteil Blatt explantate Wurzeln (Tabelle A 17). Verbräunungen der Explantate wurden nicht beobachtet. Eine Regeneration von Adventivsprossen konnte auf keinem der Medien realisiert werden.

Da es zu keiner Regeneration von Adventivsprossen auf den bisher verwendeten Nährmedien kam, wurde im folgenden Versuch 9 in Anlehnung an LEDBETTER UND PREECE (2004) und deren Versuche mit Blatt explantaten von *H. quercifolia* MS-Medium (Nährsalze und Vitamine) mit 30 g/l Saccharose sowie 0,2 mg/l IBA und TDZ in Konzentrationen von 0,1 und 1 mg/l verwendet. Aufgrund der vorhergehenden Untersuchungen mit Sorten von *H. macrophylla* kam BAP nochmals in der Konzentration von 2 mg/l zur Anwendung. Zusätzlich wurde 2 mg/l 2iP getestet.

Kallus wurde unabhängig vom Medium in sehr geringem Umfang gebildet (Abbildung 2-45). Wurzeln wurden an keinem der Explantate gebildet. Die Verbräunung der Blatt explantate ist in Abbildung A 14 dargestellt. Nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen der Blatt explantate von *H. arborescens* 'Annabelle' waren auf dem Medium mit 0,1 mg/l TDZ noch 87 % der Explantate ohne Verbräunungen. Hingegen führte die Zugabe von 1 mg/l TDZ in das Medium zu der geringsten Anzahl noch grüner Explantate (57 %). Geringfügig höher war die Anzahl unverbräunter Explantate auf den beiden anderen Medien. Auch bei der Endbonitur dieses Versuches nach acht Wochen konnte keine Sprossregeneration beobachtet werden.



**Abbildung 2-45: Blattexplantat von *H. arborescens* 'Annabelle' auf Sprossregenerationsmedium mit 2 mg/l 2iP nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen (Versuch Reg 9)**

Pfeile verweisen auf Kallus, der nur in geringem Umfang gebildet wurde.

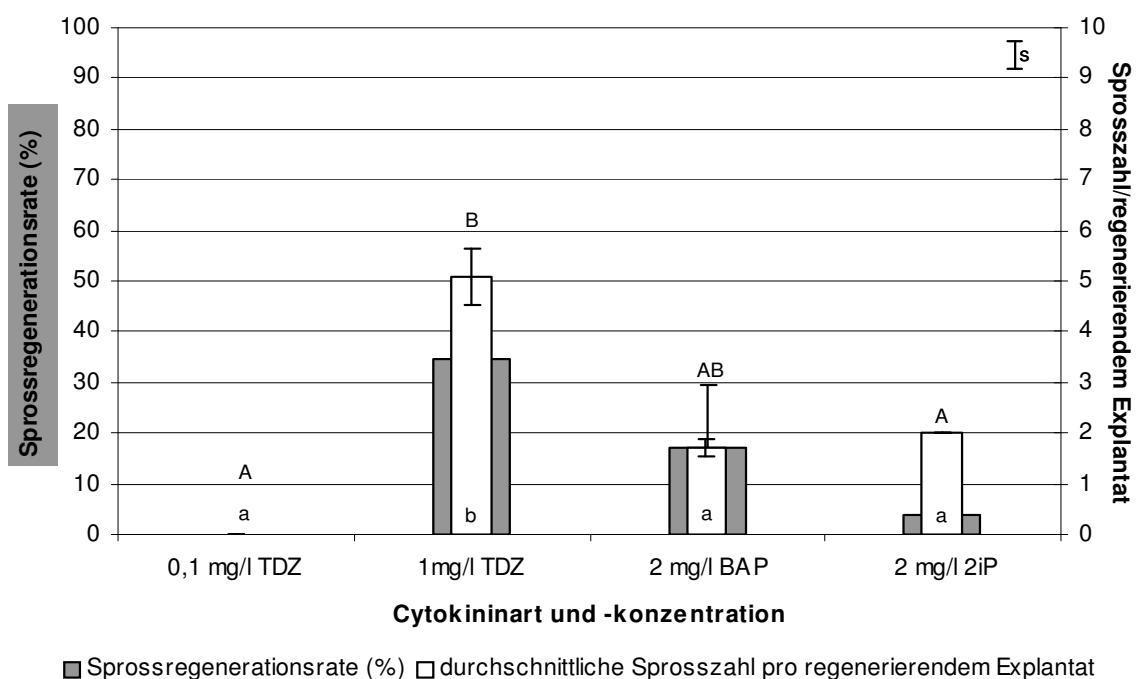
Als weitere *Hydrangea*-Art in diesen Untersuchungen diente *H. quercifolia* 'Pee Wee', von der Blattexplantate zur Induktion von Adventivsprossen auf vier verschiedenen Nährmedien kultiviert wurden (Versuch 10). Als Nährmedium fanden die in Anlehnung an LEDBETTER UND PREECE (2004) bereits bei der Art *H. arborescens* 'Annabelle' untersuchten Nährmedien Verwendung.

Grüner kugelförmiger Kallus wurde in allen Varianten gebildet (Tabelle 2-40). Die höchste Kallusbildungsrate (73 %) wurde bei Kultur auf 1 mg/l TDZ beobachtet, die niedrigste Rate (30 %) bei Kultur auf 0,1 mg/l TDZ. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Explantaten von *H. arborescens* 'Annabelle' konnten an Blattexplantaten von *H. quercifolia* 'Pee Wee' Sprosse durch die Zugabe von jedem der drei getesteten Wachstumsregulatoren induziert werden. Eine Zugabe von 1 mg/l TDZ resultierte sowohl in der höchsten Sprossregenerationsrate als auch in der höchsten Anzahl gebildeter Sprosse pro regenerierendem Explantat. Eine reduzierte TDZ Gabe von 0,1 mg/l führte zu keiner Sprossbildung (Abbildung 2-46). In dieser Variante waren mit 78 % die meisten Explantate komplett verbräunt. In den Varianten mit erfolgreicher Sprossregeneration war diese Anzahl deutlich geringer (zwischen 34 und 55 %) (Abbildung A 15).

**Tabelle 2-40: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. quercifolia* 'Pee Wee' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Reg 10)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 14$  Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 7 Petrischalen)

Cytokininart und -konzentration	Kallusbildungsraten (%)	
	$\bar{x}$	s
0,1 mg/l TDZ	30 <sup>a</sup>	± 8
1mg/l TDZ	73 <sup>b</sup>	± 12
2 mg/l BAP	63 <sup>ab</sup>	± 9
2 mg/l 2iP	42 <sup>ab</sup>	± 7



**Abbildung 2-46: Sprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *Hydrangea quercifolia* 'Pee Wee' in Abhängigkeit von der Cytokininart und -konzentration**

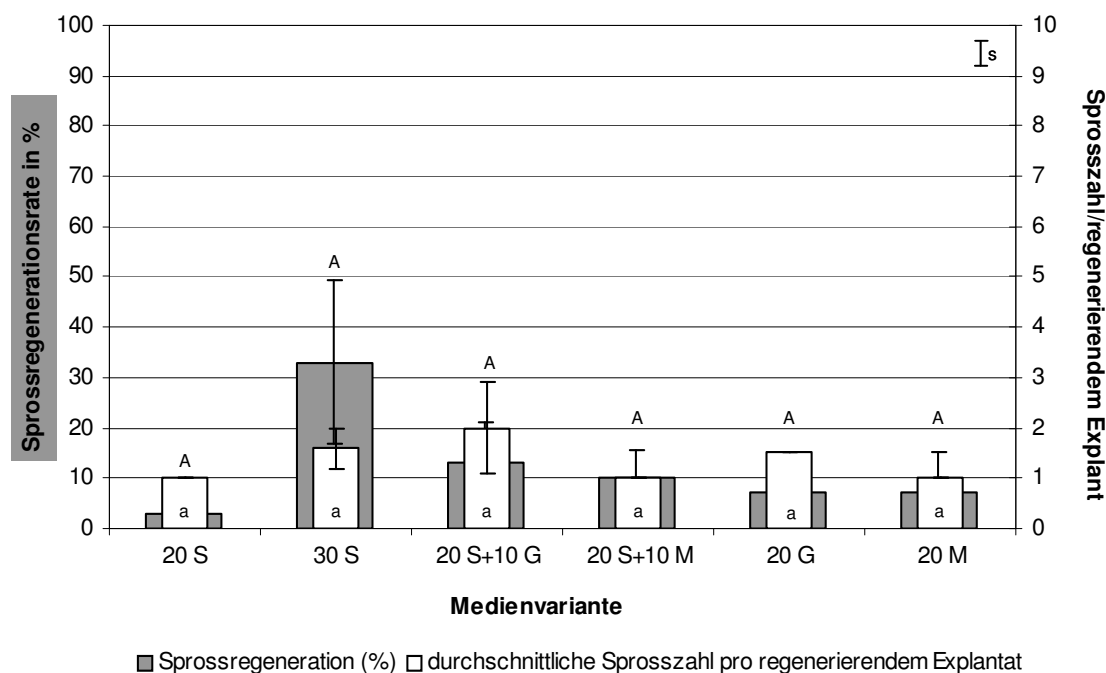
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen. Großbuchstaben dienen dem Vergleich der Regenerationsraten, Kleinbuchstaben dienen dem Vergleich der Sprosszahl pro regenerierendem Explantat. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten nach paarweisen t-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 14$  Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 7 Petrischalen)

### 2.2.3.3 Einfluss der Kohlenhydratquelle auf die Regeneration von Adventivsprossen

Der Einfluss der Zuckerart bzw. der Einfluss einer Kombination verschiedener Zucker auf die Sprossregeneration wurde an einer gut ('Blaumeise') und einer schlecht ('Libelle') regenerierenden Sorte von *H. macrophylla* sowie an der Art *H. arborescens* 'Annabelle', die bisher keine Sprossregeneration zeigte, untersucht. Zur Verfestigung wurden dem Medium 8 g/l Plant Agar zugefügt. Außerdem enthielt das Nährmedium 34,51 mg/l Fe-Na-EDTA sowie 2 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA.

Die Ergebnisse aus zwei Versuchsdurchgängen des ersten Versuchs mit Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' waren ähnlich und ließen eine gemeinsame statistische Verrechnung zu. Die Kallusbildungsrate war auf allen Medien sehr hoch (97 bis 100 %). Am Ende des Versuches wies keines der Explantate Verbräunungen auf. Unabhängig vom Nährmedium wurden an einigen Explantaten Wurzeln gebildet.

Die Ergebnisse bezüglich der Sprossregeneration sind in Abbildung 2-47 dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Medien festgestellt werden. Der größte Anteil der Explantate (33 %) bildete Sprosse auf Medium, dem 30 g/l Saccharose beigefügt wurde. Eine Reduzierung des Saccharosegehaltes im Medium um 10 g/l führte zu der niedrigsten beobachteten Regenerationsrate (3 %) sowie zu der niedrigsten Anzahl neu gebildeter Sprosse (1). Die ebenfalls sehr geringe Sprossregenerationsrate sowie die geringe Anzahl regenerierter Sprosse bei Verwendung von 20 g/l Glukose bzw. 20 g/l Maltose konnte durch Kombination der eben genannten Zucker mit 20 g/l Saccharose in beiden Fällen leicht gesteigert werden (Abbildung 2-47).



**Abbildung 2-47: Sprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle (Versuch Reg 11)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen. Großbuchstaben dienen dem Vergleich der Regenerationsraten, Kleinbuchstaben dienen dem Vergleich der Sprosszahl pro regenerierendem Explantat. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 12$  Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

20 S - 20 g/l Saccharose  
 30 S - 30 g/l Saccharose,  
 20 S+10 G - 20 g/l Saccharose + 10 g/l Glukose  
 20 S+10 M - 20 g/l Saccharose + 10 g/l Maltose  
 20 G - 20 g/l Glukose  
 20 M - 20 g/l Maltose

In drei Versuchsdurchgängen des zweiten Versuchs wurde die Adventivsprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' auf Medien mit unterschiedlichen Zuckern und Zuckerkombinationen getestet. Im ersten und zweiten Versuchsdurchgang wurden Plant Agar (8 g/l) und Fe-Na-EDTA (34,51 mg/l) dem Medium zugefügt. Im dritten Versuchsdurchgang kamen Gelrite (3,8 g/l) sowie Fe-EDDHA (85,64 mg/l) zur Anwendung. In allen drei Versuchsdurchgängen wurden 2 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA verwendet.

Auf allen Medien in allen Versuchsdurchgängen hatten bereits nach der ersten Kulturpassage von vier Wochen 94 bis 100 % der Explantate grünen kugelförmigen Kallus gebildet. Nach der zweiten Kulturpassage waren es 100 %. Verbräunungen an den Explantaten traten nur im zweiten Versuchsdurchgang und nur am Explantatrand auf (Abbildung A 16).

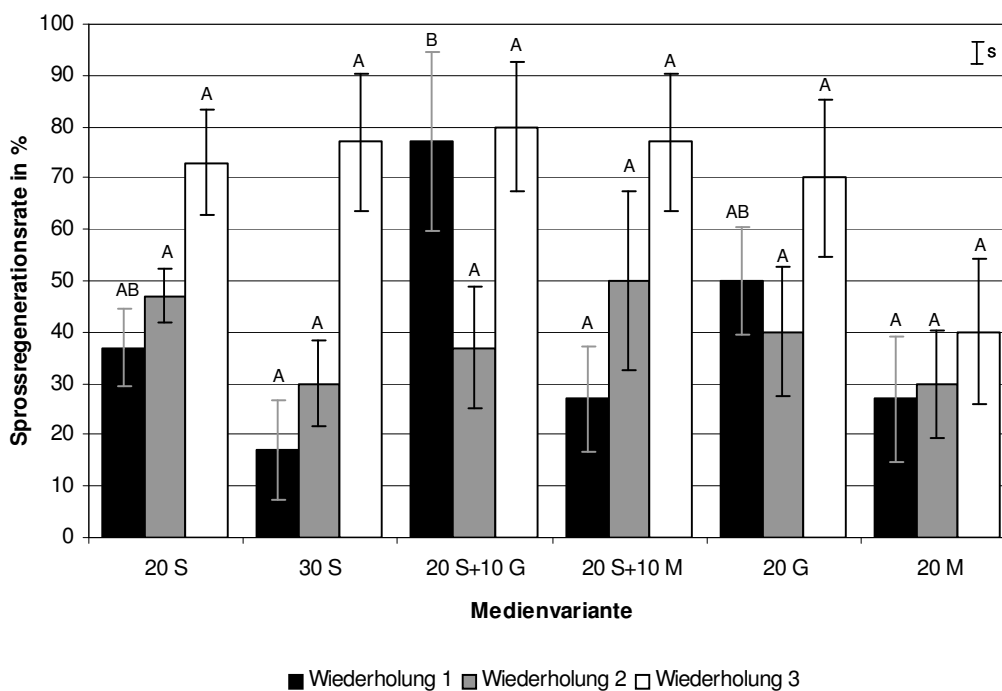


Die Sprossregenerationsraten der einzelnen Versuchsdurchgänge sind in Abbildung 2-48 dargestellt.

Im ersten Versuchsdurchgang konnten signifikante Unterschiede der Medien bezüglich des Erfolges der Sprossregeneration beobachtet werden. Der größte Anteil Explantate (70 %) regenerierte Sprosse auf dem Medium, das eine Kombination von 20 g/l Saccharose und 10 g/l Glukose enthielt. Die Kultur der Explantate auf Kulturmedium, das nur Glukose (20 g/l) bzw. nur Saccharose (20 g/l) enthielt, führte zu Regenerationsraten von 50 bzw. 37 %. Die schlechteste Regeneration erfolgte auf Medien, die Maltose enthielten (beide 27 %), bzw. auf Medium mit einer Saccharosekonzentration von 30 g/l (17 %).

Im zweiten Versuchsdurchgang konnten keine signifikanten Unterschiede der Medien bezüglich der Regenerationsrate festgestellt werden. Die erzielten Raten lagen auf allen Medien zwischen 30 und 50 %.

Auch im dritten Versuchsdurchgang konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Am erfolgreichsten war, wie im ersten Versuchsdurchgang, die Kultur auf Medium mit 20 g/l Saccharose und 10 g/l Glukose (80 %). Eine Zugabe von 20 g/l Maltose ins Medium hatte die wenigsten Regenerationsereignisse zur Folge (40 %). Die Kultur auf allen anderen Medien führte zu Sprossbildung an 70 bis 77 % der Blattexplantate. Durch Verwendung von Gelrite und Fe-EDDHA im dritten Versuchsdurchgang konnte somit auf allen Medien eine Steigerung der Regenerationsraten erzielt werden.



**Abbildung 2-48: Sprossregeneration an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle (Versuch Reg 12)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Großbuchstaben dienen dem Vergleich der Regenerationsraten innerhalb eines Versuchsdurchgangs. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 6$  Wiederholungen

20 S - 20 g/l Saccharose  
 30 S - 30 g/l Saccharose,  
 20 S+10 G - 20 g/l Saccharose + 10 g/l Glukose  
 20 S+10 M - 20 g/l Saccharose + 10 g/l Maltose  
 20 G - 20 g/l Glukose  
 20 M - 20 g/l Maltose

Die Anzahl der pro regenerierendem Explantat gebildeten Sprosse zeigt Abbildung 2-49. Auch hier konnte eine Steigerung der Anzahl der neu gebildeten Sprosse auf den einzelnen Medien durch Verwendung von Gelrite und Fe-EDDHA (3. Versuchsdurchgang) erzielt werden. Beim Vergleich der Sprosszahlen innerhalb der Versuchsdurchgänge konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Ähnlich wie bei der Sprossregenerationsrate konnte keines der getesteten Nährmedien als eindeutig am besten geeignet identifiziert werden. Die Verwendung von 20 g/l Glukose führte jedoch in allen drei Versuchsdurchgängen zu jeweils einer der höchsten Sprosszahlen (Abbildung 2-49).

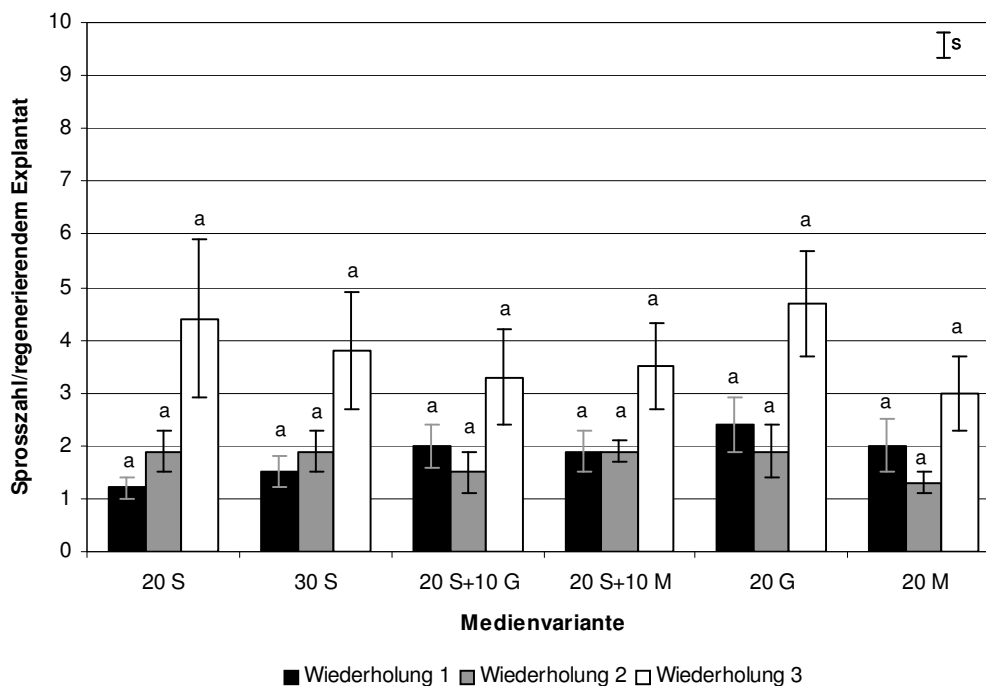


Abbildung 2-49: Durchschnittliche Anzahl Sprosse pro regenerierendem Blattexplantat der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle (Versuch Reg 12)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Kleinbuchstaben dienen dem Vergleich der durchschnittlich gebildeten Sprosse innerhalb eines Versuchsdurchgangs. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 6$  Wiederholungen

20 S - 20 g/l Saccharose  
 30 S - 30 g/l Saccharose,  
 20 S+10 G - 20 g/l Saccharose + 10 g/l Glukose  
 20 S+10 M - 20 g/l Saccharose + 10 g/l Maltose  
 20 G - 20 g/l Glukose  
 20 M - 20 g/l Maltose

Auch Blatt- sowie Stänglexplantate der Art *H. arborescens* 'Annabelle' wurden auf Medien mit den verschiedenen Zuckern und Zuckerkombinationen kultiviert. Bildung von grünem kugelförmigem Kallus erfolgte zu fast 100 % bei Kultur auf allen Medienvarianten (Tabelle A 18). Zum Versuchsende verfärbte sich der Kallus an der Unterseite leicht bräunlich. Sprosse konnten an keinem der beiden Explantatarten beobachtet werden.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse zur Adventivsprossregeneration

Die Regeneration von Adventivsprossen an Blattexplantaten von vier Sorten der Art *H. macrophylla* auf Nährmedien mit zwei unterschiedlichen Zusammensetzungen der Makro- und Mikronährstoffe, jeweils in voller und in halber Nährsalzkonzentration, war bei allen Sorten auf 1/2 B5-Medium am erfolgreichsten. Die Regenerationsleistung war jedoch stark sortenabhängig. Eine gute Regeneration konnte bei Explantaten der Sorten 'Nachtigall' und 'Blaumeise' beobachtet werden. Die sehr niedrige Adventivsprossrege-

neration (3%) an Blattexplantaten der Sorte 'Libelle' konnte durch Austausch der Eisenform und des Verfestigungsmittels auf allen Medien gesteigert werden. Die besten Ergebnisse wurden auch hier auf 1/2 B5-Medium erzielt. Die einzigen Regenerationsereignisse an Blattexplantaten der Sorte 'Adria' wurden ebenfalls auf diesem Medium beobachtet. Allerdings regenerierten nur anormale sukkulente Sprosse.

Während die ersten Versuche ausschließlich auf Medien mit 2 mg/l BAP durchgeführt wurden, wurden in weiteren Versuchen verschiedene Wachstumsregulatoren getestet. Bei Versuchen mit den Sorten *H. macrophylla* 'Nachtigall', 'Libelle' und 'Blaumeise' wurden die besten Ergebnisse auf Medien mit 2 mg/l BAP erzielt. Keine Sprosse konnten an Explantaten der Sorte 'Adria' regeneriert werden. Auch durch die Verwendung von PCIB bzw. Flurprimidol konnte eine Sprossregeneration nicht realisiert werden. Ebenfalls blieb die Regeneration von Sprossen an Blatt- und Stängelexplantaten der in dieser Versuchsreihe zusätzlich untersuchten Art *H. arborescens* 'Annabelle' erfolglos. Im Gegensatz zu der erfolgreichen Regeneration der oben genannten Sorten auf Medien mit 2 mg/l BAP konnten bei der Art *H. quercifolia* 'Pee Wee' bessere Ergebnisse auf Medium mit 1 mg/l TDZ erzielt werden.

Als ein weiterer Faktor wurde die Kohlenhydratquelle variiert. Eine eindeutig bessere Eignung einer Medienvariante konnte nicht festgestellt werden. Während die Regeneration an Blattexplantaten der Sorte 'Libelle' auf Medien, die Saccharose in der Konzentration von 30 g/l enthielten am höchsten war, konnte nach drei Versuchsdurchgängen mit der Sorte 'Blaumeise' kein Medium als das am besten geeignete identifiziert werden. Regeneration von Adventivsprossen fand auf allen sechs untersuchten Medien statt, die Regenerationsraten und die Anzahl der regenerierten Sprosse schwankten jedoch stark zwischen den Versuchsdurchgängen. Durch die Verwendung von Fe-EDDHA an Stelle von Fe-Na-EDTA sowie Gelrite an Stelle von Plant Agar konnten jedoch sowohl die Regenerationsrate als auch die Sprosszahlen auf allen Medien gesteigert werden.

#### **2.2.3.4 Regeneration über somatische Embryogenese**

Neben Versuchen zur Adventivsprossregeneration wurden Versuche zur Regeneration über somatische Embryogenese durchgeführt. Im Gegensatz zu zygotischen Embryonen, die nach einer sexuellen Befruchtung gebildet werden, entstehen somatische Embryonen ohne die Verschmelzung von Gameten an somatischem Gewebe. Der somatische Embryo durchläuft dabei ähnliche Entwicklungsstadien wie der zygotische und eignet sich daher als Model zur Untersuchung der Embryonalentwicklung. Neben der Möglich-

keit der klonalen Massenvermehrung bietet die somatische Embryogenese eine Vielzahl weiterer Anwendungsmöglichkeiten in der Pflanzenzüchtung (z. B. bei Transformationsversuchen, die Produktion von künstlichem Saatgut oder nach Kryokonservierung von somatischen Embryonen die Erstellung von Genbanken). Daher ist die somatische Embryogenese ein attraktiver Vermehrungsweg. Berichte über somatische Embryogenese bei *Hydrangea* gibt es jedoch in der Literatur nicht. In den hier beschriebenen Untersuchungen wurden neben verschiedenen Wachstumsregulatoren verschiedene Explantat-typen und Kulturmethoden zur Induktion von somatischen Embryonen untersucht.

Versuch sE 1:

Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' wurden zur Induktion von embryogenen Zellen auf zwei Medien mit verschiedenen Konzentrationen von 2,4-D und 2iP kultiviert. Nach den ersten vier Wochen der Kultur der Explantate wurde sowohl an den Explantaten die im Licht/Dunkelrhythmus als auch an denen, die im Dauerdunkel kultiviert wurden, auf beiden Medienvarianten (A und B, Tabelle 2-17) beginnende Kallusbildung beobachtet. Der Kallus an den Explantaten, die dunkel kultiviert wurden, war im Gegensatz zu dem grünen Kallus bei Kultur im Licht/Dunkelwechsel weiß. Außerdem wurde unabhängig von der Kulturvariante und unabhängig vom Medium an einigen Explantaten die Bildung von kugelförmigen Strukturen beobachtet, deren Oberfläche glatter erschien als die Oberfläche des Kallus (Abbildung 2-50 A und C). Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um globuläre somatische Embryonen handeln könnte. Daher wurden ab der sechsten Kulturwoche einige Explantate, aus der Variante mit Hell/Dunkelrhythmus auf Medium ohne Wachstumsregulatoren (Medium 0) überführt und deren weitere Entwicklung beobachtet. Nach der zweiten Kulturperiode waren insgesamt 25 Explantate von Medium A und 15 Explantate von Medium B auf Medium 0 überführt worden.

Im Anschluss an die erste Kulturpassage von vier Wochen wurden alle Explantate, die im Hell/Dunkelrhythmus kultiviert wurden, auf frisches Medium der jeweils gleichen Zusammensetzung (Medium A bzw. B) überführt (Abbildung 2-5). Die Explantate, die auf den Medien A und B im Dauerdunkel kultiviert wurden, wurden je zur Hälfte (15 PS) auf frisches Medium dergleichen Zusammensetzung (Medium A bzw. B) und zur Hälfte auf Medium ohne Wachstumsregulatoren (Medium 0) überführt (Abbildung 2-5). Hierbei wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Explantate mit und ohne Kallusbildung geachtet. Nach zwei weiteren Wochen Kultur in Dunkelheit wurden die Explan-

tate, die auf Medium 0 kultiviert wurden, ins Licht überführt. Die Überführung ins Licht der Explantate auf den Medien A und B erfolgte nach vier Wochen (Abbildung 2-5).

Der Anteil der Explantate, die nach der zweiten Kulturpassage Kallus gebildet hatten, ist in Tabelle 2-41 dargestellt. Ein Unterschied zwischen den Kulturmedien konnte bei einem Vergleich in den gleichen Lichtbedingungen nicht festgestellt werden. Vergleicht man die Lichtbedingungen unabhängig vom Nährmedium, so resultierte die Kultur bei einem Licht/Dunkelrhythmus (16/8 h) von Beginn der Kultur an in einer höheren Anzahl Explantate mit Kallusbildung als bei Kultur im Dauerdunkel bzw. bei sechs Wochen Dauerdunkel und anschließender zweiwöchiger Kultur mit 16 h Belichtung und 8 h Dunkelheit (Tabelle 2-41).

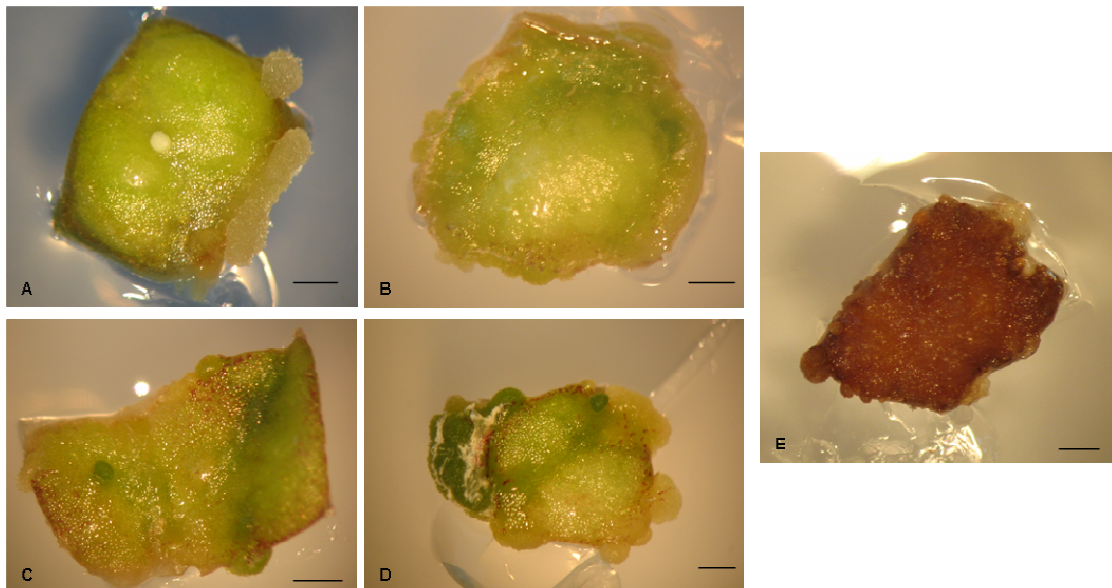
**Tabelle 2-41: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' bei unterschiedlichen Lichtbedingungen und unterschiedlicher Medienzusammensetzung (Versuch sE 1)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen.

Kultur-schemata	Medienvariante	Kulturvariante	Anzahl Petrischalen	Anteil Explantate mit Kallusbildung (%)	
				$\bar{x}$	s
1	8 Wochen Medium A	8 Wochen dunkel	15	79	± 8
2	8 Wochen Medium B	8 Wochen dunkel	15	83	± 8
3	8 Wochen Medium A	8 Wochen hell/dunkel	25	95	± 5
4	8 Wochen Medium B	8 Wochen hell/dunkel	27	90	± 7
5	4 Wochen Medium A 4 Wochen Medium 0	6 Wochen dunkel 2 Wochen hell/dunkel	15	69	± 10
6	4 Wochen Medium B 4 Wochen Medium 0	6 Wochen dunkel 2 Wochen hell/dunkel	15	71	± 15

A - 2 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2iP;  
 B - 1 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2iP;  
 0 - ohne Wachstumsregulatoren

Der Kallus an Explantaten, die durchgängig im Hell/Dunkelrhythmus kultiviert wurden, war kugelförmig grün oder gelblich. Kallus, der bei Kultur in Dauerdunkel gebildet wurde, war weiß, färbte sich aber nach Überführung ins Licht grün. Auch dieser Kallus war kugelförmig. Überwiegend wurde Kallus am Explantatrand gebildet (Abbildung 2-50).



**Abbildung 2-50: Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise'**

A bzw. C- nach der ersten vierwöchigen Kulturpassage im Dauerdunkel (A) bzw. Hell/Dunkelrhythmus (C)  
 B bzw. D - nach der zweiten vierwöchigen Kulturpassage im Dauerdunkel (B) bzw. Hell/Dunkelrhythmus (D)  
 E - zu Versuchsende nach Kultur im Hell/Dunkelrhythmus,  
 (Balken entsprechen 1 mm)

Beim Vergleich der Verbräunung der Explantate, die für zwei Kulturpassagen ausschließlich auf Medium A oder B kultiviert wurden, konnte kein Unterschied zwischen beiden Medienvarianten festgestellt werden (Abbildung 2-51). Bei Kultur im Dauerdunkel waren unabhängig vom Nährmedium ca. 70 % der Explantate grün, bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus waren 90 % der Explantate grün. Eine deutlich höhere Anzahl komplett verbräunter Explantate wurde bei der Kulturvariante festgestellt, bei denen ein Wechsel von der Kultur im Dauerdunkel in den Hell/Dunkelrhythmus und ein Wechsel des Kulturmediums stattfand (Abbildung 2-51).

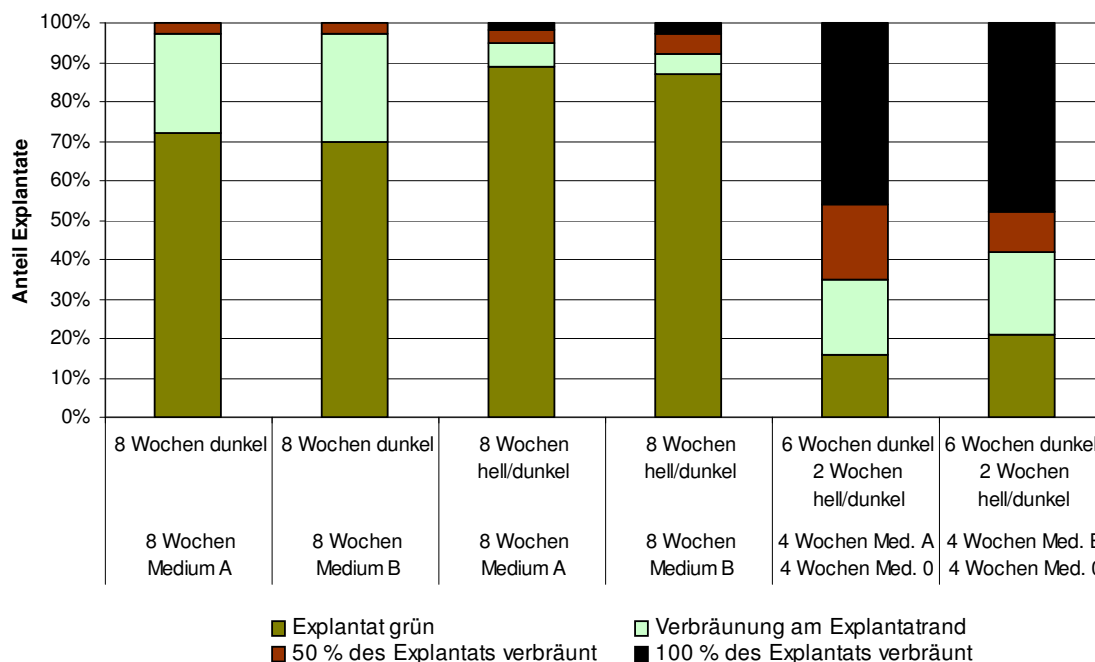


Abbildung 2-51: Verbräunung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen bei unterschiedlichen Lichtbedingungen und unterschiedlicher Medienzusammensetzung

A - 2 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2iP  
 B - 1 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2iP  
 0 - ohne Wachstumsregulatoren  
 n = Anzahl Wiederholungen

Ab Kulturwoche neun wurden alle Explantate ausschließlich bei einem Hell/Dunkelrhythmus von 16/8 h kultiviert. Nach einer weiteren vierwöchigen Kulturpassage bei unveränderter Medienzusammensetzung wurden alle Explantate, die noch auf Medium A bzw. B kultiviert wurden auf wachstumsregulatorfreies Medium überführt (Abbildung 2-5). Im Verlauf der sechswöchigen Kultur wurde jedoch keine Entwicklung somatischer Embryonen bzw. eine Veränderung des Kallus, der eine Differenzierung vermuten ließ, festgestellt. Daher wurden die Explantate auf Medien mit geringen Gehalten an 2iP (Medium C und D) überführt und für weitere sechs Wochen kultiviert.

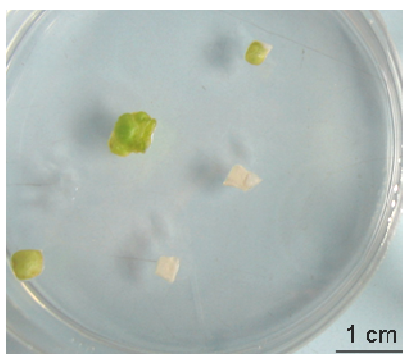
Nach der letzten Kulturpassage wurde dieser Versuch aufgrund der Vielzahl verbräunter Explantate und aufgrund fehlender Weiterentwicklung beendet.

#### Versuch sE 2:

Im zweiten Versuch mit Blattexplantaten der Sorte 'Blaumeise' wurden die Explantate für zwei Kulturpassagen von je drei Wochen auf den Medien A und B (Tabelle 2-17) bei Dauerdunkelheit und einem Hell/Dunkelrhythmus von 16/8 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Überführung der Explantate auf die Medien C, D, E und F (Tabelle 2-17). Die Kultur erfolgte weiterhin in beiden Lichtbedingungen.



Nach der ersten Kulturpassage von drei Wochen waren alle Explantate, die im Dauerdunkel kultiviert worden waren, grün. Die Explantate, die im Hell/Dunkelrhythmus kultiviert wurden, zeigten ebenfalls keine Verbräunungen, jedoch waren 44 Explantate (32 %) auf Medium A bzw. 47 Explantate (34 %) auf Medium B komplett weiß und ohne Kallusbildung abgestorben (Abbildung 2-52).



**Abbildung 2-52: Grüne und abgestorbene weiße Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' nach einer dreiwöchigen Kulturpassage auf Medium B im Hell/Dunkelrhythmus (Versuch sE 2)**

Die Kallusbildungsraten aller Explantate sind in Tabelle 2-42 dargestellt. Wie bereits in Versuch sE 1 konnte kein Einfluss der Medienvariante beobachtet werden. Einen signifikanten Einfluss auf die Kallusbildung hatte jedoch der Faktor Licht. Bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus hatten 62 % (Medium A) bzw. 52 % (Medium B) der Explantate hellgrünen kugelförmigen Kallus gebildet (Abbildung 2-54 A). Bei Kultur im Dauerdunkel wurde weißlich bis durchscheinender kugelförmiger Kallus an 29 % (Medium A) bzw. 39 % (Medium B) der Explantate gebildet. Bei Nicht-Berücksichtigung der abgestorbenen Explantate bildeten im Hell/Dunkelrhythmus alle grünen Explantate auf Medium A Kallus und 83 % der grünen Explantate auf Medium B.

**Tabelle 2-42: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' nach einer dreiwöchigen Kulturpassage (Versuch sE 2)**

Kleinbuchstaben dienen dem Vergleich der Lichtbedingungen bei Verwendung des gleichen Mediums. Großbuchstaben dienen dem Vergleich der Medienvarianten bei gleichen Lichtbedingungen. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede bei einem t-Test mit anschließender Bonferroni Korrektur. A - 2 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2iP; B- 1 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2iP, n mindestens 23 Wiederholungen (Petrischalen)

	Anteil Explantate mit Kallusbildung (%)			
	Medium A		Medium B	
	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S
<b>Hell/Dunkelrhythmus</b>	62 <sup>aA</sup>	± 9	52 <sup>aA</sup>	± 8
<b>Dauerdunkel</b>	29 <sup>bA</sup>	± 5	39 <sup>bA</sup>	± 7

Im weiteren Kulturverlauf wurden die weißen Explantate aufgrund fehlender Entwicklung aus dem Versuch entfernt. Nach einer zweiten Kulturpassage von drei Wochen auf den Medien A und B erfolgte eine Verteilung der Explantate auf die Kulturmedien C, D, E und F. Die Kallusbildungsraten nach weiteren zwei dreiwöchigen Kulturpassagen auf diesen Medien sind in Tabelle 2-43 dargestellt.

**Tabelle 2-43: Kallusbildungsraten an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' nach vier dreiwöchigen Kulturpassagen auf unterschiedlichen Nährmedien im Hell/Dunkelrhythmus bzw. im Dauerdunkel**

Belichtung	Medienvariante während der		n	Anteil grüner Explantate mit Kallusbildung (%)	
	1. + 2. Kulturpassage	3. + 4. Kulturpassage		$\bar{x}$	s
Hell/Dunkelrhythmus	A	C	5	100	0
	A	D	6	100	0
	A	E	6	100	0
	A	F	6	100	0
	B	C	7	100	0
	B	D	6	100	0
	B	E	6	100	0
	B	F	6	100	0
Dauerdunkel	A	C	6	60	± 6
	A	D	6	87	± 5
	A	E	6	80	± 6
	A	F	6	83	± 7
	B	C	6	83	± 7
	B	D	6	97	± 4
	B	E	6	79	± 6
	B	F	5	80	± 6

A - 2 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2iP

B- 1 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2iP

C - 0,8 mg/l 2iP

D - 0,4 mg/l 2iP

E - 1 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l 2iP

F - 0,5 mg/l 2,4-D + 0,4 mg/l 2iP

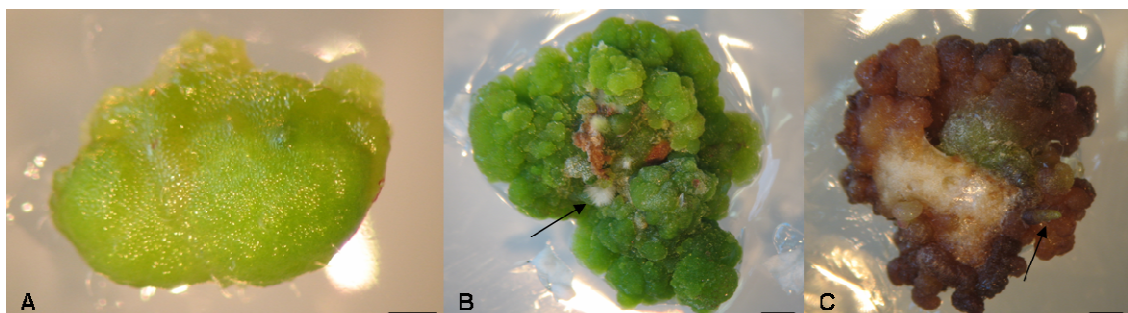
n - Anzahl Petrischalen à 5 Explantate

Einen deutlichen Einfluss auf die Kallusbildung hatte wie bereits bei der Bonitur nach der ersten Kulturpassage der Faktor Licht. Unabhängig von der Medienvariante bildeten 100 % der Explantate im Hell/Dunkelrhythmus Kallus. Bei Kultur im Dauerdunkel bildeten 60 bis 97 % Kallus. Der Kallus der sich an Explantaten im Hell/Dunkelrhythmus gebildet hat, war kugelförmig grün mit teilweise hellerem weißlichem Kallus. Explantate, die im Dauerdunkel kultiviert wurden, bildeten hell gelblichen bis weißlichen ebenfalls kugelförmigen Kallus in etwas geringerem Umfang als bei Kultur bei Licht/Dunkelwechsel aus.

Aufgrund der starken Kallusbildung (Abbildung 2-53 B) war bei einer Vielzahl von Explantaten keine Bonitur der Verbräunung mehr möglich, deshalb wurde auf diese ver-

zichtet. Wurzelbildung trat an einigen Explantaten unabhängig von den Kulturmedien oder der Belichtung auf. Bildung von Strukturen, wie im ersten Versuch, wurde nicht beobachtet bzw. als Wurzelansatz erkannt.

Die Explantate wurden für weitere drei Kulturpassagen (insgesamt neun Wochen) kultiviert und auf Bildung somatischer Embryonen bonitiert. Während dieser Zeit verbräunten die Explantate und der Kallus (Abbildung 2-53 C). Bildung von somatischen Embryonen konnte nicht beobachtet werden. Nach insgesamt 21 Wochen Kultur wurde dieser Versuch beendet.



**Abbildung 2-53: Kallusbildung an Explantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' (Versuch sE 2)**

Exemplarisch ist nur die Kulturvariante im Hell/Dunkelrhythmus gezeigt. Die Pfeile verweisen auf Wurzelbildung.

A - nach der ersten dreiwöchigen Kulturpassage

B - nach der dritten Kulturpassage

C - zu Versuchsende nach sieben Kulturpassagen  
(Balken entsprechen 1 mm)

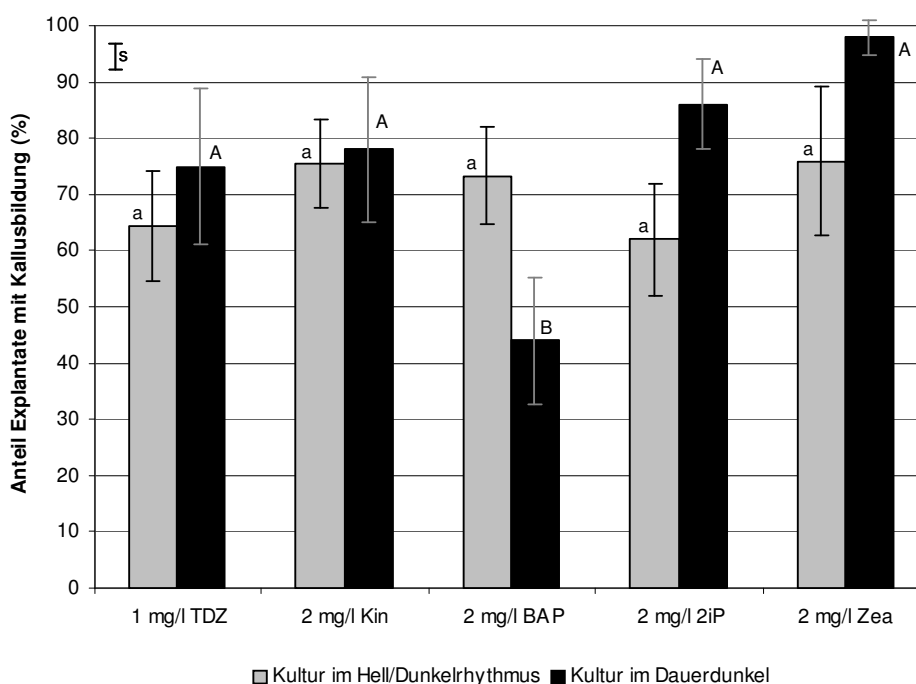
Versuch sE 3:

Blütenböden der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' wurden nach einer Oberflächensterilisation auf Medium G mit 0,5 mg/l 2,4-D und 2 mg/l 2iP sowohl im Dauerdunkel als auch im Hell/Dunkelrhythmus (16/8 h) kultiviert. Nach vier Wochen Kultur hatten unabhängig von den Lichtbedingungen 95 % aller Explantate grünen kugelförmigen (bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus) bzw. hellen gelblich bis hellgrünen kugelförmigen Kallus (bei Kultur im Dauerdunkel) gebildet.

Die Explantate wurden über einen Zeitraum von insgesamt 12 Wochen (drei Kulturpassagen) kultiviert. Im Verlauf dieser Zeit konnte keine Entwicklung somatischer Embryonen beobachtet werden. Die Explantate und der Kallus verfärbten sich im Verlauf der Kultur braun, so dass dieser Versuch nach 12 Wochen beendet wurde.

Versuch sE 4:

In diesem Versuch wurden fünf Cytokinine in Kombination mit einem Auxin getestet (Medien H bis L, Tabelle 2-17). Die Blattexplantate der Sorte 'Adria' wurden sowohl im Dauerdunkel als auch im Hell/Dunkelrhythmus (16/8 h) kultiviert. Bereits nach vier Wochen konnte an Blattexplantaten auf allen Medienvarianten und in beiden Lichtbedingungen Kallusbildung an den Explantaträndern beobachtet werden. Nach achtwöchiger Kultur konnte, im Gegensatz zu den vorigen Versuchen, kein signifikanter Einfluss der Lichtbedingungen auf die Kallusbildungsrate festgestellt werden. Ein signifikanter Einfluss der verwendeten Cytokinin/Auxinkombination zeigte sich jedoch bei Kultur im Dauerdunkel. Der geringste Anteil Explantate bildete Kallus bei Kultur auf Medium mit 2 mg/l BAP (44 %) (Abbildung 2-54). Bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus wurde unabhängig von Nährmedium an 62 bis 76 % der Explantate Bildung von Kallus beobachtet.

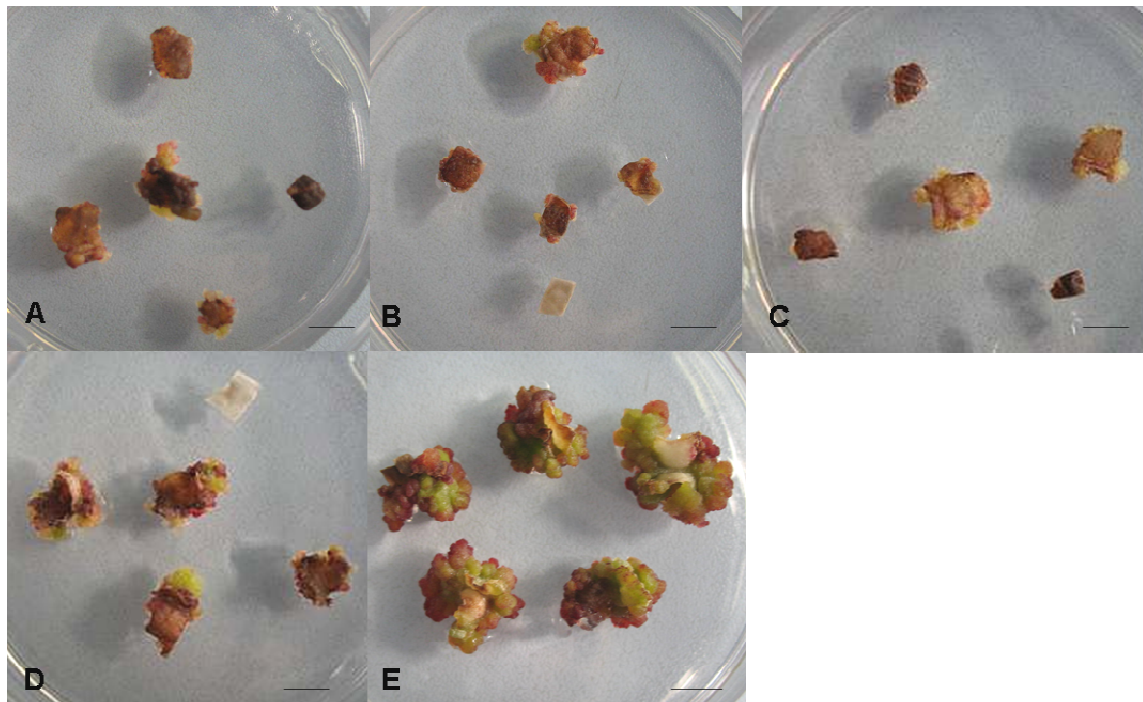


**Abbildung 2-54: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' bei unterschiedlichen Lichtbedingungen in Abhängigkeit vom verwendeten Cytokinin**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Kleinbuchstaben ermöglichen den Vergleich der Kallusbildungsrate bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus, Großbuchstaben bei Kultur im Dauerdunkel. n = 10 Wiederholungen

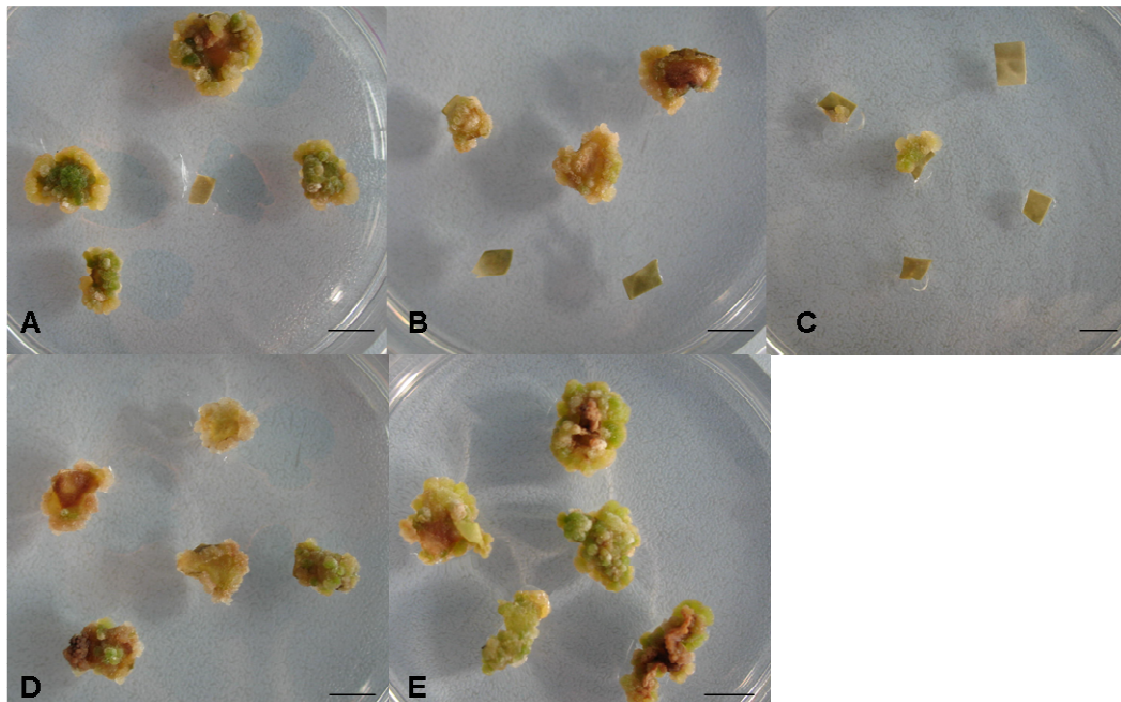
Der Umfang der Kallusbildung an einem Explantat unterschied sich zwischen den Medienvarianten deutlich. Bei Kultur in beiden Lichtbedingungen führte die Kultur auf Zeatin-haltigen Medien zu einer stärkeren Kallusbildung als bei Kultur auf den anderen

Medien (Abbildung 2-55, Abbildung 2-56). Offensichtlich ist außerdem die stärkere Verbräunung der Explantate und des Kallus bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus.



**Abbildung 2-55: Kallusbildung und Verbräunung der Explantate der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen im Hell/Dunkelrhythmus auf Nährmedien mit unterschiedlichen Cytokininen (Versuch sE 4)**

A - 1 mg/l TDZ, B - 2 mg/l Kinetin, C - 2 mg/l BAP, D - 2 mg/l 2iP, E - 2 mg/l Zeatin,  
(Balken entsprechen 0,5 cm)



**Abbildung 2-56: Kallusbildung und Verbräunung der Explantate der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen im Dauerdunkel auf Nährmedien mit unterschiedlichen Cytokinin (Versuch sE 4)**

A - 1 mg/l TDZ, B - 2 mg/l Kinetin, C - 2 mg/l BAP, D - 2 mg/l 2iP, E - 2 mg/l Zeatin  
(Balken entsprechen 0,5 cm)

Nach der zweiten Kulturpassage wurden alle Explantate mit Kallusbildung auf Medium ohne Wachstumsregulatoren überführt, um so eine Differenzierung von somatischen Embryonen zu realisieren. Im weiteren Kulturverlauf starben die Explantate jedoch ab, ohne dass eine Entwicklung zu beobachten war. Nach 16 Wochen wurde daher dieser Versuch beendet.

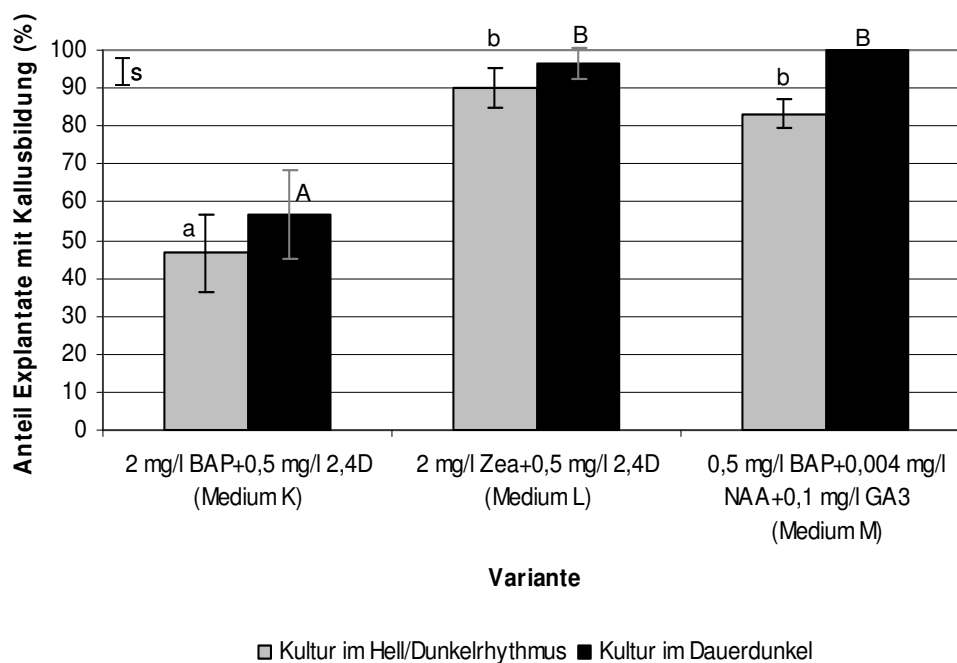
#### Versuch sE 5:

Dieser Versuche wurde in Anlehnung an Versuche angelegt, bei denen bei der Etablierung von *H. macrophylla* 'Adria' die Bildung von somatischen Embryonen an Blättern vermutet wurde (A. Schum, JKI Groß Lüsewitz, persönliche Mitteilung). Daher wurden die zur Etablierung verwendeten Kombinationen und Konzentrationen der Wachstumsregulatoren (Medium M und N) in diesem Versuch getestet. Während der ersten vierwöchigen Kulturpassage der Blattexplantate hatten 43 % der Explantate im Hell/Dunkelrhythmus hellgrünen kugelförmigen und 86 % der Explantate im Dauerdunkel hellen kugelförmigen Kallus gebildet (Tabelle A 19). Nach der zweiten Kulturpassage waren 80 % der Explantate im Hell/Dunkelrhythmus und 94 % der Explantate im Dauerdunkel mit Kallusbildung (Tabelle A 19). Die Bildung somatischer Embryonen

wurde nicht beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Überführung der Explantate auf Nährmedium mit 0,2 mg/l BAP und 0,2 mg/l IAA (Medium N). Dies führte jedoch ebenfalls nicht zur Bildung somatischer Embryonen. Nach zwei weiteren Kulturpassagen waren alle Explantate und der Kallus verbräunt und der Versuch wurde beendet.

Versuch sE 6:

Blattexplantate der Sorte 'Libelle' wurden auf dem bereits in Versuch fünf verwendeten Medium M und zwei weiteren Kulturmedien K und L kultiviert (Tabelle 2-17). Nach der ersten Kulturpassage trat Kallusbildung auf allen Medienvarianten in beiden Lichtbedingungen mit unterschiedlichen Raten auf. Unabhängig davon, ob die Explantate der Sorte 'Libelle' im Hell/Dunkelrhythmus oder im Dauerdunkel kultiviert wurden, hatte ein signifikant geringerer Anteil Kallus auf Medium K, welches 2 mg/l BAP mit 0,5 mg/l 2,4-D enthielt, gebildet (Abbildung 2-57). Explantate, die keinen Kallus gebildet hatten, waren fast alle ausgebleichen, weiß und abgestorben.



**Abbildung 2-57: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' bei unterschiedlichen Lichtbedingungen in Abhängigkeit von den verwendeten Wachstumsregulatoren (Versuch sE 6)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung nach einer vierwöchigen Kulturpassage. Kleinbuchstaben ermöglichen den Vergleich der Kallusbildungsrate bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus, Großbuchstaben bei Kultur im Dauerdunkel, n = 6 Wiederholungen

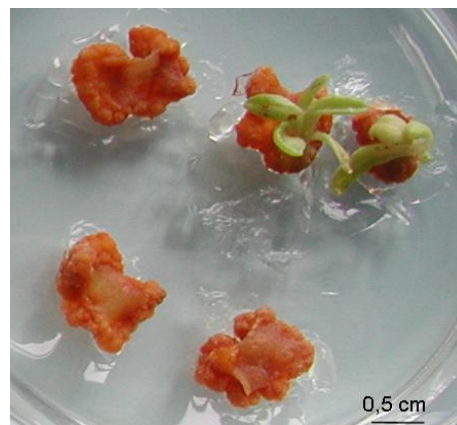
An vier Explantaten, die auf Medium M im Hell/Dunkelrhythmus kultiviert wurden, und an sechs Explantaten auf demselben Medium im Dauerdunkel wurden Strukturen äh-



lich denen, die im ersten Versuch gebildet wurden, beobachtet. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob es sich um somatische Embryonen handeln könnte, wurde versucht einige dieser Strukturen mit Hilfe einer Präpariernadel vom Explantat bzw. Kallus zu entnehmen. Da somatische Embryonen keine Verbindung zum Kallus haben, wurde ein einfaches Ablösen der potentiellen Embryonen erwartet. Dies war jedoch nicht möglich. Nur durch verstärktes Bemühen konnten einige dieser Strukturen abgelöst und einzeln auf dem Nährmedium platziert werden.

Nach der ersten Kulturpassage wurden die Explantate und die abgelösten Strukturen von Medium M aufgeteilt und zur Hälfte auf frisches Medium dergleichen Zusammensetzung und zur Hälfte auf Medium N überführt. Ebenso wurde mit den Explantaten auf den Medien K bzw. L verfahren. Diese wurden zur Hälfte auf frisches Medium K bzw. L und zur Hälfte auf Medium P überführt. Die Kultur im Hell/Dunkelrhythmus bzw. im Dauerdunkel wurde beibehalten.

Zur zweiten Bonitur nach einer weiteren Kulturpassage von vier Wochen hatten ähnlich viele Explantate Kallus gebildet wie nach der ersten Kulturpassage (Abbildung A 6). Bei keinem, der vom Explantat abgetrennten Strukturen wurde eine Differenzierung oder Weiterentwicklung beobachtet. Alle Strukturen verfärbten sich braun und starben ab. Aus den Strukturen, die am Explantat belassen wurden, entwickelten sich z. T. Pflänzchen, die jedoch keine Wurzel bildeten und somit Adventivsprosse waren (Abbildung 2-58).



**Abbildung 2-58: Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' mit Adventivsprossbildung nach drei vierwöchigen Kulturpassagen (Versuch sE 6)**

Die erste Kulturpassage erfolgte auf Medium M (0,5 mg/l BAP + 0,004 mg/l NAA + 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>) und anschließend auf Medium N (0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l IAA).

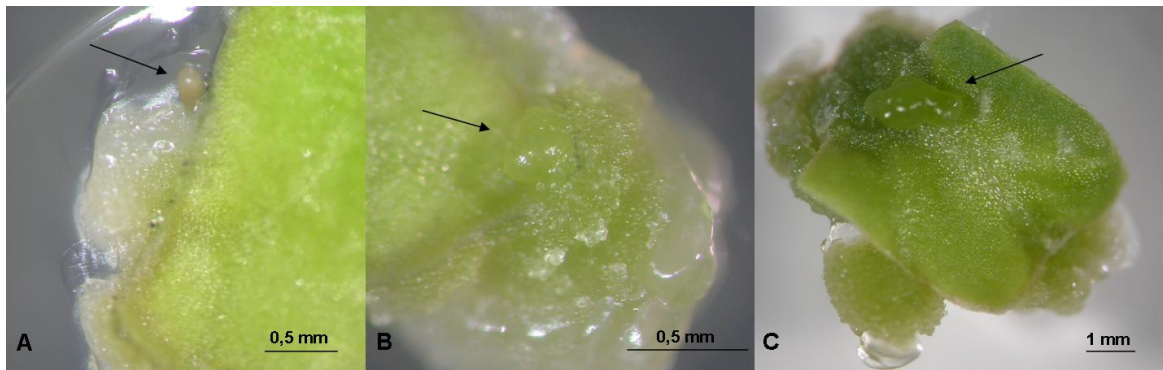


Versuch sE 7:

Im ersten Versuchsdurchgang hatten nach der ersten Kulturpassage die Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' auf Medium M (0,5 mg/l BAP + 0,004 mg/l NAA + 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>) sowohl bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus als auch im Dauerdunkel zu 96 % Kallus gebildet. Bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus bildeten die Explantate Kallus an vereinzelt Stellen am Explantatrand. Dieser war zum einen grün und zum anderen weißlich. Der weißliche Kallus setzte sich aus kleineren „Kugeln“ zusammen als der grüne Kallus. Auf neun Explantaten (13 %) wurden ein bis zwei größere kugelförmige zum Teil etwas längliche weiße bzw. grüne Strukturen beobachtet (Abbildung 2-59 A, B), die sich jedoch nicht von diesen lösen ließen. An zwei Explantaten wurde je ein Spross ohne Wurzel gebildet. Ferner waren 30 % der Explantate komplett verbräunt. Demgegenüber waren bei Kultur im Dauerdunkel zu diesem Zeitpunkt alle Explantate grün und hatten ebenfalls vereinzelt am Explantatrand hellgrünen bis gelblichen kugelförmigen Kallus gebildet. Im Vergleich mit der Kultur der Explantate im Hell/Dunkelrhythmus hatte im Dauerdunkel eine höhere Anzahl Explantate (34 %) ein bis drei kugelförmige Strukturen mit glatter Oberfläche gebildet. Die Bildung von je einem Spross ohne Wurzel wurde an drei Explantaten beobachtet.

Nach einer weiteren Kulturpassage auf Medium M (Tabelle 2-16) hatten 99 % der Explantate (bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus) bzw. 100 % der Explantate (bei Kultur im Dauerdunkel) Kallus gebildet. Kallus an Explantaten beider Kulturbedingungen zeigte Verbräunungen. Alle Explantate der Kultur im Hell/Dunkelrhythmus waren zu diesem Zeitpunkt verbräunt, wohingegen nur 40 % der Explantate im Dauerdunkel als komplett braun eingestuft wurden.

Einige der oben beschriebenen grünen Strukturen zeigten geringfügiges Wachstum jedoch keine Differenzierung (Abbildung 2-59 C).



**Abbildung 2-59: Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' (Versuch sE 7 Versuchsdurchgang 1)**

- A - Blattexplantat mit weißlichem Kallus und deutlich sichtbarer abgegrenzter Struktur (Pfeil) mit glatter Oberfläche, nach vierwöchiger Kultur auf Medium M im Dauerdunkel
- B - Blattexplantat mit grünem Kallus und kugelförmiger Struktur (Pfeil) obenauf, nach vierwöchiger Kultur auf Medium M im Dauerdunkel
- C - Blattexplantate mit grünem Kallus und vermutetem sukkulentem Adventivspross (Pfeil), nach sechswöchiger Kultur auf Medium M im Hell/Dunkelrhythmus

Nach der zweiten Kulturpassage wurden an 11 % der Explantate bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus bzw. 27 % der Explantate bei Kultur im Dauerdunkel Strukturen beobachtet, von denen sich ein kleiner Teil relativ einfach lösen ließ und separat auf das Nährmedium N (0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l IAA), auf dem auch die Weiterkultur der Explantate stattfand, platziert wurde. Die weitere Kultur, bei der alle Explantate im Hell/Dunkelrhythmus kultiviert wurden, führte zur Verbräunung aller Blattexplantate und anschließend auch zur Verbräunung des Kallus. Die Strukturen, die einzeln auf dem Medium platziert wurden, verfärbten sich ohne Weiterentwicklung braun und starben ab. Dieser Versuch wurde nach zwei weiteren Kulturpassagen auf Medium N beendet.

Im zweiten Versuchsdurchgang erfolgte die erste Bonitur erst nach einem Zeitraum von acht Wochen. Zu diesem Zeitpunkt hatten ähnlich viele Explantate Kallus gebildet wie im ersten Versuchsdurchgang (100 % bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus bzw. 97 % im Dauerdunkel). Die Struktur des Kallus war der, die im ersten Durchgang beobachtet wurde, ähnlich. Verbräunungen traten nur an Explantaten, die im Hell/Dunkelrhythmus kultiviert wurden, auf (45 % komplett verbräunt, 5 % zu 50 verbräunt, 3 % Verbräunungen am Explantatrand). Sprossbildung ohne Wurzeln wurde an einem (Kultur im Hell/Dunkelrhythmus) bzw. an acht Explantaten (Kultur im Dauerdunkel) beobachtet. An einigen Explantaten die im Dunkeln kultiviert wurden, traten weiße längliche Strukturen auf, die jedoch mit dem Explantat verwachsen waren und sich nicht ablösen ließen (Abbildung 2-60 A).

Nach einer weiteren Kulturpassage von vier Wochen auf Medium M (0,5 mg/l BAP + 0,004 mg/l NAA + 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>), die ausschließlich im Hell/Dunkelrhythmus stattfand, waren alle Explantate unabhängig von der Lichtbedingung während der ersten acht Wochen Kultur verbräunt. An einem Explantat (3 %), das durchgängig im Hell/Dunkelrhythmus kultiviert worden ist, wurde eine hellere längliche Struktur beobachtet. Bei Explantaten, die acht Wochen dunkel und anschließend vier Wochen im Hell/Dunkelrhythmus kultiviert wurden waren, hatten 20 % der Explantate solche Strukturen gebildet (Abbildung 2-60 B).

Bildung von Adventivsprossen, die fest am Blattexplantat und ohne erkennbare Wurzel waren, trat bei beiden Kulturbedingungen auf.

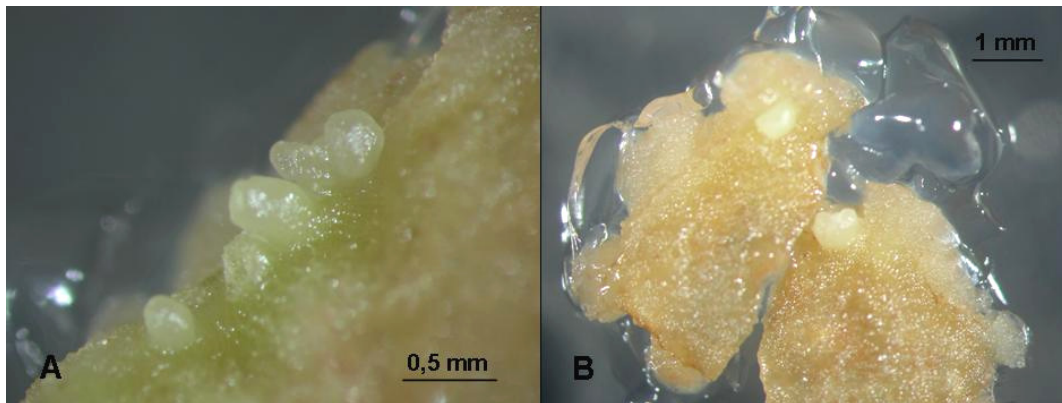


Abbildung 2-60: Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' mit deutlich sichtbaren dichten weißlich/hellen Strukturen mit glatter Oberfläche (Versuch sE 7 Versuchsdurchgang 2)

A - nach achtwöchiger Kultur im Dauerdunkel auf Medium M

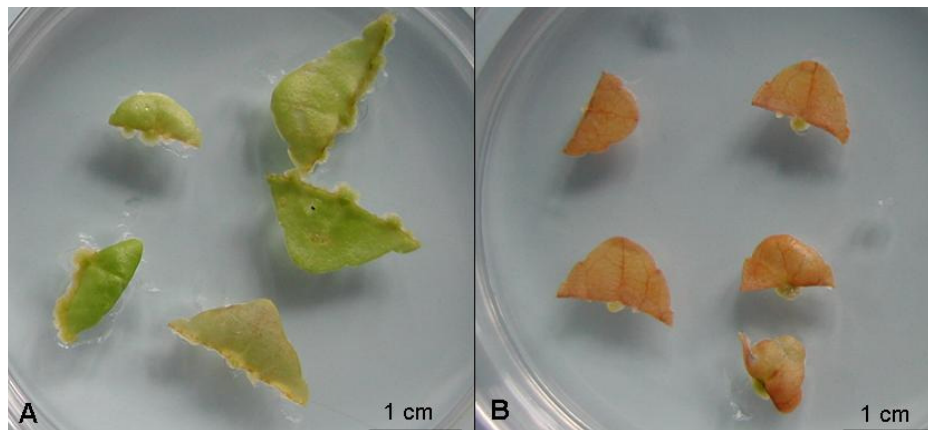
B - nach achtwöchiger Kultur im Dauerdunkel und anschließend vierwöchiger Kultur im Hell/Dunkelrhythmus auf Medium M

Eine Weiterkultur auf Medium N (0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l IAA) im Hell/Dunkelrhythmus erfolgte nur von Explantaten, die oben beschriebene weißliche Strukturen gebildet hatten. Ein leichtes Ablösen der Strukturen war nicht möglich, so dass diese am Explantat belassen wurden. Wie im ersten Versuchsdurchgang erfolgte keine Differenzierung. Nach zwei weiteren vierwöchigen Kulturpassagen wurde dieser Versuch beendet.

Versuch sE 8:

Die Kultur von Blattspitzen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' erfolgte für zweimal vier Wochen auf Medium M (0,5 mg/l BAP + 0,004 mg/l NAA + 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>) sowohl im Hell/Dunkelrhythmus als auch im Dauerdunkel. Nach der ersten Kulturpassage von vier Wochen waren bereits alle Explantate der Hell/Dunkelvariante verbräunt, während nur ein Explantat der Dauerdunkelvariante Verbräunungen zeigte (Abbildung 2-61). Die

komplett verbräunten Explantate zeigten zu 58 % Bildung von grünem Kallus, der sich ausschließlich an der Schnittstelle bildete. Demgegenüber hatten bereits 98 % der Explantate im Dauerdunkel Kallus gebildet. Pro Explantat wurde dabei deutlich mehr Kallus an der Schnittstelle gebildet als bei den Explantaten im Hell/Dunkelrhythmus (Abbildung 2-61).



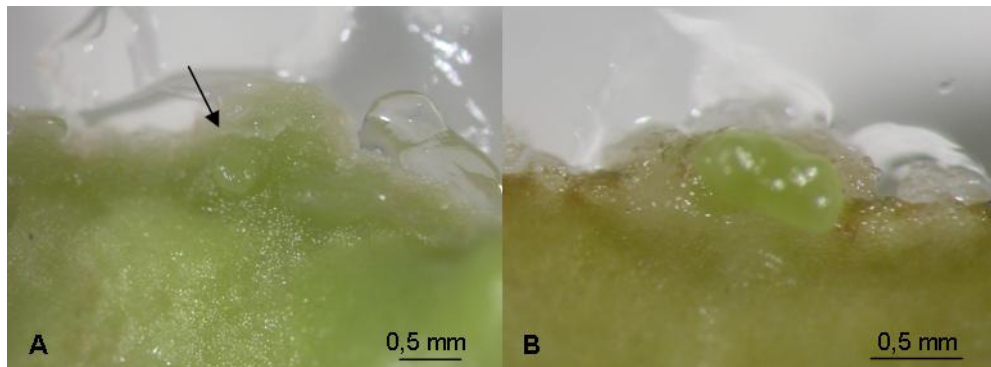
**Abbildung 2-61:** Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' nach einer vierwöchigen Kulturpassage auf Medium M mit 0,5 mg/l BAP, 0,004 mg/l NAA, 0,1 mg/l GA<sub>3</sub> (Versuch sE 8)

A - bei Kultur im Hell/Dunkelrhythmus

B - bei Kultur im Dauerdunkel

An sieben Explantaten (17 %), die im Dauerdunkel kultiviert wurden, konnte die Bildung von grünen kugelförmigen Strukturen an der Schnittstelle beobachtet werden (Abbildung 2-62 A).

Nach der zweiten Kulturpassage von vier Wochen auf Medium M waren 88 % der Explantate im Dauerdunkel verbräunt. Eine Weiterentwicklung der nach vier Wochen beobachteten Strukturen war kaum erkennbar (Abbildung 2-62 B). Zusätzlich hatten zwei weitere Explantate solche Strukturen gebildet. Zwei der Strukturen wurden vom Explantat gelöst und separat auf das Nährmedium gelegt. Die Bildung der Strukturen erfolgte sowohl an braunem als auch an grünem Kallus. An keinem der Explantate der Kultur im Hell/Dunkelrhythmus wurde die Entstehung solcher Strukturen beobachtet.



**Abbildung 2-62: Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' mit grünen Strukturen nach der ersten bzw. nach der zweiten (B) vierwöchigen Kulturpassage auf Medium M (Versuch sE 8)**

A - nach der ersten vierwöchigen Kulturpassage auf Medium M

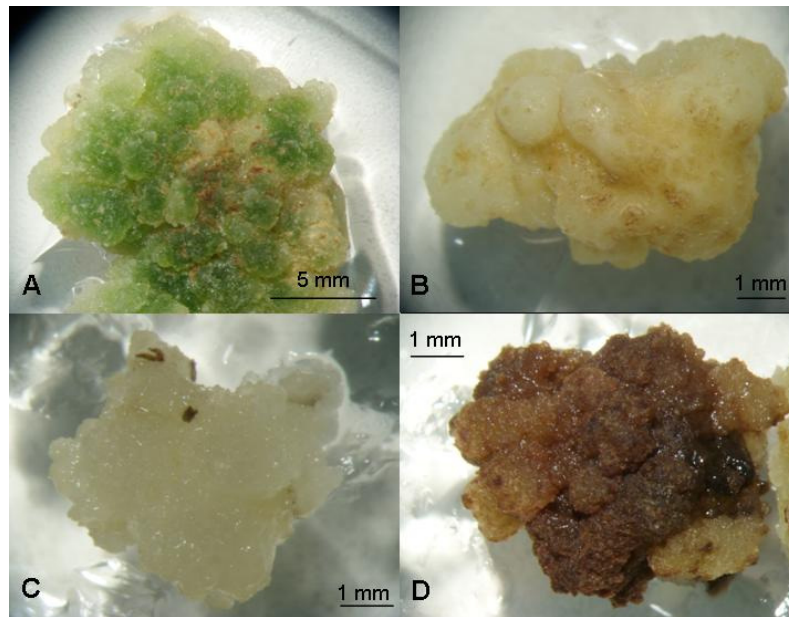
B - nach der zweiten vierwöchigen Kulturpassage auf Medium M

(Pfeil verweist auf grüne kugelförmige Struktur an der Schnittstelle des Explantats)

Während der weiteren Kultur der Explantate, die ausschließlich im Hell/Dunkelrhythmus und auf Medium N (0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l IAA) stattfand, verfärbten sich alle Explantate sowie der Kallus und die vorher grünen Strukturen braun. Eine Differenzierung konnte nicht beobachtet werden. Dieser Versuch wurde nach drei weiteren vierwöchigen Kulturpassagen beendet.

Versuch sE 9:

Drei Monate nach der Präparation von Fruchtknoten der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' bildeten sich an einigen Plazentastücken unterschiedliche Arten von Kallus. An einigen Präparaten bildete sich eine Mischung aus grünem festen und etwas weicherem weißlich, durchscheinenden Kallus (Abbildung 2-63 A). Neben einem sehr harten kaum strukturierten weißlichen Kallus wurde ein ebenfalls weißer weicherer Kallus gebildet (Abbildung 2-63 B und C). Weiterhin wurde ein brauner Kallus beobachtet (Abbildung 2-63 D).



**Abbildung 2-63:** Verschiedene Kallusarten, die sich nach dreiwöchiger Kultur an Plazentateilen der Sorten *H. macrophylla* 'Adria' gebildet haben (Versuch sE 9)

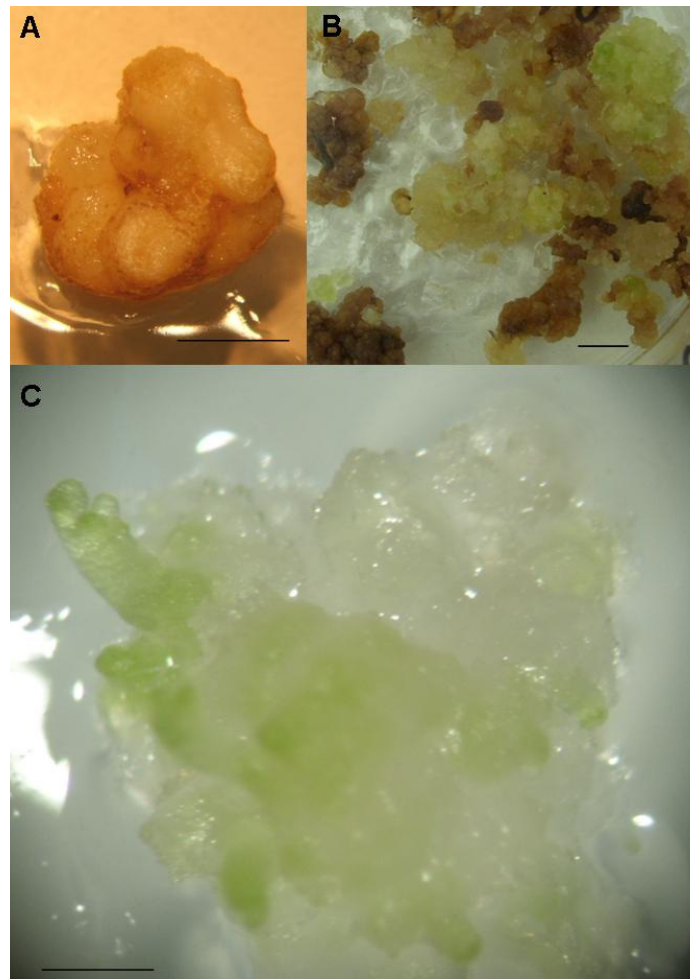
- A-grüner fester Kallus
- B-harter weißer Kallus
- C-weißer weicher Kallus
- D-brauner Kallus

Von allen beobachteten Kallusarten wurde jeweils ein Teil auf Medium Q (2 mg/l 2iP), auf Medium R (2 mg/l Zeatin) bzw. Medium S (2 mg/l TDZ) überführt und auf diesem subkultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Kallus auf Medium T, das keine Wachstumsregulatoren enthielt, überführt, um so die Differenzierung von somatischen Embryonen zu realisieren.

Durch die Subkultur auf den Medien Q, R und S konnten sowohl der weißliche weiche als auch der weißliche feste Kallus und der braune Kallus für bis zu 24 Monate erhalten werden (Abbildung 2-64 A und B). Der grüne feste Kallus verfärbte sich im Verlauf der Kultur braun.

Die Bildung von Spross bzw. blattähnlichen Strukturen wurde in einem Fall nach insgesamt 15 Monaten Kultur und zwei Wochen nach Überführung auf Medium ohne Wachstumsregulatoren, an weißlich durchsichtigem, weichem Kallus beobachtet (Abbildung 2-64 C). Diese Strukturen wiesen keine Verbindung zum parentalen Gewebe auf und konnten daher leicht von diesem abgetrennt werden. Während der weiteren Kultur auf Medium ohne Wachstumsregulatoren konnte jedoch keine Weiterentwicklung beobachtet werden. Der Kallus und die gebildeten Organe starben im weiteren Verlauf ab.





**Abbildung 2-64: Verschiedene Kallusarten nach 15 monatiger Kultur (Versuch 9)**

A - Kultur auf Medium mit 1 mg/l TDZ

B - Kultur auf Medium mit 2 mg/l Zeatin

C - beginnende Differenzierung nach Überführung auf Medium ohne Wachstumsregulatoren  
(Balken entsprechen 5 mm)

#### Zusammenfassung der Versuche zur Regeneration über somatische Embryogenese

Zur Induktion von somatischen Embryonen wurden verschieden Explantattypen, verschiedene Wachstumsregulatoren in verschiedensten Kombinationen und Konzentrationen sowie die Kultur im Dauerdunkel und im Hell/Dunkelrhythmus getestet. Trotz dieser vielfältigen Ansätze ist die nachgewiesene Regeneration von Pflanzen über somatische Embryogenese nicht gelungen. Ein vielversprechender Ansatz zeigte sich jedoch im letzten Versuch, bei dem Differenzierung an Kallus, der an Plazentateilen gebildet worden ist, beobachtet werden konnte.

## 2.3 Diskussion

### 2.3.1 Etablierung von *Hydrangea*-Arten in vitro

Zum Aufbau von In-vitro-Sprosskulturen wurden *Hydrangea*-Arten und Sorten in vitro etabliert. Beim Vergleich des Etablierungserfolges von Axillar- und Apikalknospen der Sorte *H. macrophylla* 'Sensation 75' konnte kein Unterschied festgestellt werden (Tabelle 2-20). Der Etablierungserfolg und die Kontaminationsraten bei Pflanzen der Art *H. macrophylla* waren stark sortenabhängig. Mit Etablierungserfolgen von 20 bis 42 % konnten die Sorten *H. macrophylla* 'Libelle', 'Adria' und 'Blaumeise' in vitro etabliert werden. Die Präparation von Explantaten der Art *H. arborescens* 'Annabelle' war äußerst erfolgreich. Mehr als die Hälfte der Explantate bildete Sprosse. Die Etablierung der Sorte 'Sensation 75' war aufgrund der hohen Absterberate (58 %) und aufgrund der Ausfälle durch Auftreten von Mikroorganismen an 33 % der Explantate schwierig (Tabelle 2-20). Außerdem wuchsen die etablierten Sprosse im Vergleich mit den übrigen Sorten sehr langsam. Die Etablierung der Sorte 'Doris' gelang trotz Präparationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Jahresverlauf nicht (Abbildung 2-8). Aufgrund der hohen Absterbe- und Kontaminationsraten ist hier eine Veränderung der Oberflächensterilisation bzw. der Nährmedienzusammensetzung anzuraten. BAILEY ET AL. (1986) nutzten beispielsweise für die Etablierung von *H. macrophylla* 'Rose Supreme' statt des in der vorliegenden Arbeit verwendeten MS-Mediums ein Medium nach LLOYD UND MCCOWN (1980). Eine weitere Möglichkeit bei Kontaminationen, die nach der Sprossbildung sichtbar werden, wäre eine erneute Präparation der In-vitro-Sprossspitzen. STOLTZ (1984) konnte durch die Kultur von 0,1 bis 0,5 cm großen Explantaten, die von kontaminierten In-vitro-Pflanzen der Sorte *H. macrophylla* 'Merveille' präpariert wurden, einen In-vitro-Pflanzenbestand schaffen, der frei von sichtbaren Kontaminationen war. Ein wichtiger Einflussfaktor bei der erfolgreichen Etablierung von Sprossen unter Verwendung von Sprossspitzen ist die Größe der präparierten Explantate (PIERIK, 1997). Es wird der Zusammenhang zwischen steigender Explantatgröße und größerer Überlebensrate sowie der Zusammenhang zwischen einer kleineren Explantatgröße und größerer Chance auf Sterilität des Explantats beschrieben. In den eigenen Untersuchungen konnte jedoch für die untersuchten Sorten und Explantatgrößen kein Zusammenhang festgestellt werden (Abbildung 2-9, Abbildung A 1 bis Abbildung A 5).

Während der Genotyp einen großen Einfluss auf den Etablierungserfolg hatte, war der Einfluss des Mediums sekundär. Dies konnte auch in der im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreuten Diplomarbeit von GRAF (2008) gezeigt werden. Für die Etablierung von



*H. quercifolia* 'Pee Wee' und *H. paniculata* 'Unique' wurden drei Nährmedien getestet. Die Etablierung der beiden Arten erfolgte sehr erfolgreich mit Etablierungsraten von über 70 % und unabhängig vom verwendeten Medium.

### 2.3.2 Axillare Sprossvermehrung

In den Versuchen zur Sprossvermehrung wurden die Nährsalzzusammensetzungen ebenso wie die Wachstumsregulatoren, die Eisenform, das Verfestigungsmittel sowie die Kulturmethode variiert.

Im Gegensatz zu BAILEY ET AL. (1986), die bei Vermehrungsversuchen mit *H. macrophylla* 'Rose Supreme' beim Vergleich von MS-, B5- und WPM-Medien keinen Einfluss auf die Vermehrung feststellen konnten, wurden in der vorliegenden Arbeit die höchsten Vermehrungsraten bei allen untersuchten Sorten der Art *H. macrophylla* auf MS-Medien erzielt (Kapitel 2.1.5.1). Während BAILEY ET AL. (1986) eine deutliche größere Sprosstreckung bei Kultur auf B5-Medium feststellten, war in den eigenen Untersuchungen die Sprosslänge bei Kultur auf den MS-Medien höher (Kapitel 2.1.5.1). Ebenfalls war die Qualität der Pflanzen, insbesondere die Grünfärbung der Blätter, auf den MS-Medien besser (Abbildung 2-12). Ein Hauptunterschied zwischen beiden Medien sind die unterschiedlichen Stickstoffgehalte und -formen. MS-Medium enthält sowohl mehr Ammonium (20,6 mM) als auch mehr Nitrat (39,4 mM) als das B5-Medium (2 mM Ammonium und 24,7 mM Nitrat). Der höhere Ammoniumgehalt, könnte eine Ursache für die bessere Vermehrung und bessere Pflanzenqualität auf MS-Medium sein. Obwohl laut JANSEN ET AL. (1998) Stickstoffmangel zu Blattchlorosen und verminderter Seitentriebbildung führen kann, wird der verminderte Gehalt an Gesamtstickstoff jedoch nicht als Ursache vermutet, da der Stickstoffgehalt in MS-Medium mit halber Nährstoffkonzentration ebenfalls wie in dem B5-Medium halbiert war, jedoch die Pflanzen auf diesen Medien ebenfalls eine gute Qualität hatten. Vielmehr scheint das Verhältnis zwischen Ammonium und Nitrat ausschlaggebend zu sein. Versuche mit beiden Medien, die jedoch das Ammonium/Nitrat-Verhältnis des jeweils anderen Mediums haben, könnten hier Aufschluss geben.

Die Art und Konzentration der Wachstumsregulatoren waren weitere wichtige Faktoren, die es zu untersuchen galt. Neben den beiden synthetischen Cytokininen BAP und Kinetin wurde meta-Topolin, das in seiner Wirkung ähnlich der von Cytokininen ist, verwendet. BAP ist ein stark wirksames Cytokinin und wurde in einer geringen (0,05 mg/l) und einer höheren (0,2 mg/l) Konzentration getestet. Die beiden anderen Wachstumsregulatoren wurden in der Konzentration von 1 mg/l verwendet. Für die vier untersuchten *H.*

*macrophylla* Sorten war die Verwendung von 0,2 mg/l BAP am geeignetsten. In der Mehrzahl der Untersuchungen wurden auf diesem Medium die meisten Seitensprosse gebildet (Kapitel 2.1.5.2). Auch bei den Vermehrungsversuchen von BAILEY ET AL. (1986), bei denen Sprosse von *H. macrophylla* 'Rose Supreme' auf WPM-Medium mit den Cytokinen BAP und 2iP kultiviert wurden, konnten bessere Ergebnisse bei Verwendung von BAP erzielt werden. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden fünf Konzentrationen getestet (2, 4, 8, 16 und 32  $\mu$ M). Die geringste von BAILEY ET AL. (1986) getestete Konzentration von 2  $\mu$ M entspricht ca. 0,46 mg/l und ist damit mehr als doppelt so hoch als die höchste, eigene getestete Konzentration. Die von BAILEY ET AL. (1986) identifizierte Konzentration, bei der die höchsten Vermehrungsraten erzielt wurden, lag sogar noch höher bei 8  $\mu$ M (entspricht ca. 1,8 mg/l). Entscheidend für die Wachstumsprozesse in der Pflanze sind jedoch nicht nur die exogen applizierten Cytokine, sondern es spielt insbesondere das Verhältnis zwischen Cytokinen und Auxinen eine große Rolle. Häufig wird eine geringe Konzentration an Auxin im Vermehrungsmedium verwendet. Untersuchungen hierzu führte STOLTZ (1984) mit der Sorte *H. macrophylla* 'Merveille' durch. Er kultivierte Sprosse auf MS-Medium mit vier verschiedenen Konzentrationen von BAP (0,2; 0,5; 1 und 5 mg/l) jeweils mit und ohne Zugabe von 0,2 mg/l NAA. NAA hatte keinen Einfluss auf die Vermehrung. Ein linearer Zusammenhang war jedoch zwischen der BAP-Konzentration und der Sprossproduktion feststellbar. Die meisten Sprosse konnten bei Verwendung von 5 mg/l BAP geerntet werden. Jedoch bildeten Sprosse auf diesem Medium sehr viel Kallus, so dass weitere Versuche unter Verwendung von 1 mg/l durchgeführt wurden (STOLTZ 1984). WERBROUCK ET AL. (1995) untersuchten bei *Spatiphyllum* die Aufnahme von BAP und dessen Umsetzung in 9- $\beta$ -Ribofuranosyl-Benzyladenin und 9- $\beta$ -Glucopyranosyl-Benzyladenin. Letztgenanntes war in der Pflanze sehr stabil und konnte noch nach einer Akklimatisationsperiode von neun Wochen nachgewiesen werden. Die ebenfalls beobachtete Hemmung der Wurzelbildung über einen Zeitraum von mehr als zwei Monaten wird auf die inhibitorische Wirkung von 9G-BA direkt oder nach erfolgter langsamer Umwandlung zu BAP auf dessen Wirkung zurückgeführt. Bei der Auswahl der BAP Konzentration sollte daher beachtet werden, dass BAP in der Pflanze gespeichert wird und die Wirkung auch nach einem Medienwechsel auf BAP-freies Medium noch anhalten kann, was jedoch unter Umständen nicht gewünscht ist.

Sprosse der in vitro etablierten Art *H. aborescens* 'Annabelle' zeigten bei Kultur auf MS-Medium mit 0,2 mg/l BAP keine Bildung von Seitensprossen. Verschiedene Untersuch-

ungen mit dem Gibberellinbiosynthesehemmer Flurprimidol zeigten einen positiven Einfluss auf die Verzweigung von z. B. *Dianthus* (POBUDKIEWICZ UND NOWAK, 1994). Ein fördernder Effekt auf die Seitensprossbildung bei *H. aborescens* 'Annabelle' konnte in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht gezeigt werden. Bei Zugabe von 0,5 mg/l Flurprimidol konnte lediglich eine deutliche Reduktion des Längenwachstums beobachtet werden (Abbildung 2-19). Dies beweist die hemmende Wirkung der verwendeten Konzentration auf die Gibberellinbiosynthese. Möglicherweise kann durch eine Erhöhung der Konzentration die Seitensprossbildung induziert werden.

Im Verlauf der Pflanzenkultur traten vermehrt Pflanzen mit deutlich aufgehellten Blättern auf. Durch den Austausch der Eisenchelatform (Fe-EDDHA anstelle von Fe-Na-EDTA) konnte dieses Problem eliminiert werden (Abbildung 2-21). Die Verdopplung der Eisenkonzentration 200  $\mu\text{M}$  war noch geeigneter als die Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Zusätzlich zu der Beseitigung der chlorotischen Blätter waren die Sprosse länger, so dass die Vermehrungsrate, durch die Möglichkeit In-vitro-Basisstecklinge zu ernten, erhöht werden konnte. In der Literatur zur In-vitro-Kultur von *Hydrangea* gibt es keine Berichte über den Austausch der Eisenform während dies für andere Arten bereits beschrieben ist. VAN DER SALM ET AL. (1994) kultivierten Sprosse von *Rosa hybrida* 'Moneyway' auf Medien mit Fe-EDTA bzw. Fe-EDDHA und vermuteten als Ursache für das Ausbleiben von Chlorosen auf letzterem Medium die größere Photostabilität von Fe-EDDHA und damit die bessere Verfügbarkeit des Eisens für die Pflanze.

Durch den Austausch des Verfestigungsmittels konnte die Pflanzenqualität weiter gesteigert werden. Die eingerollten Blattränder, die bei Kultur auf Medium mit 8 g/l Plant Agar auftraten, wurden nicht beobachtet, wenn dem Medium 3,8 g/l Gelrite zur Verfestigung beigelegt wurden (Abbildung 2-23). Die unterschiedliche Festigkeit des Mediums führte vermutlich zu einer besseren Wasserverfügbarkeit bei Verfestigung mit Gelrite. Ebenso wird vermutet, dass die Nährstoffe und die Wachstumsregulatoren aufgrund der strukturellen und biochemischen Unterschiede zwischen beiden Medienvarianten bei Verwendung von Gelrite besser verfügbar waren als bei Verwendung von Plant Agar. Dies wäre eine Erklärung für die erhöhte Vermehrungsrate sowie für die gesteigerte Sprosslänge, die auf diesem Medium beobachtet wurden (Abbildung 2-24). BAILEY ET AL. (1986) konnten bei der Kultur von *H. macrophylla* 'Rose Supreme' auf Medien mit 2 g/l Gelrite bzw. 6 g/l Sigma Agar keinen Einfluss auf die Vermehrungsrate, jedoch auf die Sprosslänge und das Frischgewicht feststellen. Beide waren auf mit Gelrite verfestigten Medien höher. Das von BAILEY ET AL. (1986) beschriebene Auftreten von

Hyperhydrität im Verlauf der Pflanzenkultur auf Medien mit Gelrite konnte in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Einfluss auf das Auftreten von Hyperhydrität haben jedoch auch andere Faktoren wie z. B. die Belüftung der Gefäße, eine Kühlung der Regalböden sowie die Konzentration von Gelrite.

Neben der Kultur auf verfestigten Medien wurde die Kultur in flüssigen Medien getestet. Im ersten Schritt wurden hierfür die temporäre Immersion mit der permanenten Immersion und der Kultur auf Festmedium verglichen. Für die temporäre Immersion, bei der das Pflanzenmaterial zeitweise vom Medium umspült wird (Abbildung 2-3), wurden zusätzlich verschiedene Flutungshäufigkeiten untersucht. Eine deutliche Steigerung der Vermehrungsraten konnte durch die Kultur der Pflanzen in permanenter Immersion, bei der sich die Pflanzen durchgängig in flüssigem Medium auf einem Schüttler befinden, erreicht werden (Abbildung 2-25). Jedoch waren diese Sprosse aufgrund von Blattvergilbungen und Hyperhydrität von deutlich geringerer Qualität (Abbildung 2-26). Ebenfalls eine Steigerung der Vermehrung, wenn auch in etwas geringerem Umfang als bei Kultur in permanenter Immersion jedoch bei sehr guter Pflanzenqualität, konnte bei einer viermal täglichen Flutung der Pflanzen für vier Minuten erzielt werden. Die weiteren untersuchten Kulturvarianten der temporären Immersion lagen deutlich unter dieser Vermehrungsrate (Abbildung 2-25).

Anschließend sollte untersucht werden, ob die bisher erzielten guten Ergebnisse bei Kultur in temporärer Immersion auch eine Axillarsprossvermehrung der Art *H. arborescens* 'Annabelle' ermöglichen, die bisher nicht erreicht werden konnte. Zu diesem Zweck wurde die Kultur auf verfestigtem Medium mit der Kultur, bei der viermal täglich für vier Minuten geflutet wurde, verglichen. Kamen in den oben beschriebenen Versuchen zur Kulturmethode ausschließlich In-vitro-Kopfstecklinge zur Anwendung, so wurden in diesem Versuch zusätzlich In-vitro-Basisstecklinge genutzt. Bei keiner der Versuchsvarianten konnte die Bildung von Axillarsprossen beobachtet werden (Abbildung 2-27). Eine Vermehrung war jedoch durch die Möglichkeit der Ernte von In-vitro-Basisstecklingen von Pflanzen, die in temporärer Immersion kultiviert wurden, aufgrund der gesteigerten Sprosslänge, möglich (Abbildung 2-28). Bei Kultur auf Festmedium ist die Nährstoffaufnahme nur am basalen Teil des Sprosses möglich, wohingegen bei Kultur in permanenter Immersion der gesamte Spross von Medium umgeben ist und somit eine bessere Aufnahme der Nährstoffe gewährleistet ist. Durch den ständigen Medienkontakt ist jedoch die Belüftung des Pflanzenmaterials nicht möglich und es tritt häufig, wie in den eigenen Untersuchungen beobachtet, Hyperhydrität auf. Die Vorteile beider Kul-

turmethode sind bei der Kultur in temporärerer Immersion vereint. Durch das zeitweise Fluten hat der gesamte Spross Zugang zu den Nährstoffen ist aber ebenfalls gut belüftet. Zusätzlich wird die Luft im Gefäß mehrmals täglich erneuert und somit schädliche Gase (z. B. Ethylen) aus dem Kultursystem entfernt.

Die Anwendung des In-vitro-Verfahrens zur Massenvermehrung von *Hydrangea* ist aufgrund der guten vegetativen Vermehrbarkeit von Gewächshauspflanzen nicht sinnvoll. Für den Aufbau eines gesunden Mutterpflanzenbestandes sowie z. B. für die Anwendung in der Mutationszüchtung ist die In-vitro-Kultur jedoch hervorragend geeignet. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte In-vitro-Verfahrenssystem wurde vom Projektpartner (JKI, Quedlinburg) erfolgreich zur raschen Sprossvermehrung nach Mutationsinduktion an Mikrostecklingen durch fraktionierte sowie rekurrente Bestrahlung genutzt.

### 2.3.3 Adventivsprossregeneration

Bei der Regeneration von Adventivsprossen konnten deutliche Unterschiede zwischen den *H. macrophylla* Sorten bzw. zwischen den *Hydrangea* Arten bezüglich der Regenerationsleistung festgestellt werden. Die Kultur von Blattexplantaten der Sorten *H. macrophylla* 'Nachtigall', 'Libelle' und 'Blaumeise' auf Nährmedien, die sich in der Nährsalzzusammensetzung (MS und B5-Medien) und in deren Konzentration (voll- bzw. halbkonzentriert) unterschieden, zeigte sich eine bessere Eignung des B5-Mediums in halber Nährsalzkonzentration (Abbildung 2-32, Abbildung 2-34, Tabelle 2-1). An Blattexplantaten der Sorte 'Adria' wurde Kallusbildung und auf 1/2 B5-Medium Regeneration von Sprossen mit sukkulentem Wuchs (Abbildung 2-33A), jedoch keine Regeneration von Sprosse mit normaler Morphologie beobachtet. Der Hauptunterschied der beiden Nährsalzzusammensetzungen ist wie oben bereits erwähnt der Gesamtstickstoffgehalt bzw. der Gehalt und das Verhältnis der Ionen Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). Das B5-Medium enthält halb soviel Gesamtstickstoff (26 mM) wie das MS-Medium (52 mM). Hauptsächlich ist dies dem stark reduzierten Gehalt an Ammonium geschuldet (2,02 mM gegenüber 20,4 mM). Sowohl der Gesamtstickstoffgehalt als auch das Verhältnis Ammonium und Nitrat im Kulturmedium haben großen Einfluss auf Wachstum und Morphogenese in vitro (GEORGE UND DE KLERK, 2008). So konnten u. a. CABONI ET AL. (1999) zeigen, dass ein reduzierter Ammoniumgehalt des Mediums sich fördernd auf die Adventivsprossregeneration an Blattexplantaten verschiedener Sorten von Wild-

birnen auswirkte. Auch in den eigenen Untersuchungen war die Regeneration auf dem Medium mit dem geringsten Gehalt an Ammonium (1/2 B5-Medium) am besten. Die Pflanze muss Nitrat erst zu Ammonium reduzieren, um es in ihrem Metabolismus nutzen zu können. Theoretisch müsste die Pflanze daher ein höheres Ammoniumangebot im Medium bevorzugen, dies war jedoch nicht der Fall. Als Ursache dafür wird nicht die physiologische Funktion von Ammonium bzw. Nitrat vermutet, sondern der Einfluss der beiden Ionen auf den pH-Wert. Die Aufnahme der positiv geladenen Ammoniumionen führt zur Abgabe von Protonen der Pflanze in das Medium und somit zu einem Absinken des pH-Wertes. Ist der Gehalt an Ammonium im Medium gering und nimmt die Pflanze aufgrund des größeren Angebotes mehr negativ geladene Nitrationen auf, gibt sie Anionen in das Medium ab und der pH-Wert steigt. Bei pH-Messungen am Ende der sechswöchigen Kulturdauer wurden in den B5-Medien immer höhere pH-Werte als in den MS-Medien festgestellt. Ursache für die bessere Eignung der B5-Medien wäre demnach die Bevorzugung eines höheren pH-Wertes im Medium für die Organogenese. Bei den Versuchen zur Vermehrung von *Hydrangea*-Sprossen wurden im Gegensatz zu der Adventivsprossregeneration die MS-Medien als am besten geeignet identifiziert. Entweder ist der pH-Anspruch dann ein anderer oder die Ursachen sind physiologischer Natur (z. B. ein zu niedriger Gehalt an Gesamtstickstoff in den B5-Medien) bzw. ein Zusammenspiel beider Parameter.

Kritisch zur Bestimmung der pH-Werte sollte noch angemerkt werden, dass es keine pH-Messung nach dem Autoklaviervorgang gab. Das heißt, theoretisch besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedlichen gemessenen pH-Werte auf Prozesse während des Autoklavierens zurückzuführen sind und die Kultur der Explantate nicht nur auf Medien unterschiedlicher Zusammensetzung sondern auch auf Medien, die einen unterschiedlichen pH-Wert bereits zu Beginn der Kultur hatten, durchgeführt wurden. Den Einfluss des pH-Wertes könnte man durch Zugabe eines Puffers in das Medium Puffer untersuchen

Die Untersuchungen zum Einfluss der Nährsalzzusammensetzung wurden ausschließlich unter Verwendung der Wachstumsregulatoren BAP (2 mg/l) und NAA (0,1 mg/l) durchgeführt, und erst im anschließenden Schritt fand eine Variation der Wachstumsregulatoren und deren Gehalt statt (Tabelle 2-14). Als Auxin wurde immer 0,1 mg/l NAA verwendet. Die Regeneration an Blattexplantaten der gut regenerierenden Sorten *H. macrophylla* 'Nachtigall' und 'Blaumeise' auf 1/2 B5-Medien, denen entweder BAP (1 bzw. 2 mg/l), TDZ (0,5 bzw. 1 mg/l) oder meta-Topolin (1 bzw. 2 mg/l) zugefügt wurden, war

bei Verwendung von 2 mg/l BAP am erfolgreichsten (Abbildung 2-36, Abbildung 2-44). Für beide Sorten konnten Regenerationsraten von 70 bis 80 % mit ca. 3 Sprossen pro Explantat erzielt werden. Auch die Regenerationsrate der Sorte 'Libelle' war bei Verwendung von 2 mg/l BAP am höchsten, jedoch auf einem deutlich niedrigeren Niveau (32 % und 2,4 Sprosse pro Explantat) (Tabelle 2-37). Bei allen drei Sorten konnte beobachtet werden, dass sich bei beiden BAP-Konzentrationen die Anzahl der Sprosse pro regenerierendem Explantat kaum unterschied. Der Anteil der Explantate, die Regeneration zeigten, jedoch bei Verwendung der höheren Konzentration anstieg. Um die Regenerationsleistung der Sorte 'Libelle' zu steigern, wurden zusätzlich 2iP, Zeatin, Kinetin und die Kombination von BAP, 2iP und Kinetin getestet. Regeneration weniger Sprosse wurde jedoch nur bei Verwendung von BAP beobachtet (Abbildung 2-38). Außerdem kam es zur Bildung von sukkulenten Sprossen (Abbildung 2-37). Die Zugabe von BAP, TDZ, meta-Topolin bzw. Zeatin führte an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' zu Kallusbildung jedoch nicht zur Regeneration von Sprossen. Im Gegensatz zu der Kultur auf Medien mit unterschiedlichen Nährsalzen, bei der stark verwachsene sukkulente Sprosse gebildet wurden, wurde dies in dieser Versuchsreihe nicht beobachtet.

Als Ursache für die wenigen Regenerationsereignisse und dafür, dass es bei der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' zu keiner Bildung von Sprossen bzw. nur zu einer geringen Anzahl von sukkulenten Sprossen kam, wurde vermutet, dass sich der endogene Hormongehalt in den Blättern dieser Sorten von den anderen Sorten stark unterscheidet. Insbesondere wichtig für die Regeneration von Adventivsprossen ist das Verhältnis zwischen Auxin und Cytokinin. Als fördernd wird eine niedrigere Konzentration des Auxins in Kombination mit einer höheren Cytokininkonzentration angesehen. Ist nun der endogene Auxingehalt sehr hoch, so kann dies zu einer Verschiebung des beschriebenen Verhältnisses führen. Dem wurde versucht, mit dem Antiauxin PCIP (8,5 mg/l) entgegenzuwirken. PCIP wirkt, indem es mit Auxin um die Bindungsrezeptoren in der Pflanze konkurriert und dadurch die auxinabhängigen physiologischen Effekte hemmt (MACRAE UND BONNER 1953). Eine weitere Vermutung, warum Sorten schlecht bzw. nicht regenerierten, war ein möglicherweise hoher endogener Gibberellin Gehalt dieser Sorten. Bei Gabe von Gibberellin ins das Kulturmedium können oft auxinähnliche Effekte beobachtet werden (MOSHKOV ET AL. 2008). So zeigte MURASHIGE (1961), dass die Zugabe von GA<sub>3</sub> in das Medium mit Auxin- und Cytokininkonzentrationen, die normalerweise die Adventivsprossbildung fördern, die Sprossbildung aus Kallus von Tabak inhibierte. Bei

der Annahme, dass Gibberellin, welches endogen in der Pflanze vorhanden ist, ebenso wirkt, könnte die Zugabe eines Gibberellinbiosynthesehemmers die Adventivsprossbildung fördern. Aufgrund dieser Hypothese wurde bei Kultur von Blattexplantaten von *H. macrophylla* 'Adria' dem Medium 0,5 mg/l Flurprimidol hinzugegeben. Bildung von grünem kugelförmigem Kallus konnte an allen Explantaten beobachtet werden. Die Regeneration von Sprossen konnte jedoch, weder durch die Zugabe von PCIB noch durch die Zugabe von Flurprimidol, erzielt werden.

Trotz des fehlenden Erfolges bei der Sorte 'Adria' sollte PCIB bei der Sorte 'Libelle' getestet werden, da es hier häufig zu Bildung von Adventivwurzeln kam (Abbildung 2-39), die sich bei einem verschobenen Auxin/Cytokininverhältnis bilden, und dies die Vermutung auf einen hohen endogenen Auxingehalt nahe legt.

Zusätzlich zu den *H. macrophylla* Sorten wurde die Regeneration von Adventivsprossen an Explantaten von zwei weiteren Arten versucht. Die Kultur von Blattexplantaten der Sorte *H. quercifolia* 'Pee Wee' führte bei allen getesteten Wachstumsregulatoren (MS-Medium mit 0,1 bzw. 1 mg/l TDZ, 2 mg/l BAP sowie 2 mg/l 2iP jeweils in Kombination mit 0,2 mg/l IBA) zu Regenerationsereignissen (Abbildung 2-46). Am besten geeignet war TDZ in einer Konzentration von 1 mg/l wohingegen eine reduzierte TDZ Konzentration von 0,1 mg/l keine Regeneration bewirkte. LEDBETTER UND PREECE (2004) führten ebenfalls Versuche mit *H. quercifolia* 'Pee Wee' durch und testeten fünf Konzentration (0,05, 0,1, 0,5, 1 und 5  $\mu\text{M}$ ) von TDZ in Kombination mit IBA (1  $\mu\text{M}$ ). Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen konnten die Autoren auch bei Konzentration die deutlich unter 0,1 mg/l ( $\sim 0,5 \mu\text{M}$ ) lagen, die Regeneration von Adventivsprossen beobachten. Weiterhin konnten sie feststellen, dass geringere Konzentrationen zu einer geringeren Anzahl Sprosse größerer Länge und steigende Konzentrationen zu einer größeren Anzahl Sprosse, die jedoch kürzer waren, führten.

Von der Art *H. arborescens* 'Annabelle' wurden sowohl Blatt- als auch Stängel explantate verwendet. Zum einen wurden die Medien getestet, bei deren Verwendung gute Regenerationsergebnisse mit *H. macrophylla* 'Blaumeise' und 'Nachtigall' (1/2 B5-Medium mit 2 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA) erzielt wurden, zum anderen das Medium nach LEDBETTER UND PREECE (2004) (MS-Medium mit der Konzentration von 0,1 bzw. 1 mg/l TDZ, jeweils in Kombination mit 0,2 mg/l IBA). An Explantaten von *H. arborescens* 'Annabelle' wurde Kallusbildung jedoch nicht die Regeneration von Sprossen beobachtet. In der Diplomarbeit von GRAF (2008) wurde ebenfalls der Einfluss von PCIB



und Flurprimidol auf die Regeneration von *H. arborescens* 'Annabelle' getestet, ebenfalls jedoch ohne Erfolg.

Die Untersuchungen zur Kohlenhydratquelle führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Bei Kultur von Explantaten der Sorte 'Libelle' konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Varianten festgestellt werden (Abbildung 2-47). Durch Verwendung von 30 g/l Saccharose wurde an einem etwas höheren Anteil an Explantaten (32 %) Sprosse gebildet als bei den anderen Varianten. Diese Rate war jedoch auf ähnlichem Niveau, wie die Raten aus den vorhergegangenen Versuchen. In diesen Versuchen wurde 10 g/l Saccharose in Kombination mit 15 g/l Glukose verwendet. Ein direkter Vergleich mit dieser Variante fand jedoch nicht statt. Bei der Sorte 'Blaumeise' variierten die Ergebnisse stark zwischen den Versuchsdurchgängen (Abbildung 2-48, Abbildung 2-49).

Das Auftreten von Variationen zwischen Versuchswiederholungen ist ein häufiges Problem bei Regenerationsstudien. So können die Unterschiede zwischen den Versuchsdurchgängen auf den Autoklaviervorgang zurückgeführt werden. Bei diesem kann sich beispielsweise der pH-Wert durch z. B. Hydrolyse der Zucker ändern. Der Abbau ist bei jedem Autoklaviervorgang unterschiedlich und kann so Ursache für die großen Variationen der Ergebnisse der Sorte 'Blaumeise', die vermutlich besonders empfindlich reagiert, sein.

In der Literatur lässt sich nur ein Bericht über die Adventivsprossregeneration bei *H. macrophylla* Sorten finden. BOCCON-GIBBOD ET AL. (2000) verwendeten die drei Sorten 'Blaumeise', 'Messalina' und 'Red Baron'. Als Explantate dienten Internodien (2 und 4 mm lang) und die Blattbasis mit Blattstiel. Die Autoren nutzten zwei Regenerationsysteme, zum einen die direkte und zum anderen die indirekte Regeneration. Untersucht wurde der Einfluss der Kohlenhydratquelle (Saccharose, Maltose, Fructose, Glukose und Sorbitol, jeweils in einer Konzentration von 55 oder 110 mM) auf die direkte Organogenese. Festgestellt wurde, dass bei Verwendung von Blattbasisexplantaten Maltose (55 mM und 110 mM) und Saccharose (110 mM) und bei Verwendung von Internodienexplantaten ebenfalls Maltose in beiden Konzentration und Glukose (110 mM) zu den besten Ergebnissen führten. Indirekte Organogenese wurde durch einen Medienwechsel realisiert. Für die Kallusbildung wurde B5-Medium mit 20 g/l Saccharose, 2,45 µM 2,4-D und 0,8 µM BAP, 0,625 g/l Gelrite in Kombination mit 2,5 g/l Sobigel verwendet. Die anschließende Organogenese wurde durch einen Wechsel auf Medium gleicher Zusammensetzung jedoch mit veränderten Wachstumsregulatoren (0,425 µM 2,4-D und 8 µM

BAP) realisiert. Als am besten geeignete Explantatart wurden 4 mm lange Internodien beschrieben und wie in den eigenen Untersuchungen waren die Regenerationsleistungen der untersuchten Sorten sehr unterschiedlich. Explantate der Sorten 'Blaumeise' und 'Messalina' regenerierten zu einem höheren Anteil (75 bzw. 65 %) als die Explantate der Sorte 'Red Baron' (28 %).

Bei Verwendung von Blattexplantaten der Sorte 'Adria' wurde an einem geringen Anteil der Explantate die Bildung von sukkulenten Sprossen (ausschließlich auf 1/2 B5-Medium) (Abbildung 2-33), jedoch keine Regeneration von „normalen“ Sprossen beobachtet. Kallus wurde auf allen Medien an der Mehrzahl der Explantate gebildet. Die fehlende Sprossbildung könnte darauf zurückzuführen sein, dass der gebildete Kallus nicht kompetent für Organogenese ist. Da er aber ähnlich dem Kallus an Blattexplantaten der Sorten, die gut regenerierten, war, wird vielmehr vermutet, dass für die Organogenese nicht die richtigen Stimuli gegeben waren. Häufig wird bei Regenerationsstudien für die Kallusinduktion ein Nährmedium anderer Zusammensetzung (insbesondere bezüglich der Wachstumsregulatoren, aber auch bezüglich der Kohlenhydratquelle) als für die Sprossregeneration verwendet. Ein Medienwechsel nach Kallusbildung sollte bei der Sorte 'Adria' wie auch bei *H. arborescens* 'Annabelle', bei denen keine erfolgreiche Sprossregeneration beobachtet wurde, getestet werden.

Hauptsächlich wurden Versuche mit Blattexplantaten durchgeführt. Die Einbeziehung anderer Explantattypen wie z. B. Internodienexplantaten könnte eine Steigerung der Regenerationsleistung bzw. bei nicht regenerierenden Sorten Regenerationsereignisse bewirken.

Der genotypische Einfluss auf die Regeneration ist typisch für verholzende Gewächse (z. B. bei *Prunus*: MATT UND JEHLE, 2005; TANG, 2002; DECLERCK UND KORBAN, 1996) und war auch in der vorliegenden Arbeit sichtbar. Das für die Sorten *H. macrophylla* 'Nachtigall' und 'Blaumeise' sowie *H. quercifolia* 'Pee Wee' erfolgreich entwickelte Regenerationsprotokoll wurde vom Kooperationspartner, dem Julius-Kühn-Institut in Quedlinburg, in Versuchen zur Mutationsinduktion und Polyploidisierung erfolgreich angewendet. Es war ebenfalls Grundlage der im Rahmen der vorliegenden Arbeit betreuten Diplomarbeit von KÜBLER (2008), die die Auswirkung von Röntgenbestrahlung auf die Regeneration verschiedener Genotypen von *H. macrophylla* untersucht hat.

### 2.3.4 Regeneration über somatische Embryogenese

Die somatische Embryogenese ist eine Form der asexuellen Vermehrung von Pflanzen. Hierbei bildet sich aus einer Einzelzelle eine bipolare Struktur, die eine embryonale Entwicklung durchläuft, jedoch nicht aus der Fusion von Gameten entstanden ist. Im Gegensatz zu Adventivsprossen besteht keine vaskuläre Verbindung zum parentalen Gewebe und somatische Embryonen besitzen sowohl einen Spross- als auch einen Wurzelpol. Es wird zwischen zwei Arten von somatischer Embryogenese unterschieden. Zum einen die direkte Embryogenese, bei der die Embryobildung direkt am Explantat geschieht, und zum anderen die indirekte Embryogenese, bei der zuvor die Bildung von Kallus und anschließend von somatischen Embryonen passiert. Durch die direkte Bildung von somatischen Embryonen ist die Bildung von genetisch identischen Pflanzen realisierbar, dies ist insbesondere für die massenweise Verklonung von Nutzen. Durch die Kallusphase der indirekten Embryogenese kann es zu genetischen Veränderungen kommen, die bei der Massenvermehrung unerwünscht sind, jedoch für die züchterische Bearbeitung durchaus Potential aufweisen können. Neben den bereits erwähnten Anwendungsmöglichkeiten der somatischer Embryogenese bei der Massenvermehrung und in der Pflanzenzüchtung ist auch der Einsatz dieses Regenerationssystems bei Transformationsexperimenten oder auch bei Versuchen zu Mutationsinduktion höchst vielversprechend, da die Regeneration in der Regel aus Einzelzellen geschieht und somit die Bildung von unerwünschten Chimären nach Transformation bzw. Mutationsbehandlung ausbleibt. Aufgrund der Ähnlichkeiten bei der Entwicklung von zygotischen und somatischen Embryonen kann die somatische Embryogenese ebenfalls als Modell zur Untersuchung der Embryonalentwicklung genutzt werden. Die diversen genannten und weiteren Möglichkeiten zur Nutzung der somatischen Embryogenese, machen dieses System selbstverständlich auch bei *Hydrangea* interessant. Bisher gibt es jedoch keine Berichte über Untersuchungen zu diesem Regenerationsweg an dieser Art.

Untersuchungen an anderen Pflanzen haben gezeigt, dass nicht alle Genotypen einer Art die Kompetenz besitzen, somatische Embryonen zu bilden. Neben der Identifikation eines geeigneten Genotyps ist auch die Wahl der Explantatart von großer Bedeutung. Während bei *Daucus carota* die Regeneration somatischer Embryonen an fast jedem Pflanzenteil möglich ist (JIMÉNEZ ET AL. 2005, FEHER 2005), ist dies bei *Capsicum annuum* L. nur an Antheren und unreifen zygotischen Embryonen sowie an Kallus, der sich an zygotischen Embryonen gebildet hat, gelungen (KOLEVA-GUDEVA ET AL. 2007). In der Regel haben Pflanzenteile embryogenen bzw. meristematischen Ursprungs

(beispielsweise Teile der Blüten oder zygotische Embryonen) bzw. physiologisch junge Pflanzenteile eine höhere Kompetenz somatische Embryonen zu bilden als z. B. Blätter oder Wurzeln (FEHER 2005, *Cyclamen*: WINKELMANN ET AL. 2000). In den eigenen Untersuchungen wurden hauptsächlich Blattexplantate verwendet. Es kamen aber auch Blütenböden sowie verschiedene Arten von Kallus, die sich nach der Präparation von Fruchtknoten an Plazentateilen gebildet hatten, zum Einsatz. Die Bildung von hellem, weißlichem, kugeligem bzw. grünem, kugeligem Kallus wurde sowohl an Blatt- als auch an den Blütenbodenexplantaten beobachtet. Differenzierung konnte jedoch nicht festgestellt werden. An den kultivierten Plazentateilen bildeten sich verschiedene Kallusarten (Abbildung 2-63). Von diesen Kallusarten schien der weiße weiche kugelförmige Kallus embryogen kompetent zu sein, da hier Differenzierungsvorgänge beobachtet werden konnten (Abbildung 2-64 C). Die weitere Entwicklung konnte jedoch aufgrund des Absterbens des Explantats und der gebildeten Organe nicht beobachtet werden.

Eine Ursache für die embryogene Kompetenz von Explantaten scheint der endogene Hormongehalt zu sein. Untersuchungen bei denen embryogene mit nicht embryogenen Explantaten desselben Genotyps als auch gleiche Explantatarten von embryogenen bzw. nicht embryogenen Genotypen untersucht wurden, zeigten deutliche Unterschiede im endogenen Hormongehalt. KOPERTEKH UND BUTENKO (1995) wiesen in kompetenten zygotischen Embryonen von Weizen einen höheren Gehalt an IAA und ABA und einen niedrigeren Cytokiningehalt nach als in nicht kompetenten zygotischen Embryonen. Als wichtigstes Hormon bei der Induktion somatischer Embryonen *in vitro* wird Auxin vermutet (COOKE ET AL. 1993, DUDITS ET AL. 1995). Die Kultur erfolgt daher häufig auf Medien, denen 2,4-D beigefügt wird. Die Zugabe von 2,4-D ins Medium führt zu einer verstärkten Synthese von endogenem IAA in embryogen kompetenten Zellen. Der entstehende Auxingradient in den Zellen wird als Ursache für die Induktion somatischer Embryonen vermutet (FEHER ET AL. 2003). Eine weitere Hypothese ist die Wirkung von 2,4-D als Stressor, der zur Bildung somatischer Embryonen führt (FEHER ET AL. 2003). Es wird davon ausgegangen, dass die embryogene Kompetenz von Zellen durch eine Veränderung des genomischen Programms in Folge von DNA-Methylierung erzielt wird (KARAMI UND SAIDI 2009). Das Auftreten von DNA-Methylierung in Verbindung mit embryogener Kompetenz von Zellen in Anwesenheit von 2,4-D wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (*Daucus carota*: SCHIAVO ET AL. 1989, *Glycine max*: YOON ET AL. 1997, *Curcubita pepo*: LELJAK-LEVANIC et al. 2004).

In vielen Untersuchungen zeigte sich, dass sich neben dem Auxin eine zusätzliche geringere Cytokininkonzentration während der Induktionsphase förderlich auf die Bildung somatischer Embryonen auswirkt (VON ARNOLD 2008). In der Literatur lassen sich, wenn auch weniger häufig, ebenso Berichte finden, die von der Verwendung von Cytokinin allein zur Induktion somatischer Embryogenese z. B. bei *Begonia gracilis* (CASTILLO UND SMITH 1997) bzw. bei *Oncidium spec.* (CHEN UND CHANG 2001) berichten oder von der Kombination einer höheren Cytokininkonzentration und einer geringeren Auxinkonzentration (MERKLE ET AL. 1995). Nicht unerwähnt sollte jedoch die Tatsache bleiben, dass Cytokinine durchaus auch inhibierend auf die fördernde Wirkung von Auxin wirken können (LAKSHMANAN UND TAJI 2000). Jedoch ist Auxin nicht bei allen Pflanzen für die Bildung von somatischen Embryonen förderlich. DAS ET AL. (1995) beschreiben die inhibierende Wirkung von 2,4-D auf die Bildung von embryogenem Kallus an Explantaten von *Hardwickia binata*.

In den eigenen Untersuchungen wurden diverse Auxin- und Cytokininkombinationen und -konzentrationen getestet (Tabelle 2-17). Der sich entwickelte Kallus, der zumeist hell und kugelig bzw. grün und kugelig war, wurde auf Medien ohne und mit verschiedenen Wachstumsregulatoren weiterkultiviert, jedoch ohne die angestrebte Differenzierung somatischer Embryonen. Einzig der letzte Versuchsansatz bei dem Kallus, der sich an Plazentateilen auf Medium ohne Wachstumsregulatoren gebildet hatte, auf Medien mit einem Cytokinin allein und anschließend ohne Zugabe von Wachstumsregulatoren kultiviert wurde, scheint viel versprechend. Hier konnte die Bildung verschiedener Kallusarten, von denen eine vermutlich embryogen war und Differenzierung zeigte (Abbildung 2-64), beobachtet werden.

Zur Induktion der somatischen Embryogenese bei *Hydrangea* scheinen Blattexplantate wenig erfolg versprechend zu sein. Die Testung weiterer Explantatarten wie z. B. die im letzten Versuch verwendeten Plazentateile oder zygotische Embryonen sollten in anschließenden Untersuchungen verstärkt verwendet werden. Ebenso sollten weitere Genotypen getestet werden. Auch wenn bereits der Faktor Licht als Stressgeber (Kultur im Dauerdunkel) ohne Einfluss auf die somatische Embryogenese bei den hauptsächlich verwendeten Blattexplantaten untersucht wurde, sollte dies auch in weiteren Versuchen im Auge behalten werden, da Stress die endogene Auxinproduktion anregt und oftmals zur erfolgreichen Bildung von somatischen Embryonen führt. Die Induktion somatischer Embryonen an Blatt- und Internodienexplantaten von *Fragaria spec.* wurde bei Dunkelheit durchgeführt und BISWAS ET AL. (2007) zeigten, dass eine Lichtperiode von 6 h die

Bildung von Embryonen reduzierte. Ein weiterer Faktor, den es zu untersuchen gilt, ist die Kohlenhydratquelle sowie die Kohlenhydratkonzentration im Kulturmedium. NAKAGAWA ET AL. (2001) untersuchten den Einfluss von Saccharose und Mannitol sowie von GA<sub>3</sub> auf die Bildung somatischer Embryonen in *Cucumis melo* L. Mannitol allein konnte keine Bildung somatischer Embryonen induzieren. Die Zugabe von 200 mM Saccharose war am erfolgreichsten, wohingegen höhere oder geringere Konzentrationen weniger erfolgreich waren. Die Kombination beider Zucker steigerte die Bildung somatischer Embryonen zusätzlich.

Ein weiterer interessanter Ansatz, ist die Theorie, dass bisher unbekannte lösliche Moleküle eine Signalwirkung bei der pflanzlichen somatischen Embryogenese spielen. So zeigten Versuche bei denen nicht embryogene Zellen auf Kulturmedien, auf denen vorher embryogene Zellen kultiviert wurden, dass es zur Induktion somatischer Embryonen kam (HARI 1980). EGERTSDOTTER UND VON ARNOLD (1998) konnten zeigen, dass eine Endochitinase von Zuckerrübe die frühe Entwicklung von somatischen Embryonen bei *Picea abies* stimulierte.

## 3 Hybridisierungen und Untersuchungen zur Kompatibilität

### 3.1 Material und Methoden

#### 3.1.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen zur Hybridisierung wurden mit den in Tabelle 3-1 beschriebenen und in Abbildung 3-1 dargestellten Pflanzen im Gewächshaus durchgeführt.

Tabelle 3-1: *Hydrangea*-Arten und -Sorten sowie einige Merkmale

Art	Sorte	Blütenfarbe	Blütenform	Wuchstyp	Ploidiestufe
<i>H. macrophylla</i>	'Adria'	Rosa (blau färbbar)	Ball	kompakt	diploid
<i>H. macrophylla</i>	'Libelle'	Weiß	Teller	mittelstark, bis 2 m, leicht überhängende Zweige	diploid
<i>H. macrophylla</i>	'Blaumeise'	Rosa (blau färbbar)	Teller	starkwachsend bis 2m	triploid
<i>H. macrophylla</i>	'Doris'	Rot	Ball	kompakt	diploid
<i>H. arborescens</i>	'Annabelle'	Weiß	Ball	verzweigter Strauch bis 2 m, leicht überhängende Zweige	diploid
<i>H. paniculata</i>	'Unique'	Weiß	Rispe	aufrecht, buschig, bis 2 m	diploid
<i>H. quercifolia</i>	'Pee Wee'	Weiß	Rispe	Strauch bis 2 m	diploid

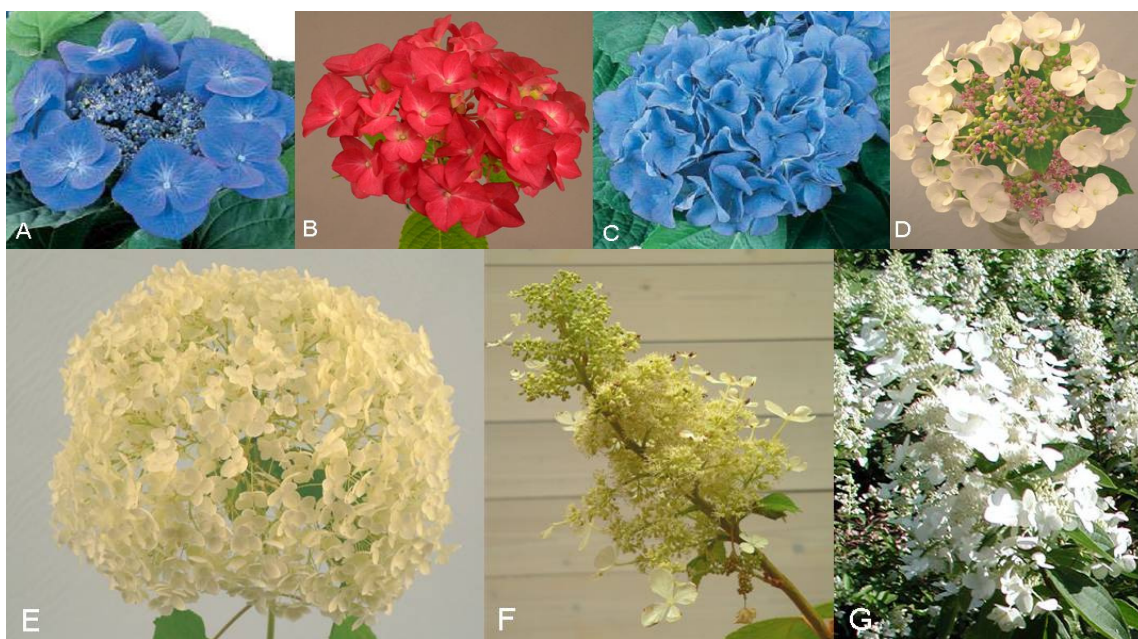


Abbildung 3-1: Blütenstände der verwendeten *Hydrangea*-Arten und -Sorten

A: *H. macrophylla* 'Blaumeise'

B: *H. macrophylla* 'Doris'

C: *H. macrophylla* 'Adria'

D: *H. macrophylla* 'Libelle'

E: *H. arborescens* 'Annabelle'

F: *H. quercifolia* 'Pee Wee'

G: *H. paniculata* 'Unique'

(Quelle Bild A und C: Pellens Katalog 2009, [www.Pellens-Hortensien.de](http://www.Pellens-Hortensien.de))

### 3.1.2 Pollenlagerung, Bestimmung von Pollenvitalität und -keimung in vitro

Frisch geerntete Antheren mit anheftendem Pollen wurde in einer offenen Petrischale über Nacht getrocknet, anschließend in Eppendorfgläser überführt und bei Raumtemperatur (ca. 24 °C), bei 4 °C im Kühlschrank und bei - 18 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Die Bonitur auf Vitalität der Pollen sowie auf dessen Keimfähigkeit in vitro erfolgte während der ersten sechs Monate im Abstand von vier Wochen. Anschließend erfolgte eine Abschlussbonitur 12 Monate nach der Pollenernte. Die Pollenvitalität wurde durch Anfärben der vitalen Pollenkörner mit MTT (Sigma Aldrich) (Diphenyltetrazoliumbromid) festgestellt. Hierfür wurden ca. 15 µl der Färbelösung (Tabelle 3-2) auf einen Objektträger gegeben und es wurden 8 bis 10 Antheren in dieser Lösung geschwenkt, um so die Pollenkörner zu überführen. Nach einer Inkubation von mindestens 10 min erfolgte die Auszählung von vier Sichtfeldern bzw. von mindestens 100 Pollenkörnern unter dem Mikroskop (Leitz, SM Lux). Es erfolgte eine Unterscheidung in nicht vitale Pollen, die keine Färbung zeigten, und in Pollen, der leicht bzw. intensiv purpur gefärbt war, dieser Pollen war vital. Zusätzlich wurden die degenerierten Pollen gezählt, dies waren Pollen deren Oberfläche deutliche Furchungen aufwies (Abbildung 3-4). Zum Nachweis, dass nur vitaler Pollen gefärbt wurde, wurde Pollen aller untersuchten Sorten durch Hitze abgetötet und anschließend mit MTT gefärbt. In keiner der Proben wurde gefärbter Pollen beobachtet.

**Tabelle 3-2: Zusammensetzung der MTT-Färbelösung**

MTT-Färbelösung
1 % MTT
5 % Saccharose

Zur Feststellung der Pollenkeimfähigkeit wurden 8 bis 10 Antheren in ca. 2 ml Wasser gespült und diese Pollensuspension wurde anschließend auf Nährmedium nach FAST PLANTS (1979) (Tabelle 3-3) in 6 cm-Petrischalen ausplattiert. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 24 °C und Dunkelheit inkubiert und am folgenden Tag die Keimraten bestimmt. Hierfür wurden mit Hilfe eines Mikroskops (Leitz, SM Lux) je vier Sichtfelder, mindestens jedoch 100 Pollenkörner ausgezählt. Als gekeimt wurden Pollen gezählt, deren Keimschlauch mindestens so lang wie der Pollendurchmesser war. Die Pollenkeimrate ist der prozentuale Anteil der gekeimten Pollen an der Gesamtzahl der ausgezählten Pollen. Versuche zur Pollenlagerung wurden mit den Sorten *H. macrophylla* 'Blaumeise' und 'Libelle' sowie mit *H. arborescens* 'Annabelle' durchgeführt.



**Tabelle 3-3: Zusammensetzung des Kulturmediums für die Pollenkeimung in vitro (nach FAST PLANTS, 1979)**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	417 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	200 mg/l
KNO <sub>3</sub>	101 mg/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	217 mg/l
Saccharose	410 g/l
Gelrite	2,8 g/l

### **3.1.3 Durchführung der Kreuzungen**

Die Kreuzungsversuche wurden im Frühjahr 2006 sowie 2007 durchgeführt. Die jeweils realisierten Kreuzungskombinationen sowie die Anzahl der bestäubten Einzelblüten sind Tabelle 3-4 zu entnehmen. Zusätzlich wurden Fruchtknoten von unbestäubten Blüten der Sorte 'Libelle' in die Untersuchungen mit aufgenommen, um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob es zur Entwicklung von Samen ohne vorhergehende Befruchtung (Apomixie) kommen kann.

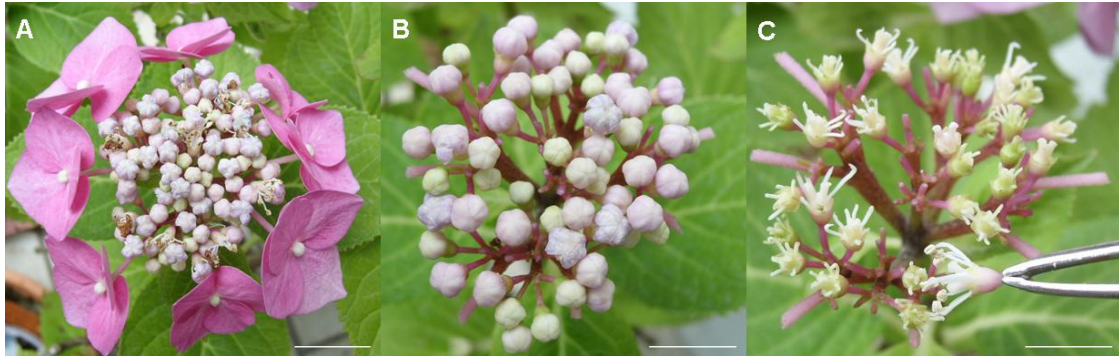
Tabelle 3-4: Anzahl bestäubter Einzelblüten

Mutterpflanze	Pollenspender							
	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	<i>H. quercifolia</i> 'Pee Wee'	<i>H. paniculata</i> 'Unique'	
<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	110			156	165			
<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	213	73		86	50			
<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'			90	72	132		219	
<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	72		159	72	110	257	111	
<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	85				70	25		
<i>H. quercifolia</i> 'Pee Wee'	285				78			
<i>H. paniculata</i> 'Unique'	31				244	181		
	357							335

Im Jahr 2006 durchgeführte Kreuzungen.  
 Im Jahr 2007 durchgeführte Kreuzungen.

Gekreuzt wurde ausschließlich in den Vormittagsstunden zwischen 7 und 14 Uhr. Für die Bestäubung der Infloreszenzen (Abbildung 3-2 A) wurden die äußeren sowie bereits geöffnete und sehr unreife Blüten entfernt (Abbildung 3-2 B). Die Emaskulation erfolgte, indem die Petalen und Antheren entfernt wurden. Die Infloreszenz wurde im Anschluss mit einer feinporigen Plastiktüte versehen. Die Bestäubung der Blüten erfolgte

ein bis drei Tage nach der Kastration mit frischem Pollen des väterlichen Elters, der direkt auf die Narbe aufgetragen wurde (Abbildung 3-2 C). Anschließend wurde die Blüte wieder mit einer feinporigen Plastiktüte versehen.



**Abbildung 3-2: Emaskulation und Bestäubung von *Hydrangea*-Blüten**

Beispielhaft ist nur die Emaskulation und Bestäubung einer Tellerhortensie gezeigt.

A - Blütenstand mit teils geöffneten und geschlossenen Blüten

B - Blütenstand nach Entfernen der äußeren, der unreifen und der bereits geöffneten Blüten

C - Blütenstand nach Emaskulation und beim Auftragen des Pollens auf die Narben

(Balken entsprechen 1 cm)

### **3.1.4 Aussaaten**

Alle nicht für andere Untersuchungen benötigten Samenkapseln wurden an den Pflanzen belassen und im Frühjahr des nächsten Jahres geerntet und die Samen sowohl in vitro als auch in Erde ausgesät.

Für die Aussaat in vitro wurden die Samenkapseln wie folgt oberflächensterilisiert:

- 2 x waschen in 70 % Ethanol (30 s)
- 10 min 3 % NaOCl mit einem Tropfen Tween
- 3 x waschen in sterilem Wasser (1, 2 und 5 min)

Anschließend wurden die Samenkapseln unter sterilen Bedingungen geöffnet und die Samen auf Nährmedium folgender Zusammensetzung (Tabelle 3-5) überführt.

**Tabelle 3-5: Zusammensetzung des Aussaatmediums (entwickelt von Prof. W. Gerlach)**

Substanz	Konzentration
Hefeextrakt	0,5 g/l
Pepton	0,5 g/l
Aktivkohle	1,0 g/l
Gemüsesaft	20 ml/l
Saccharose	5,0 g/l
Thiamin-HCl	2,5 mg/l
Riboflavin	1 mg/l
Nicotinamid	10 mg/l
Plant Agar	8 g/l
pH-Wert	5,8 - 6,0

Die Aussaat ex vitro erfolgte in Aussaaterde in Plastikkulturbechern. Die Bonitur auf Keimung erfolgte wöchentlich.

### **3.1.5 Färbung der Pollenschläuche mit Anilinblau**

In beiden Kreuzungsperioden wurden neben der Keimung in vitro (Kapitel 3.1.2) ebenfalls die Pollenkeimung auf der Narbe und das Einwachsen des Pollenschlauches in den Fruchtknoten untersucht. Hierfür wurden in der Regel im ersten Jahr (2006) 24, 48 und 72 h nach der Bestäubung pro Kreuzungskombination von je drei Infloreszenzen zwei Fruchtblätter geerntet. Im zweiten Jahr wurde auf die Ernte nach 24 h verzichtet und zusätzlich wurden Fruchtblätter nach 96 h geerntet. Die durchgeführten Kreuzungen sowie der Zeitpunkt der Ernte und die Anzahl der Fruchtblätter sind in Tabelle 3-6 aufgeführt. Zum Stoppen des Pollenschlauchwachstums wurden die Fruchtblätter in ein Gemisch aus 96 % Ethanol und Milchsäure (2:1) überführt und in diesem bei 4 °C im Kühlschrank bis zur mikroskopischen Untersuchung gelagert. Zur Vorbereitung der Färbung erfolgte ein dreimaliges Waschen der Fruchtblätter in entionisiertem Wasser. Anschließend wurden die Fruchtblätter in der Anilinblaulösung für mindestens 30 min inkubiert. Für die Färbelösung wurden 100 mg Anilinblau (Serva) und 767,6 mg K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O in 100 ml entionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst und bis zum Farbumschlag von blau nach gelb bei Licht gelagert. Die endgültige Lagerung der Färbelösung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Nach der Inkubation der Fruchtblätter in der Färbelösung wurden die Fruchtblätter der Länge nach geteilt und in einem Tropfen der Färbelösung auf einen Objektträger gelegt und leicht gequetscht. Anschließend erfolgte die Bonitur des Pollenschlauchwachstums unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica, CTR 5000, Filter A5: Anregungsfilter BP 450-

490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520). Bonitiert wurden das Vorhandensein von Pollen auf der Narbe, die Keimung sowie das Einwachsen der Pollenschläuche. Hierbei wurden drei Stadien bonitiert:

- 1 - Pollenschlauchwachstum bis zum Hörnerende
- 2 - Pollenschlauchwachstum bis in den Griffel
- 3 - Pollenschlauchwachstum bis in den Bereich der Samenanlagen

Tabelle 3-6: Versuchsparameter der Kreuzungsversuche in den Jahren 2006 und 2007

Mutterpflanze	Pollenspender	Jahr der Kreuzung	Zeitpunkt der Einlagerung in das Milchsäure/Ethanolgemisch (h nach Bestäubung)	Anzahl untersuchter Blüten pro Einlagerungszeitpunkt	Anzahl präparierter Fruchtknoten für das "embryo rescue"-Verfahren (3/4,5/6 Wochen nach Kreuzung)
Intraspezifische Kreuzungen innerhalb der Art <i>H. macrophylla</i>	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	2006	24/48/72	6	8/4/8
	<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	2006	24/48/72	6	12/6/t
	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	2006	24/48/72	6	12/10/12
		2007	48/72/96	6	12/12/12
	<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	2006	24/48/72	6	11/12/11
	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	2006	24/48/72	6	12/6/12
		2007	48/72/96	6	24/24/24
	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	2006	24/48/72	6	12/6/9
	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	2006	24/48/72	6	5/2/t
		2007	48/72/96	6	20/20/12
		2007	48/72/96	6	22/17/4
	interspezifische Kreuzungen	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	2007	48/72/96	6
<i>H. macrophylla</i> 'Doris'		2007	48/72/96	4	8/8/t
<i>H. macrophylla</i> 'Adria'		2007	48/72/96	6	30/24/24
<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'		2007	48/72/96	6	12/12/8
<i>H. macrophylla</i> 'Adria'		2007	48/72/96	6 nach 48 h bzw. je 2 nach 72 und 96 h	28/28/24
<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'		2006	24/48/72	6	12/6/4
<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'		2007	48/72/96	12	24/20/8
<i>H. quercifolia</i> 'Pee Wee'		2007	48/72/96	2	5*
<i>H. paniculata</i> 'Unique'		2007	48/72/96	6	17/12/12
<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'		2006	24/48	6	12/12/t
		2007	48/72/96	6	24/24/16
Selbstungen		<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	2006	24/48/72	6
	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	2006	24/48/72	6	12/12/4
		2007	48/72/96	6	24/28/28
	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	2006	24/48/72	6	12/7/8
	<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	2006	24/48/72	6	12/3/t
		2007	48/72/96	6	24/23/14
	<i>H. quercifolia</i> 'Pee Wee'	2007	48/72/96	10	4/t/t
	<i>H. paniculata</i> 'Unique'	2007	48/72	2	24/12/4
	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	2007	48/72/96	6	12/12/12
		2007	48/72/96	6	
		2007	48/72/96	6	

### 3.1.6 Durchführung des "embryo rescue"-Verfahrens

Der Begriff "embryo rescue" meint streng genommen die Präparation des Embryos aus dem Samen und die anschließende Kultur auf Nährmedium. In der vorliegenden Arbeit ist es jedoch nicht gelungen, die Embryonen aus den Samen zu isolieren. Zum einen konnte in den jüngeren Samenanlagen kein Embryo identifiziert werden und zum anderen wurden die in älteren Samenanlagen erkennbaren Embryonen beim Versuch, diese aus der Samenanlage zu präparieren, häufig zerstört. Aus diesen Gründen wurden ganze Samenanlagen aufgelegt. Der Begriff "embryo rescue" wird daher synonym für die Präparation und die Kultur der Samenanlagen verwendet.

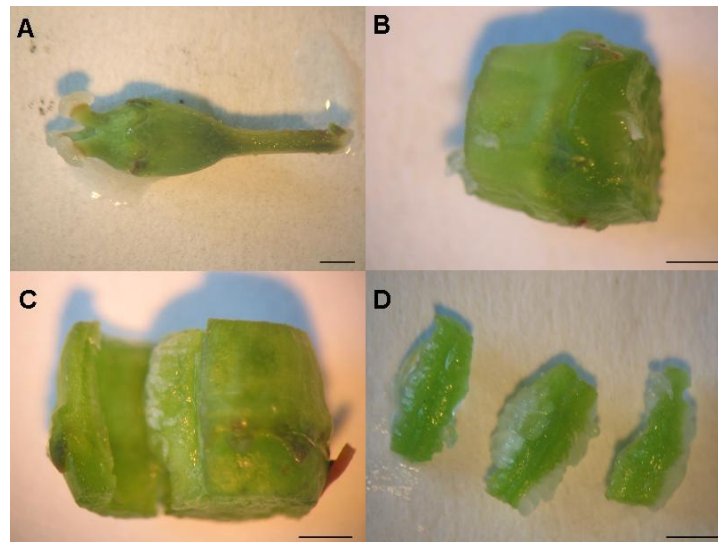
Der Same geht nach erfolgreicher Befruchtung aus der Samenanlage hervor und besteht aus Samenschale, dem Embryo und dem Endosperm (BRESINSKY ET AL. 2008). Da zum Zeitpunkt der Präparation nicht klar war, ob eine Befruchtung stattgefunden hat und ob sich eine erfolgreiche Entwicklung zu einem Samen (mit Embryo und Endosperm) anschloss, wird im Folgenden ausschließlich der Begriff Samenanlage verwendet.

Für die Durchführung des "embryo rescue"-Verfahrens wurden jeweils drei, 4,5 und sechs Wochen nach der Bestäubung Fruchtknoten präpariert. Die Anzahl der präparierten Fruchtknoten ist in Tabelle 3-6 gezeigt.

Nach der Ernte erfolgte die Oberflächensterilisation der Fruchtknoten wie folgt:

- 1 min 70 % Ethanol
- 10 min 1 % NaOCl mit einem Tropfen Tween 20
- 3 x waschen in sterilem Wasser (1, 2 und 5 min)

Für die anschließende Präparation wurde ein Stereomikroskop (Stemi 2000 C, Zeiss) verwendet. Der basale und der terminale Teil des Fruchtknotens (Abbildung 3-3 A) wurden entfernt (Abbildung 3-3 B). Ein vertikaler Schnitt in die Fruchtknotenhülle ermöglichte das Freilegen der Plazenta und der Samenanlagen (Abbildung 3-3 C). In der Regel zerfiel die Plazenta in drei Teile (Abbildung 3-3 D), die anschließend auf die verschiedenen Nährmedien überführt wurden. Samenanlagen, die sich von der Plazenta gelöst hatten, wurden ebenfalls auf Medium überführt. Pro Petrischale (6 cm) wurden die präparierten Plazentateile und Samenanlagen eines Fruchtknotens aufgelegt. Die präparierten Fruchtknoten einer Infloreszenz wurden gleichmäßig auf die verwendeten Medien ER1 und ER2, die sich in der Saccharose-Konzentration unterschieden, verteilt (Tabelle 3-7).



**Abbildung 3-3: Präparationsschritte zum Freilegen der Plazenta und Samen**

- A - Fruchtknoten nach Oberflächensterilisation
  - B - Fruchtknoten nach Entfernen des basalen und terminalen Teils
  - C - Fruchtknoten mit geöffneter Fruchtknotenhülle und sichtbarer Plazenta mit Samenanlagen
  - D - Plazentateile mit Samenanlagen
- (Balken entsprechen 1 mm)

Zusätzlich wurde in der ersten Kreuzungsperiode ein Versuch durchgeführt, bei dem ausschließlich Fruchtknoten nach der Kreuzung *H. macrophylla* 'Libelle' x *H. macrophylla* 'Doris' verwendet wurden. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurden hier die drei Teile eines Fruchtknotens nicht gemeinsam auf ein Medium gelegt, sondern auf die Medien ER1, ER3 und ER4 (Tabelle 3-7) verteilt. Insgesamt wurden für diesen Versuch 11 Fruchtknoten präpariert. Ziel des Versuches war den Einfluss von Wachstumsregulatoren bzw. einer anderen Nährsalzkombination auf die Entwicklung von Embryonen zu untersuchen. In der zweiten Kreuzungsperiode wurden wieder alle Teile eines präparierten Fruchtknoten entweder auf Medium ER1 oder ER2 (Tabelle 3-7) aufgelegt. Zusätzlich wurde während der Kultur versucht durch Überführen einzelner Samenanlagen auf Medien, die zusätzlich 1 mg/l GA<sub>3</sub> (ER5 und ER6) enthielten, eine Förderung der Entwicklung zu erzielen.

Nach der Präparation der Fruchtknoten erfolgte eine 14-tägige Kultur im Dunkeln. Anschließend erfolgte die Kultur bei einem Licht/Dunkelrhythmus von 16h/8h und 24 °C. Zu Beginn erfolgte die Bonitur nach zwei und vier Wochen im Anschluss wurde alle vier Wochen bonitiert. Bonitiert wurden die Form und Farbe der Samenanlage, die Samenanlagenentwicklung sowie die Entwicklung von Pflänzchen. Die in Kapitel 3.2.4 dargestellten Beobachtungen wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten gesammelt. Aufgrund der geringen Anzahl von sich entwickelnden Pflanzen wurde auf eine statistische Verrechnung verzichtet.



Bei Entwicklung von Pflänzchen wurden diese auf 1/2 MS-Medium mit B5-Vitaminen ohne Zusatz von Wachstumsregulatoren je nach Pflanzengröße in Petrischalen (6 cm) oder in Twist-off-Glasgefäße überführt.

**Tabelle 3-7: Medienzusammensetzungen ER1 bis ER6 für die Versuche zum "embryo-rescue"-Verfahren**

<b>Medienbestandteile</b>	<b>ER1</b>	<b>ER2</b>	<b>ER3</b>	<b>ER4</b>	<b>ER5</b>	<b>ER6</b>
Makro- und Mikronährsalze	1/2 B5 (Tabelle 2-3)	1/2 B5 (Tabelle 2-3)	1/2 B5 (Tabelle 2-3)	1/2 MS (Tabelle 2-2)	1/2 B5 (Tabelle 2-3)	1/2 B5 (Tabelle 2-3)
Fe-Na-EDTA	36,7 mg/l	36,7 mg/l	36,7 mg/l	36,7 mg/l	36,7 mg/l	36,7 mg/l
Vitamine B5 (Duchefa)	112 mg/l	112 mg/l	112 mg/l	112 mg/l	112 mg/l	112 mg/l
Saccharose	20 g/l	45 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	45 g/l
BAP	---	---	0,2 mg/l	---	---	---
IAA	---	---	0,2 mg/l	---	---	---
GA <sub>3</sub>	---	---	---	---	1 mg/l	1 mg/l
Gelrite	3,8 g/l	3,8 g/l	3,8 g/l	3,8 g/l	3,8 g/l	3,8 g/l
pH-Wert	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7

Die Akklimatisierung der bewurzelten Pflanzen erfolgte in Einheitserde (Einheitserde Werkverband) in Pikierkisten, die unter einem Folientunnel bei hoher Luftfeuchte aufgestellt wurden. Zusätzlich erfolgte als Schutz vor starker Sonneneinstrahlung das Abdecken mit Vlies. Nach circa 10 bis 14 Tagen wurde die Luftfeuchte durch zeitweise Belüftung reduziert und nach vier Wochen wurde die Akklimatisationsrate bestimmt.

### **3.1.7 Molekulargenetische Untersuchung der Selbstungsnachkommen**

#### **3.1.7.1 DNA-Isolierung nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997)**

Zur Isolierung von Gesamt-DNA wurde die im Folgenden beschriebene Methode nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997) modifiziert nach EDWARDS ET AL. (1991) verwendet.

- 25 mg frisches Pflanzenmaterial in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen
- Zugabe von 400 µl Extraktionspuffer (Tabelle 3-8) und Aufbereitung mit Hilfe eines Mikropistills
- Zugabe von 20 µl RNase (10 mg/ml)
- Probe vortexen
- Inkubation für 15 min im Wasserbad bei 65 °C, gelegentlich leicht schwenken
- Zugabe von 200 µl 5 M Kaliumacetat (-20 °C), leicht schwenken, um Gewebepellet aufzulösen

- Inkubation für 10 min im Eisbad
- Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur
- 500 µl Überstand in neues 1,5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 500 µl Isopropanol (-20 °C), beide Phasen gut vermischen
- nach Sichtbarwerden der DNA-Fäden (max. nach 10 min) Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) waschen
- Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur, Überstand verwerfen
- Pellet im geöffneten Eppendorf- Reaktionsgefäß für ca. 3 h trocknen
- Zugabe von 50 µl A<sub>bidest</sub> bis sich Pellet gelöst hat
- Lagerung der gelösten DNA kurzfristig bei -20 °C, längerfristig bei -80 °C

**Tabelle 3-8: Zusammensetzung des Extraktionspuffers nach DOROKHOV UND KLOCKE (1997)**

<b>Extraktionspuffer</b>
200 mM Tris-HCl pH 7,5
250 mM NaCl
25 mM EDTA
0,5 % SDS

### **3.1.7.2 Agarosegelelektrophorese**

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA sowie die Auftrennung der DNA erfolgten elektrophoretisch in einem Agarosegel. Die Agarose (peqGold Universal Agarose, peqLab) wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8,0)) aufgelöst, nach dem Abkühlen auf circa 50 °C mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Horizontalkammer gegossen. In die noch flüssige Agarose wurde ein Probenkamm gesteckt.

### **3.1.7.3 Quantifizierung der DNA mittels Agarosegel**

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde 1 µl der isolierten DNA mit 7 µl sterilem Wasser und 2 µl Ladepuffer (Tabelle 3-9) gemischt und auf ein 0,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe von λ-DNA mit Konzentrationen von 5, 10, 20 und 50 ng aufge-

tragen. Die Auswertung erfolgte unter einem Transilluminator. Die Dokumentation des Gels erfolgte mit einer Kamera und unter Verwendung der Software BioDocAnalyse der Firma Biometra.

**Tabelle 3-9: Zusammensetzung des Ladepuffers**

<b>Ladepuffer</b>
3,45 ml Glycerin (100 %)
6,55 ml A. bidest
Spatelspitze Bromphenolblau

#### **3.1.7.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Erstellung von RAPD-Markern**

Mittels PCR Technik ist die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen möglich. Da die Amplifizierung mit einer hohen Effizienz abläuft, sind bereits minimale Mengen an genetischem Ausgangsmaterial vermehrbar und somit nachweisbar.

Pro PCR-Ansatz wurden ca. 10 ng isolierter DNA verwendet. Die Menge der eingesetzten Substanzen sowie die Zusammensetzung des Firepol-Puffers sind Tabelle 3-10 sowie Tabelle 3-11 zu entnehmen. Als Primer dienten die in Tabelle 3-12 dargestellten Decamer Primer (Primer Kit B, Carl Roth), die in Vorversuchen gut reproduzierbar waren.

**Tabelle 3-10: Standardreaktionsansatz für die PCR**

<b>Reagenzien</b>	<b>Volumen pro Ansatz (µl)</b>
DNA (10 ng/µl)	1
10 x Firepol-Puffer	2
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
dNTPs (1 mM)	2
Primer (5 µM)	2
Firepol-Polymerase (1U/µl)	1
A.-bidest	10,4

**Tabelle 3-11: Zusammensetzung des 10 x Firepol-Puffers**

<b>10 x Firepol-Puffer</b>
0,8 M Tris-HCl
0,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

**Tabelle 3-12: Verwendete Zufallsprimer und deren Sequenzen (Kit B, Karl Roth)**

<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Primersequenz von 5' nach 3'</b>
B3	CAT CCC CCT G
B5	TGC GCC CTT C

Die PCR wurde in einem Thermocycler bei den in Tabelle 3-13 dargestellten Bedingungen durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA elektrophoretisch in einem 1,8 %igem Agarosegel. Dem PCR-Ansatz wurden 2 µl Ladepuffer (Tabelle 3-9) zugefügt und von diesem Gemisch wurden 17 µl aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte horizontal bei 100 V. Zur Ermittlung der Fragmentgröße wurde 1 µl GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0322) (Fermentas) verwendet.

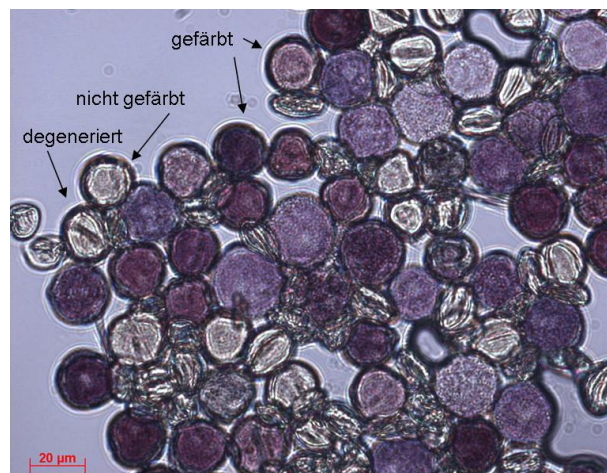
**Tabelle 3-13: PCR-Amplifikationsbedingungen**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit (min)</b>	<b>Anzahl Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	94	1	} 35
Annealing	36	1	
Elongation	72	2	
Finale Elongation	72	10	1

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Pollenlagerung

Die Vitalität der Pollen wurde durch Färbung mit MTT ermittelt. MTT ist ein wasserlöslicher gelber Farbstoff, der durch mitochondriale Dehydrogenasen, die nur in lebenden Zellen aktiv sind, in einen wasserunlöslichen rötlich-blauen Farbstoff umgewandelt wird (MOSMANN, 1983) und so die Unterscheidung von vitalen und nicht vitalen Pollen ermöglicht (Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-4:** Vitaler (gefärbter), nicht vitaler (nicht gefärbter) und degenerierter Pollen nach Färbung mit MTT

Exemplarisch ist Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' nach zweiwöchiger Lagerung bei - 18 °C gezeigt.

Die Vitalität und die Keimraten der Pollen aller drei untersuchten Arten entwickelten sich über den Beobachtungszeitraum ähnlich, so dass im Folgenden nur auf die Ergebnisse mit Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' eingegangen wird (Abbildung 3-5, Abbildung 3-6). Die Daten für die beiden anderen untersuchten Sorten sind im Anhang zu finden (Abbildung A 18 bis Abbildung A 21).

Die Lagerung über ein Jahr bei - 18° C führte zu einer höheren Vitalität (42 %) als die Lagerung bei 4° C (31 %). Erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur, so verlor der Pollen seine Vitalität innerhalb der ersten vier Wochen (Abbildung 3-5). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die Keimraten in vitro beobachtet werden (Abbildung 3-6). Während 18 % der frisch geernteten Pollen in vitro keimten, führte die Lagerung bei Raumtemperatur zu einer schnellen Abnahme der Keimfähigkeit. Zu allen Boniturterminen war die Lagerung bei - 18° C erfolgreicher als die Lagerung bei 4° C. Nach einer Lagerdauer von einem Jahr konnten keimfähige Pollen (5 %) nur bei Lagerung im Tief-

kühlschrank (-18° C) beobachtet werden. Zu allen Terminen war der Anteil der vitalen (leicht und intensiv gefärbten) Pollen deutlich höher als der Anteil der Pollen, der in vitro keimte. Bei den beiden anderen untersuchten Sorten waren die Verhältnisse insbesondere nach sechs und nach 12 Monaten umgekehrt. Die Keimrate lag etwas über der Vitalität.

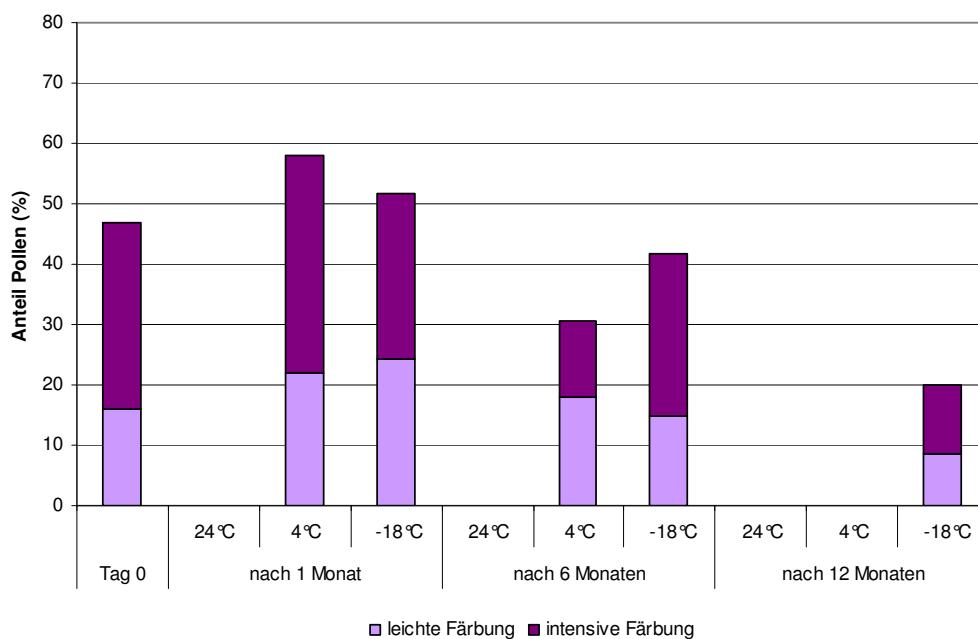


Abbildung 3-5: Vitalität von frisch geerntetem (Tag 0) bzw. gelagertem Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Blau-meise', ermittelt durch Färbung mit MTT

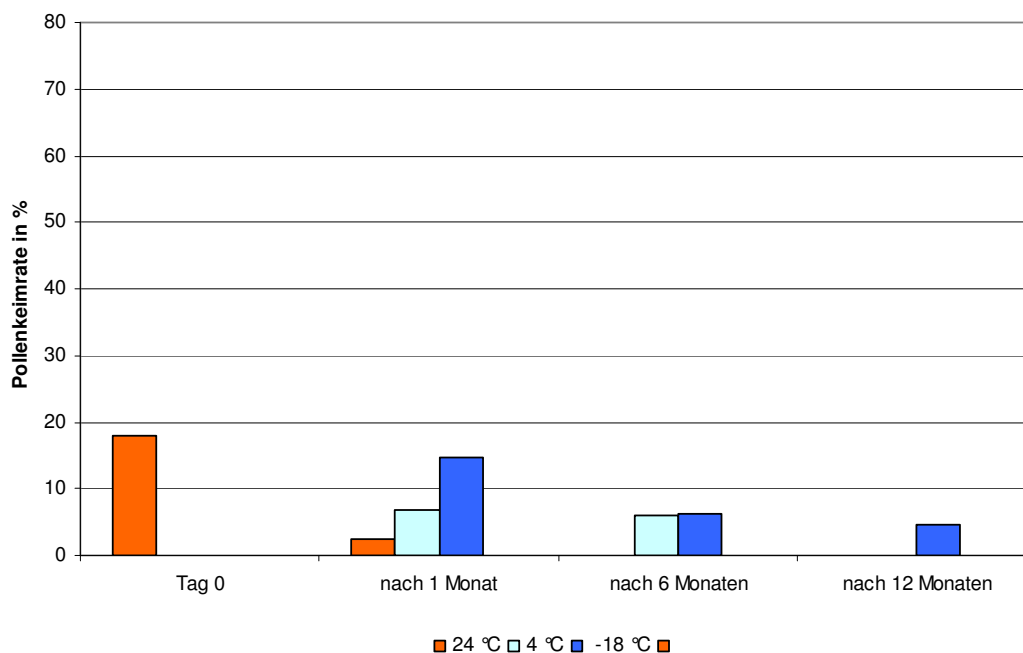


Abbildung 3-6: Keimraten von frisch geerntetem (Tag 0) bzw. gelagertem Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise'

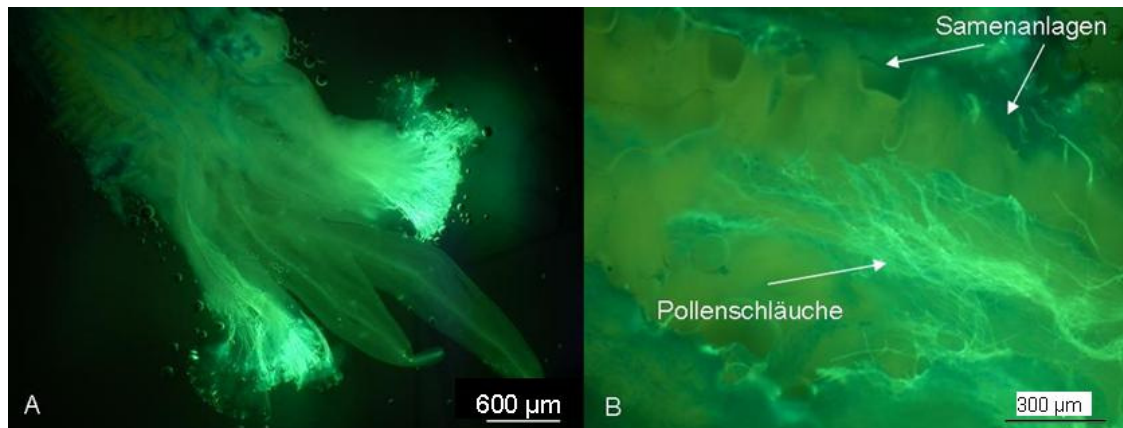
### 3.2.2 Färbung der Pollenschläuche mit Anilinblau

Voraussetzung für eine erfolgreiche Kreuzung ist das Einwachsen des Pollenschlauches in die Eizelle. Mit Hilfe des Farbstoffes Anilinblau, der die Callose der inneren Membran und die Callosepfropfen des Pollenschlauches anfärbt, ist es möglich, bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop die Keimung des Pollens auf der Narbe und das Wachstum des Pollenschlauches zu verfolgen und so mögliche Ursachen einer nicht erfolgreichen Kreuzung zu finden.

Tabelle 3-6 gibt Auskunft über die im jeweiligen Jahr durchgeführten Kreuzungen sowie über den Zeitpunkt der Milchsäureeinlagerung und über die Gesamtzahl der untersuchten Fruchtknoten. Da die Ergebnisse der Untersuchungen in beiden Jahren in der Regel ähnlich waren, erfolgt nur eine getrennte Darstellung der Daten falls Unterschiede auftraten.

In den ersten Untersuchungen wurden Fruchtknoten nach intraspezifischen Kreuzungen innerhalb der Art *H. macrophylla* untersucht. Unabhängig von der Kreuzungskombination war Pollenkeimung und das Einwachsen der Pollenschläuche, sofern Pollen auf der Narbe anhafteten, sichtbar. Bei beiden reziproken Kreuzungskombinationen der Sorten *H. macrophylla* 'Doris' x *H. macrophylla* 'Libelle' war an über 92 % der untersuchten Blüten Pollen auf der Narbe erkennbar. Bereits nach 24 h (Abbildung 3-7 A) konnte das Einwachsen einer Vielzahl von Pollenschläuchen teilweise bis weit in den

Griffel beobachtet und nach 48 bzw. 72 h das Pollenschlauchwachstum bis in den Bereich der Samenanlagen verfolgt werden (Abbildung 3-7 B).



**Abbildung 3-7: Pollenschlauchwachstum nach der Kreuzung *H. macrophylla* 'Doris' x 'Libelle'**

A: Pollenschläuche im Griffel 24 h nach Bestäubung

B: Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen 72 h nach Bestäubung

Auch nach der Kreuzung *H. macrophylla* 'Doris' x *H. macrophylla* 'Blaumeise' war Pollen an 95 % der Narben angelagert und die Pollenschläuche konnten 72 h nach der Bestäubung im Bereich der Samenanlagen beobachtet werden. Bei der reziproken Kreuzung waren Pollen an 85 % der Narben sichtbar. Die Pollenschläuche der Sorte 'Doris' konnten jedoch nur bis maximal in den Griffel verfolgt werden (72 h nach Bestäubung). Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt fanden nicht statt.

Nach interspezifischer Kreuzung, bei der die Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' mit Pollen der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' bestäubt wurde, konnte im ersten Jahr keimender Pollen an 61 % bzw. im zweiten Jahr an 72 % der untersuchten Fruchtknoten beobachtet werden. Nach 24 h waren Pollenschläuche am Übergang der Hörner zum Griffel sichtbar. In einem Fruchtblatt wurde das Wachstum von zwei Pollenschläuchen bis in den Bereich der Samenanlagen (nach 96 h) beobachtet. In allen anderen Fällen war das Wachstum nur bis in den Bereich des Griffels verfolgbar.

An einem Drittel der Fruchtblätter der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' konnte nach Bestäubung mit Pollen der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' kein Pollen auf der Narbe angefärbt werden. Auf den übrigen Narben war Pollen sichtbar, dieser keimte und war bereits nach 48 h in den Griffel gewachsen. Ein Weiterwachsen der Pollenschläuche konnte am letzten untersuchten Zeitpunkt (72 h nach Bestäubung) nicht beobachtet werden.



Die Kreuzung *H. macrophylla* 'Adria' x *H. arborescens* 'Annabelle' wurde in beiden Jahren realisiert. Pollenanhaftung wurde an 50 (2006) bzw. 78 % (2007) der Narben beobachtet. Nach 24 h war der Großteil der Pollen gekeimt und nach 48 h bereits bis in den Griffel eingewachsen. In drei Fruchtknoten konnten wenige Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen erkannt werden (72 bzw. 96 h nach Bestäubung).

Nach der Kreuzung von *H. macrophylla* 'Doris' x *H. arborescens* 'Annabelle', die nur in der zweiten Kreuzungsperiode durchgeführt wurde, waren 33 % der Narben ohne Pollen. Zu allen drei untersuchten Zeitpunkten (48, 72 und 96 h nach Bestäubung) waren Pollenschläuche im Griffel, jedoch nicht im Bereich der Samenanlagen erkennbar (Abbildung 3-8).

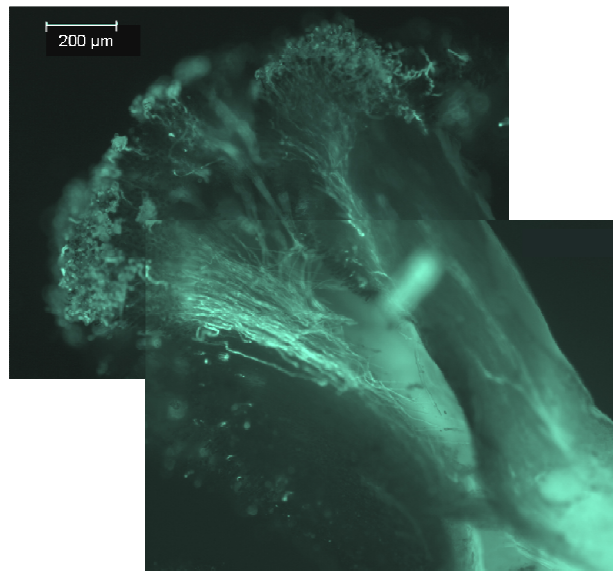
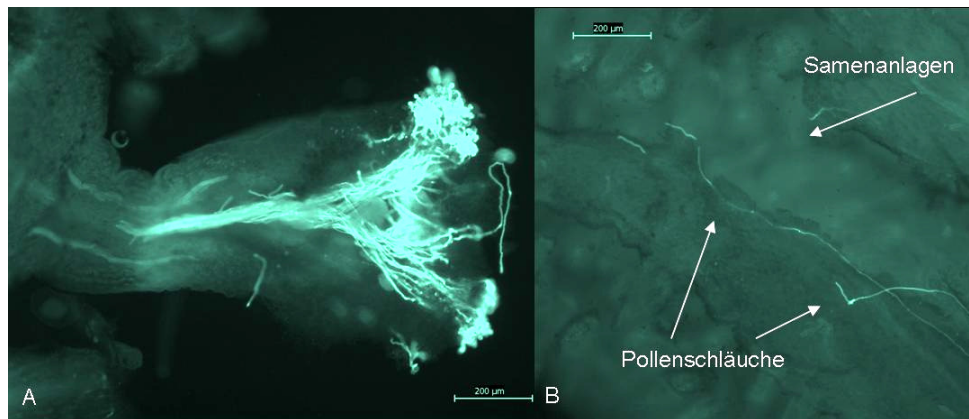


Abbildung 3-8: Pollenschlauchwachstum bis in den Bereich des Griffels nach der interspezifischen Kreuzung von *H. macrophylla* 'Doris' x *H. arborescens* 'Annabelle' 96 h nach Bestäubung

Pollen der Sorte *H. quercifolia* 'Pee Wee' wurde in Kreuzungen mit den Sorten *H. macrophylla* 'Blaumeise', 'Doris' und 'Adria' verwendet. Während bei den Sorten 'Blaumeise' und 'Adria' an allen untersuchten Fruchtblättern Pollen auf den Narben sichtbar war, konnte Pollen auf den Narben von 'Doris' nur an je zwei Fruchtblättern, die 48 bzw. 96 h nach Bestäubung geerntet wurden, beobachtet werden. Dieser keimte und konnte maximal bis zum Ende der Hörner verfolgt werden. Das Pollenschlauchwachstum im Fruchtblättern von 'Blaumeise' ließ sich ebenfalls nur bis zum Griffel verfolgen. Das Einwachsen bis in den Bereich des Griffels konnte bei der Sorte 'Adria' bereits nach 72 h in vier der sechs zu diesem Zeitpunkt untersuchten Fruchtblättern beobachtet werden (Abbildung 3-9 A). Nach 96 h waren die Pollenschläuche in allen sechs

Fruchtblättern kurz vor bzw. vereinzelt im Bereich der Samenanlagen sichtbar (Abbildung 3-9 B).

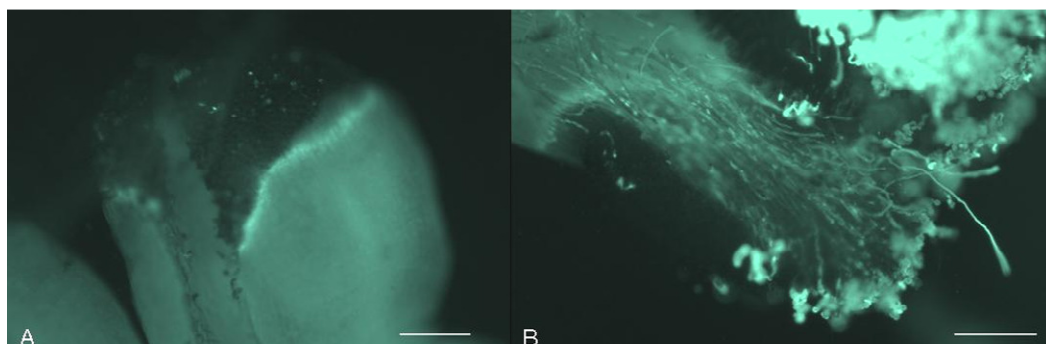


**Abbildung 3-9: Pollenschlauchwachstum nach der interspezifischen Kreuzung von *H. macrophylla* 'Adria' x *H. quercifolia* 'Pee Wee'**

A - Pollenschläuche im Griffel 72 h nach Bestäubung

B - Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen 96 h nach Bestäubung  
(Balken entsprechen 200 µm)

Die Sorten *H. macrophylla* 'Blaumeise' und 'Adria' kamen in Kreuzungsversuchen mit Pollen von *H. paniculata* 'Unique' zur Anwendung. Der Pollen keimte auf fast allen untersuchten Narben der Sorte 'Adria' und war bereits nach 48 h bis in den Griffel gewachsen. Nach 72 h und 96 h waren die Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen deutlich sichtbar. Auf 11 von 18 untersuchten Fruchtblättern von 'Blaumeise' war kein Pollen sichtbar (Abbildung 3-10 A). Bei Vorhandensein von Pollen war dieser gekeimt und bis zum Griffel und in einem Fruchtblätter bis in den Bereich der Samenanlagen gewachsen (Abbildung 3-10 B).



**Abbildung 3-10: Pollenschlauchwachstum nach der interspezifischen Kreuzung von *H. macrophylla* 'Blaumeise' x *H. paniculata* 'Unique'**

A - Narbe ohne erkennbaren Pollen

B - Pollenschläuche im Bereich des Griffels und kurz vor den Samenanlagen 96 h nach Bestäubung  
(Balken entsprechen 200 µm)

Bei Verwendung von *H. arborescens* 'Annabelle' als Mutterpflanze wurde Pollen von *H. macrophylla* 'Libelle' und 'Adria' zur Bestäubung eingesetzt. Auf keiner der untersuchten Narben konnte Pollen nach der Bestäubung mit 'Libelle' beobachtet werden. Nach Bestäubung mit Pollen der Sorte 'Adria' wurden an 33 % der Blüten vereinzelt Pollenkörner beobachtet, diese keimten, wuchsen jedoch nicht in die Narbe ein (Abbildung 3-11).

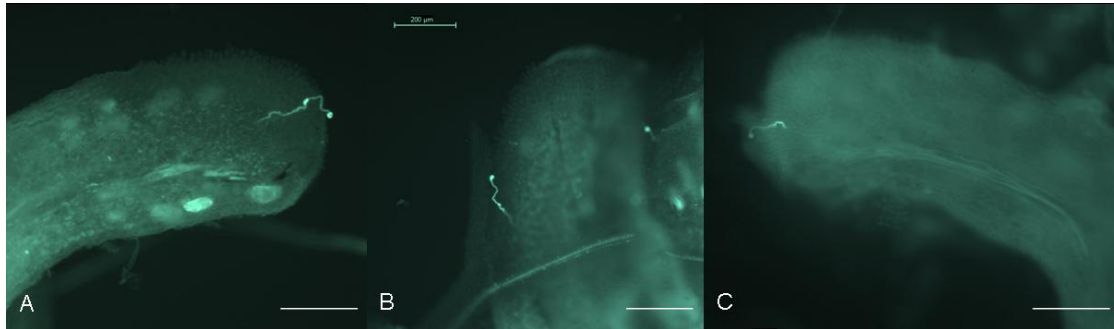
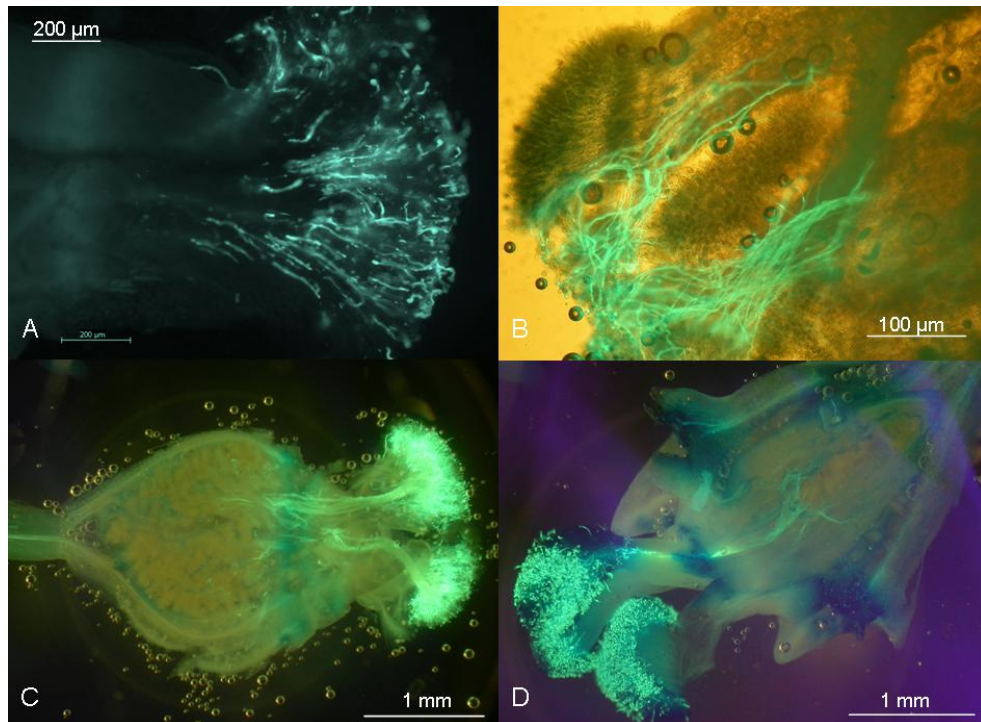


Abbildung 3-11 A-C: Keimung einzelner Pollen auf der Narbe von *H. arborescens* 'Annabelle' nach der Kreuzung mit *H. macrophylla* 'Adria' (Balken entsprechen 200 µm)

Als weitere Arten wurden *H. paniculata* 'Unique' und *H. quercifolia* 'Pee Wee' als Mutterpflanzen mit Pollen von *H. macrophylla* 'Adria' bestäubt. Bei keiner der durchgeführten Kreuzungen konnte Pollen auf der Narbe nach Färbung mit Anilinblau beobachtet werden.

Bei Selbstungen innerhalb der Art *H. macrophylla* war bei allen vier untersuchten Sorten Pollen auf 90 bis 100 % der untersuchten Blüten sichtbar. Keimung konnte immer beobachtet werden. Bei geselbsteten Blüten von *H. macrophylla* 'Libelle' und 'Blaumeise' wuchsen die Pollenschläuche bis maximal zum Übergang vom Hörnerende zum Griffel (96 h nach der Bestäubung) (Abbildung 3-12 A, B). Die Bestäubung von Narben der Sorten 'Adria' und 'Doris' mit dem eigenen Pollen führte hingegen bereits nach 72 h zum Einwachsen der Pollenschläuche bis in den Bereich der Samenanlagen (Abbildung 3-12 C, D).



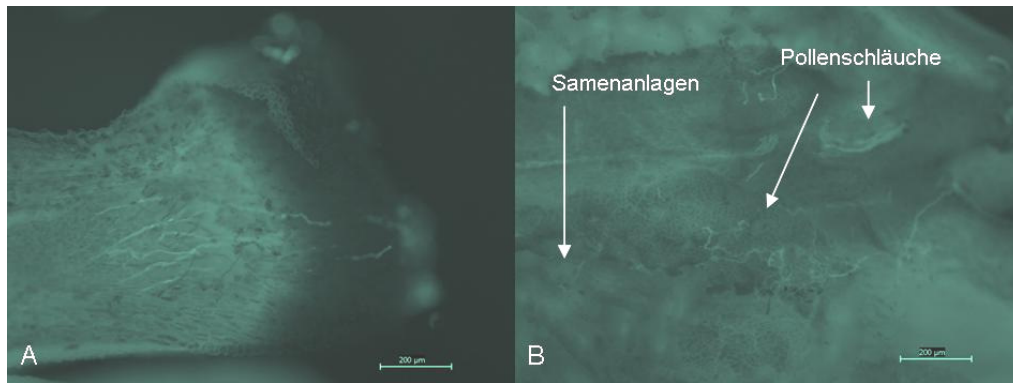
**Abbildung 3-12: Pollenschlauchwachstum nach Selbstungen innerhalb der Art *H. macrophylla***

- A bzw. B - Pollenschläuche am Übergang vom Hörnerende zum Griffel von *H. macrophylla* 'Libelle' bzw. 'Blaumeise' 96 h nach Bestäubung,  
 C bzw. D - Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen von *H. macrophylla* 'Adria' bzw. 'Doris' 72 h nach Bestäubung

Nach Selbstung der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' sowie der Sorte *H. quercifolia* 'Pee Wee' war in den meisten Fällen kein Pollen nach Färbung mit Anilinblau sichtbar. Bei Vorhandensein von Pollen keimte dieser, wuchs jedoch nie bis in den Bereich der Samenanlagen, sondern stoppte in der Regel deutlich früher.

Bei 75 % der Blüten der Sorte *H. paniculata* 'Unique', die mit eigenem Pollen bestäubt wurden, konnte eine geringe Anzahl (< 20) Pollenkörner beobachtet werden. Diese keimten und wuchsen in der Regel bis in den Griffel und in zwei Fruchtblättern bis in den Bereich der Samenanlagen ein (Abbildung 3-13).





**Abbildung 3-13: Pollenschlauchwachstum nach Selbstung von *H. paniculata* 'Unique'**

A - Pollenschläuche im Bereich des Griffels 72 h nach Bestäubung  
 B - Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen 96 h nach Bestäubung  
 (Balken entsprechen 200 µm)

### 3.2.3 Entwicklung der Samenkapseln an der Pflanze

Die Blüten, die nicht für die Anilinfärbungen bzw. für die Versuche zum "embryo rescue"-Verfahren verwendet wurden, wurden bis zum Frühjahr des folgenden Jahres an der Pflanze belassen, anschließend geerntet und sowohl in Erde als auch unter sterilen Bedingungen *in vitro* ausgesät.

Nach erfolgreicher Kreuzung kompatibler Sorten kann ein Anschwellen der Fruchtknoten bei *Hydrangea* beobachtet werden (pers. Mitteilung F. Engel). Deutlich angeschwollene Fruchtknoten konnten beispielsweise nach beiden reziproken Kreuzungskombinationen zwischen *H. macrophylla* 'Libelle' und *H. macrophylla* 'Doris' beobachtet werden, wohingegen nach der Selbstung der Sorte 'Libelle' kein Anschwellen zu beobachten war (Abbildung 3-14).



**Abbildung 3-14: Blütenstände zwei Wochen nach Bestäubung**

A - angeschwollene Fruchtknoten nach der Kreuzung *H. macrophylla* 'Libelle' x 'Doris'  
 B - nicht angeschwollene Fruchtknoten nach der Selbstung von *H. macrophylla* 'Libelle'  
 (Balken entsprechen 1 cm)

Die Samen von Kreuzungen zwischen den Sorten *H. macrophylla* 'Doris' und *H. macrophylla* 'Libelle' keimten in vitro und in Erde, unabhängig davon, welche Sorte als Pollenspender bzw. als Mutterpflanze diente.

Nach der Bestäubung der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' mit *H. macrophylla* 'Doris' verblieben zwar Samenkapseln an der Pflanze, diese enthielten jedoch nur schmale Samen, die nicht keimten. Bei der reziproken Kreuzung wurden neben schmalen auch ovale Samen beobachtet. Bei der Aussaat der Samen erfolgte jedoch keine Keimung.

Die Samenkapseln der Sorten *H. macrophylla* 'Libelle' und 'Adria' starben entweder innerhalb von acht Wochen nach Selbstung ab oder waren verkümmert. In ihnen wurden nur taube Samen beobachtet, die weder in vitro noch ex vitro keimten. Ein kleiner Teil der geselbsteten Fruchtknoten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' schwoll an und es konnten in ihnen sowohl schmale als auch wenige verdickte Samen gefunden werden. Die verdickten Samen beinhalteten eine ovale Struktur, die vermutlich den Embryo darstellte. Bei den Aussaaten konnte jedoch keine Keimung beobachtet werden. Ein Großteil der Fruchtknoten der Sorte *H. macrophylla* 'Doris' starb nach Selbstung ab. Einzig an einer Infloreszenz verblieben vier Fruchtknoten die im folgenden Frühjahr geerntet wurden, diese enthielten wenige Samen, die teilweise einen Embryo enthielten. Keimung konnte jedoch nicht beobachtet werden.

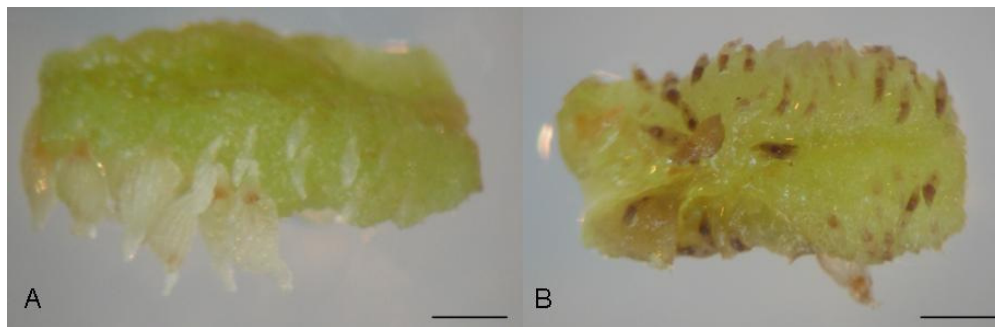
Bei Selbstungen der Arten *H. arborescens*, *H. paniculata* und *H. quercifolia* starben die Fruchtknoten innerhalb von sechs Wochen ab.

Bei allen durchgeführten interspezifischen Kreuzungen starben die Fruchtknoten bei Verwendung von *H. arborescens* 'Annabelle', *H. quercifolia* 'Pee Wee' sowie *H. paniculata* 'Unique' als Mutterpflanze binnen zwei Monaten ab. Wurden Sorten der Art *H. macrophylla* als Mutterpflanze verwendet, verblieben zwar Fruchtknoten an der Pflanze, diese waren jedoch sehr klein und enthielten nur schmale Samen, von denen keiner keimte.

### **3.2.4 Versuche zum "embryo rescue"-Verfahren**

Das "embryo rescue"-Verfahren bietet die Möglichkeit Nachkommen aus einer Kreuzung zu erzielen, bei der es nach erfolgreicher Befruchtung zum Absterben des Fruchtknotens bzw. der Embryonen an der Pflanze kommt. Durch eine rechtzeitige Ernte des Fruchtknotens und Überführen auf ein künstliches Nährmedium besteht die Möglichkeit den Embryo vor dem Absterben zu retten und bei geeigneten Bedingungen die Entwicklung zu einer Pflanze zu realisieren.

Bei der Präparation der Fruchtknoten konnten zwei Arten von Samenanlagen beobachtet werden. Zum einen schmale durchsichtige, die teilweise eine kleine runde braune Struktur enthielten, und zum anderen deutlich rundere weiße Samenanlagen, bei denen man deutlich den Embryo als weiße runde bzw. ovale Struktur erkennen konnte. Keimung wurde nur bei den runderen Samenanlagen beobachtet. Eine Entwicklung der schmalen Samenanlagen zu runderen erfolgte nicht (Abbildung 3-15). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt für beide Versuchsjahre getrennt.



**Abbildung 3-15: Plazenta mit verdickten hellen Samenanlagen (A) bzw. schmalen braunen Samenanlagen (B)**  
(Balken entsprechen 0,5 mm)

### **3.2.4.1 Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens in der ersten Kreuzungsperiode (2006)**

In den Versuchen zum "embryo rescue"-Verfahren, die während der ersten Kreuzungsperiode durchgeführt wurden, war nur ein geringer Anteil (2,2 %) der präparierten Fruchtknoten unsteril. Die durchgeführten Kreuzungskombinationen sowie die Anzahl der jeweils präparierten Fruchtknoten sind in Tabelle 3-6 dargestellt. Die Hälfte der zum jeweiligen Termin präparierten Fruchtknoten wurde auf Medium ER1 bzw. ER2 (Tabelle 3-7) überführt und deren weitere Entwicklung über einen Zeitraum von maximal sechs Monaten beobachtet. In Tabelle 3-14 ist die Anzahl, der durch Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens erzielten Pflanzen dargestellt.

Tabelle 3-14: Ergebnisse der "embryo rescue"-Versuche in der ersten Kreuzungsperiode (2006)

Dargestellt ist die Anzahl vitaler Pflanzen sechs Monate nach Präparation der Fruchtknoten.

		Pollenspender				
		<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'
Mutterpflanze	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	0/1/0 (0/0,1/0)			16/76/189 (1,3/2,6/15,8)	0/0/0 (0/0/0)
	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'		1/16/25 (0,1/2,3/3,1)			0/0/- (0/0/-)
	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'			6/0/- (0,5/0/-)	0/0/0 (0/0/0)	0/0/0 (0/0/0)
	<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	0/23/42 (0/1,9/3,8)		1/3/- (0,1/0,5/-)	0/4/4 (0/0,4/1,0)	
	<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	0/0/0 (0/0/0)				0/0/- (0/0/-)

Die Werte repräsentieren die Anzahl der entwickelten Pflanzen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Fruchtknotenpräparation (3/4,5/6 Wochen nach Bestäubung).

Die Werte in Klammern repräsentieren die durchschnittliche Anzahl Pflanzen pro präpariertem Fruchtknoten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Fruchtknotenpräparation (3/4,5/6 Wochen nach Bestäubung).

- keine Präparation von Fruchtknoten erfolgt

Es konnten durch die Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens im ersten Jahr keine Pflanzen aus den durchgeführten interspezifischen Kreuzungen sowie aus der Selbstung von *H. arborescens* 'Annabelle' bzw. aus der Kreuzung *H. macrophylla* 'Blaumeise' x *H. macrophylla* 'Doris' erzielt werden. Mit Ausnahme von Fruchtknoten nach Kreuzung von *H. macrophylla* 'Adria' mit *H. arborescens* 'Annabelle', in denen einige wenige ovale Samenanlagen gefunden wurden, waren ausschließlich schmale Samenanlagen vorhanden, die keinen Embryo enthielten. Keiner der beiden Samenanlagentypen keimte in diesem Fall. Aus allen Selbstungen innerhalb der Art *H. macrophylla* hingegen konnten ovale weißliche Samenanlagen präpariert werden, die keimten und sich zu Pflanzen entwickelten. Die Anzahl der erhaltenen Pflanzen variierte stark. Während nach Selbstung der Sorte 'Adria' 42 vitale Pflanzen gewonnen werden konnten, war die Anzahl nach Selbstungen der anderen Sorten deutlich geringer ('Libelle': 1 Pflanze, 'Blaumeise': 6 Pflanzen, 'Doris': 8 Pflanzen) (Tabelle 3-14).

Bei Betrachtung der Pflanzenentwicklung nach Kreuzungen innerhalb der Art *H. macrophylla* unabhängig von der Sortenwahl wird deutlich, dass ein längerer Verbleib der Fruchtknoten an der Pflanze und somit eine längere Reifezeit von Vorteil war (Tabelle 3-15). Eine eindeutig bessere Eignung einer Saccharosekonzentration im Medium konnte nicht beobachtet werden. Während drei und sechs Wochen nach Bestäubung auf Medium ER1 (2 % Saccharose) geringfügig mehr Pflanzen beobachtet wurden, war die Anzahl der entwickelten Pflanzen aus Samen, die 4,5 Wochen nach Kreuzung



zung präpariert worden waren auf Medium ER2 (4,5 % Saccharose) mehr als doppelt so hoch (Tabelle 3-15).

Die in Tabelle 3-15 dargestellte durchschnittliche Anzahl Pflanzen, die nach Selbstungen gewonnen wurden, lässt vermuten, dass auch hier eine längere Reifezeit der Fruchtknoten an der Pflanze von Vorteil war. Dies ist jedoch unter Einbezug der in Tabelle 3-14 dargestellten Werte nicht für alle Sorten zutreffend. So konnten nach Selbstungen der Sorten 'Blaumeise' bzw. 'Libelle' vitale Pflanzen ausschließlich aus Samenanlagen, die drei bzw. 4,5 Wochen nach Bestäubung präpariert wurden, gewonnen werden.

Aus Samenanlagen, die drei Wochen nach der Kreuzung präpariert wurden, entwickelten sich Pflanzen ausschließlich bei Kultur auf Medium ER1 (2 % Saccharose). Ein Einfluss des Mediums auf die Pflanzenentwicklung aus Samen, die 4,5 Wochen nach Bestäubung präpariert wurden, konnte nicht beobachtet werden. Ein Einfluss zeigte sich jedoch bei den Fruchtknoten, die sechs Wochen an der Pflanze verblieben waren. Bei Kultur auf Medium ER1 entwickelte sich durchschnittlich eine Pflanze pro präparierten Fruchtknoten. Die Anzahl der entwickelten Pflanzen auf Medium ER2 war deutlich höher und betrug 2,9 (Tabelle 3-15).

**Tabelle 3-15: Durchschnittliche Anzahl Pflanzen pro präpariertem Fruchtknoten, die durch Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens in der ersten Kreuzungsperiode gewonnen werden konnten (2006)**

Dargestellt ist die Anzahl vitaler Pflanzen sechs Monate nach Präparation der Fruchtknoten.

Kreuzungsart	Medien- variante	Zeitpunkt der Fruchtknotenpräparation		
		3 Wochen nach Bestäubung	4,5 Wochen nach Bestäubung	6 Wochen nach Bestäubung
intraspezifische Kreuzungen der Art <i>H. macrophylla</i>	ER1	0,4	1,5	6,2
	ER2	0,2	3,3	5,8
Selbstungen der Art <i>H. macrophylla</i>	ER1	0,3	0,5	1,0
	ER2	0	0,6	2,9

ER1 - 2 % Saccharose  
ER2 - 4,5 % Saccharose

Bei beiden reziproken Kreuzungskombinationen von *H. macrophylla* 'Libelle' und 'Doris' sowie bei Selbstung von 'Doris' und 'Adria' entwickelten sich Albinos.

In einem weiteren Versuch, der nur mit Fruchtknoten der Kreuzung *H. macrophylla* 'Libelle' x 'Doris' durchgeführt wurde, wurden neben dem bisher getesteten Medium ER1 die Medien ER3 und ER4 getestet (Tabelle 3-7). Die Anzahl Pflanzen, die sich aus den präparierten Fruchtknoten entwickelt haben, sind in Tabelle 3-16 dargestellt. Bei der Präparation drei Wochen nach Bestäubung wurden nur schmale längliche Samenan-

lagen beobachtet. Die Entwicklung von Pflanzen aus diesen blieb aus. Pflanzenentwicklung (Abbildung 3-16) wurde aus Samen beobachtet, die 4,5 bzw. sechs Wochen nach der Kreuzung von der Pflanze entnommen wurden (Tabelle 3-16). Bei einer Präparation sechs Wochen nach Bestäubung konnten deutlich mehr (3,6) grüne Pflanzen pro präpariertem Fruchtknoten beobachtet werden als 4,5 Wochen nach der Bestäubung (0,6 grüne Pflanzen pro Fruchtknoten). Eine eindeutige bessere Eignung eines der getesteten Medien konnte nicht festgestellt werden. An fast allen Plazentastücken, die auf das Kulturmedium ER3 aufgelegt wurden, bildete sich Kallus. Neben grünen Pflanzen entwickelten sich, hauptsächlich aus den älteren Samenanlagen, jedoch unabhängig vom Nährmedium, Albinos (Tabelle 3-16).

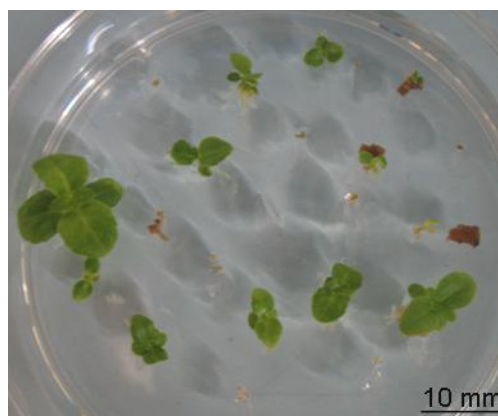


Abbildung 3-16: Nachkommen der Kreuzung *H. macrophylla* 'Libelle' x *H. macrophylla* 'Doris'

Pflanzenentwicklung acht Wochen nach Präparation der Fruchtknoten.

Tabelle 3-16: Durchschnittliche Anzahl Pflanzen pro präpariertem Fruchtknoten nach Kreuzung von *H. macrophylla* 'Libelle' x *H. macrophylla* 'Doris' (2006)

Dargestellt ist die Anzahl grüner Pflanzen und die Anzahl der Albinos fünf Monate nach Präparation der Fruchtknoten.

Medien- variante	Anzahl Pflanzen						$\bar{x}$	
	3 Wochen nach Bestäubung		4,5 Wochen nach Bestäubung		6 Wochen nach Bestäubung		grün	Albinos
	grün	Albinos	grün	Albinos	grün	Albinos		
ER1	0	0	0,7	0,1	3,4	0,9	1,4	0,3
ER3	0	0	0,4	0	3,5	0,3	1,3	0,1
ER4	0	0	0,8	0	3,9	0,6	1,6	0,2
$\bar{x}$	0	0	0,6	0	3,6	0,6		

ER1: 1/2 B5-Medium ohne Wachstumsregulatoren

ER3: 1/2 B5-Medium mit 0,2 mg/l BAP und 0,2 mg/l IAA

ER4: 1/2 MS-Medium ohne Wachstumsregulatoren

### 3.2.4.2 Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens in der zweiten Kreuzungsperiode (2007)

In der zweiten Kreuzungsperiode wurde das Augenmerk auf interspezifische Kreuzungen und auf Selbstungen gelegt. Die realisierten Kreuzungen sowie die Anzahl der präparierten Fruchtknoten sind in Tabelle 3-6 dargestellt.

Der Anteil der unsterilen Fruchtknoten war, wie bereits in der ersten Kreuzungsperiode, sehr gering und betrug nur 0,4 %.

In Tabelle 3-17 sind die Pflanzenzahlen, die nach Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens pro präpariertem Fruchtknoten gewonnen werden konnten, dargestellt. Im zweiten Jahr wurde nur eine intraspezifische Kreuzung durchgeführt. Da im ersten Kreuzungsjahr durch Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens eine Vielzahl von Pflanzen nach der Kreuzung *H. macrophylla* 'Libelle' x *H. macrophylla* 'Doris' gewonnen werden konnte, wurden diese Fruchtknoten als positive Kontrolle zu jedem Zeitpunkt mitpräpariert und aufgelegt. Da davon ausgegangen wurde, dass es sich bei dieser Kreuzung um eine kompatible Kreuzung handelt, wurde erwartet, dass wie bereits in der ersten Kreuzungsperiode, eine längere Reifezeit der Fruchtknoten an der Pflanze in einer höheren Anzahl Pflanzen resultiert. Diese Vermutung konnte wieder bestätigt werden. Ein Einfluss der Saccharosekonzentration des Mediums konnte wiederum nicht eindeutig belegt werden. An allen drei Präparationsterminen konnten zwar auf dem Medium ER1 mehr Pflanzen gewonnen werden, jedoch zeigte sich ein deutlicher Unterschied nur bei Präparation nach sechs Wochen. Hier konnten auf Medium ER1 durchschnittlich 8,0 Pflanzen, auf Medium ER2 im Gegensatz nur 4,2 Pflanzen pro Fruchtknoten beobachtet werden (Tabelle 3-17).

**Tabelle 3-17: Durchschnittliche Anzahl Pflanzen pro präpariertem Fruchtknoten nach Kreuzung von *H. macrophylla* 'Libelle' x *H. macrophylla* 'Doris' (2007)**

Dargestellt ist die Anzahl vitaler Pflanzen nach sechs Monaten.

Medien- variante	Zeitpunkt der Fruchtknotenpräparation		
	3 Wochen nach Bestäubung	4,5 Wochen nach Bestäubung	6 Wochen nach Bestäubung
ER1	1,2	4,0	8,0
ER2	0,5	3,8	4,2

ER1 - 2 % Saccharose  
ER2 - 4,5 % Saccharose

Trotz der Tatsache, dass die spätere Präparation der Samen sich äußerst fördernd auf die Anzahl der gewonnen Pflanzen auswirkte, wurden in den folgenden Untersuchungen an allen drei Terminen Präparationen durchgeführt. Insbesondere bei interspezifischen

Kreuzungen erfolgt das Absterben des Embryos häufig frühzeitig. Da jedoch keine Erkenntnisse über den Zeitpunkt des Absterbens vorlagen, wurden nach Möglichkeit alle drei Präparationstermine realisiert.

Die Gewinnung von Pflanzen durch Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens nach interspezifischer Kreuzung zwischen den Sorten *H. macrophylla* 'Adria' x *H. arborescens* 'Annabelle' ist nicht gelungen. Zu allen Präparationsterminen konnten zwar neben unreifen Samenanlagen auch vereinzelt ovale weiße Samenanlagen präpariert werden (Abbildung 3-17), Keimung konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Auch das Überführen einiger der verdickten Samenanlagen auf GA<sub>3</sub>-haltiges Medium (ER5 bzw. ER6) führte nicht zur Keimung.

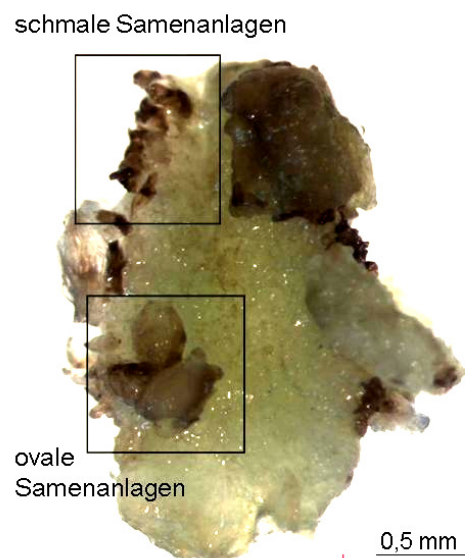


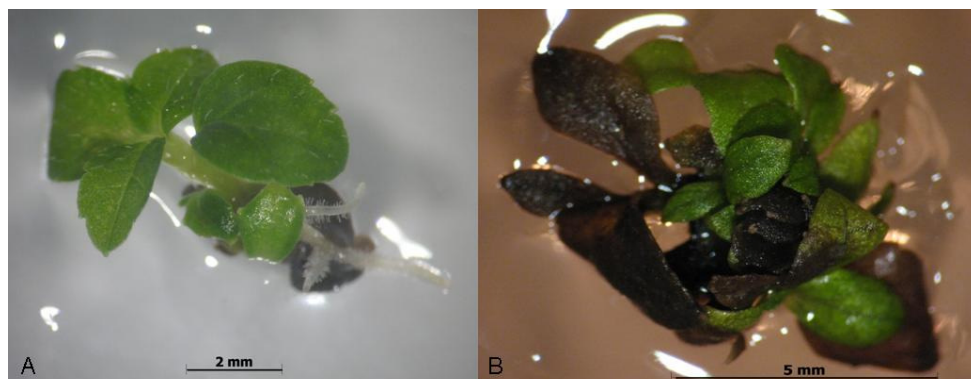
Abbildung 3-17: Plazenta und Samenanlagen nach der Kreuzung von *H. macrophylla* 'Adria' x *H. arborescens* 'Annabelle', 18 Tage nach der Präparation

Bei der reziproken Kreuzung waren nur schmale Samenanlagen vorhanden, die nicht keimten.

Die Kreuzung von *H. macrophylla* 'Adria' x *H. quercifolia* 'Pee Wee' führte zur Bildung von schmalen, z. T. braunen und einigen ovaleren helleren Samenanlagen. Ein Teil der runderen Samenanlagen wurde auf GA<sub>3</sub>-haltiges Medium (ER5 bzw. ER6) überführt. Aus einer der 4,5 Wochen nach Bestäubung präparierten Samenanlagen entwickelte sich eine Pflanze (nach drei Monaten Kultur auf Medium ER2), diese starb jedoch nach vier Monaten ab. Bei der reziproken Kreuzung wurden nur zwei Infloreszenzen mit insgesamt 31 Einzelblüten bestäubt. Die Fruchtknoten starben jedoch bald nach der Kreuzung ab, so dass nach 10 Tagen nur noch fünf Fruchtknoten präpariert werden

konnten. Die zum Zeitpunkt der Präparation grüne Plazenta und die hellen sehr schmalen Samenanlagen verfärbten sich innerhalb eines Monats schwarz. Samen, die Embryonen enthielten, konnten nicht beobachtet werden.

Zu allen drei Präparationsterminen konnten aus Fruchtknoten nach der Kreuzung *H. macrophylla* 'Adria' x *H. paniculata* 'Unique' braune und helle schmale sowie einige ovalere weiße Samenanlagen präpariert werden. Bei den Präparationen drei und 4,5 Wochen nach Bestäubung erfolgte die Keimung von vier bzw. drei Embryonen nach circa einem Monat. Embryonen, die sechs Wochen nach Bestäubung kultiviert wurden, begannen bereits nach 12 Tagen zu keimen. Pflanzen, die sich aus den Präparationen nach drei Wochen entwickelt hatten, starben im Verlauf der Kultur ab. Aus Präparationen der anderen Termine konnten jeweils zwei Pflanzen herangezogen werden und auf 1/2 MS-Medium überführt werden. Im Kulturverlauf konnte anfänglich eine Vermehrung der Pflanzen beobachtet werden. Diese Pflanzen starben jedoch bald nach Bildung des ersten Blattpaares ab (Abbildung 3-18 B), so dass nur eine der beiden potentiellen Hybridpflanzen erfolgreich auf neun verklont werden konnte (Abbildung 3-18 A).



**Abbildung 3-18:** Nachkommen der Kreuzung *H. macrophylla* 'Adria' x *H. paniculata* 'Unique', die durch "embryo rescue" gewonnen werden konnten

A - bewurzelter Spross  
B - absterbende Sprosse

Das „embryo-rescue“-Verfahren führte bei Kreuzungen, bei denen *H. paniculata* 'Unique' als Mutterpflanze diente und mit Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' bestäubt wurde, zu keinem Erfolg. Bei allen Präparationen wurden schmale weiße Samenanlagen beobachtet, die nicht keimten.

Bei der Kreuzung von *H. macrophylla* 'Blaumeise' x *H. arborescens* 'Annabelle' entwickelten sich sowohl schmale durchscheinende bzw. weiße als auch einige ovalere Samenanlagen. Das „Herausschieben“ des Embryos aus der Hülle konnte bei einigen Samenanlagen unabhängig vom Präparationstermin auf beiden verwendeten Medien

(ER5 bzw. ER6) beobachtet werden. Die Entwicklung von Keimblättern erfolgte jedoch in keinem Fall.

Wurden Fruchtknoten der Kreuzungskombination *H. macrophylla* 'Blaumeise' x *H. quercifolia* 'Pee Wee' drei Wochen nach Bestäubung präpariert so enthielten sie nur schmale weiße und schmale braune Samenanlagen, bei denen eine Keimung ausblieb. Bei Präparationen nach 4,5 bzw. sechs Wochen konnten neben den oben beschriebenen Samenanlagen auch vereinzelt ovalere Samenanlagen beobachtet werden. Eine Keimung erfolgte jedoch auch bei Überführung auf GA<sub>3</sub>-haltiges Medium nicht. Hingegen konnten bei einem sechs Wochen nach Bestäubung präparierten Samen das „Heraustreten“ des Embryos aus der Hülle beobachtet werden. Die Bildung von Keimblättern fand nicht statt.

Die Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' wurde ebenfalls mit Pollen von *H. paniculata* 'Unique' bestäubt. Nur bei den Präparationen sechs Wochen nach Bestäubung konnten neben den schmalen braunen Samenanlagen auch ovale weiße Samen beobachtet werden. Keimung wurde sowohl auf Medium ER1 als auch Medium ER2 beobachtet. Es entwickelte sich jedoch nur eine Pflanze (nach drei Monaten Kultur auf ER1), die auf drei verklont werden konnte.

Bei der Präparation von Fruchtknoten der Kreuzung von *H. macrophylla* 'Doris' x *H. arborescens* 'Annabelle' wurden zu allen drei Terminen nur schmale durchsichtige Samenanlagen beobachtet, die keine Entwicklung zeigten.

Bei der Kreuzung der Sorte *H. macrophylla* 'Doris' mit der Sorte *H. quercifolia* 'Pee Wee' wurden insgesamt nur 25 Einzelblüten bestäubt. Eine Präparation erfolgte nur nach drei und nach 4,5 Wochen. Zum letzten Termin waren alle Fruchtknoten für die Untersuchungen aufgebraucht, so dass keine Ernte mehr möglich war. Die zu den beiden früheren Terminen präparierten Samenanlagen waren alle schmal und durchsichtig und ohne Entwicklung.

Selbstungen innerhalb der Art *H. macrophylla* wurden mit den Sorten 'Libelle' und 'Blaumeise' durchgeführt. Bei der Präparation der Fruchtknoten und Samen drei Wochen nach Selbstung der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' wurden ausschließlich schmale längliche Samenanlagen beobachtet, die sich ebenso wie die zu Beginn noch grüne Plazenta im weiteren Kulturverlauf braun verfärbten. Keiner dieser Samenanlagen keimte. Bei der Präparation 4,5 sowie sechs Wochen nach Bestäubung wurden neben den oben beschriebenen Samenanlagen auch wenige scheinbar reifere, ovalere weißliche Samen beobachtet. Keimung erfolgte nur aus den sechs Wochen nach Bestäubung

geernteten Samen. Es entwickelten sich nach zwei bis vier Monaten Kultur insgesamt vier Pflänzchen. Zwei der vier Pflänzchen entwickelten sich auf dem ER1 Medium (20 g/l Saccharose) und zwei auf ER2 Medium (45 g/l Saccharose). Es überlebte jedoch nur eine Pflanze (von Medium ER2). Diese konnte auf fünf Pflanzen verklont werden.

Nach Selbstbestäubung der Sorte 'Blaumeise' konnten bei der Fruchtknotenpräparation zu allen drei Terminen neben unreifen auch einige reifere ovalere Samen beobachtet werden. Einige dieser Samen keimten, starben jedoch im Keimlingsstadium ab. Es entwickelte sich nur aus einem Samen, der sechs Wochen nach Bestäubung präpariert wurde, eine Pflanze (auf Medium ER2). Diese konnte erfolgreich verklont werden (10 Pflanzen).

Aus den Selbstungsversuchen mit den Arten *H. paniculata*, *H. quercifolia* und *H. arborescens* konnten nur bei der Sorte *H. paniculata* 'Unique' Pflanzen mit Hilfe des „embryo rescue“-Verfahrens erzielt werden. An allen Präparationsterminen waren neben den schmalen durchsichtigen auch reifere Samenanlagen vorhanden, von denen einige während der weiteren Kultur keimten und sich zu Pflänzchen entwickelten, die auf 1/2 MS-Medium überführt werden konnten. Insgesamt entwickelten sich aus den drei Wochen nach Bestäubung präparierten Fruchtknoten zwei Pflanzen. Eine der Pflanzen konnte erfolgreich auf 10 Pflanzen verklont werden, die andere starb im Verlauf der Kultur ab. Jeweils eine Pflanze konnte aus den "embryo rescue"-Versuchen 4,5 und sechs Wochen nach Bestäubung erzielt und erfolgreich auf sechs (4,5 Wochen nach Bestäubung) bzw. auf fünf (sechs Wochen nach Bestäubung) Pflanzen vermehrt werden.

Die Bestäubung der Sorte *H. quercifolia* 'Pee Wee' mit Pollen derselben Sorte führte innerhalb von drei Wochen zum Absterben fast aller Fruchtknoten, so dass nur vier Fruchtknoten am ersten Termin präpariert werden konnten. Die schmalen Samenanlagen verfärbten sich innerhalb einer Woche braun und anschließend schwarz. Zur Keimung oder Pflanzenentwicklung kam es nicht.

Nach der Selbstung von *H. arborescens* 'Annabelle' konnten zu allen drei Terminen Fruchtknoten präpariert werden. Die Samenanlagen waren zu Beginn länglich und teilweise in der Mitte etwas verdickt. Es konnte jedoch in keinem Fall eine Keimung beobachtet werden.

Bei Präparation der Fruchtknoten von unbestäubten Blüten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' wurden ausschließlich schmale, anfangs durchsichtige, im Verlauf der Kultur

braune Samenanlagen beobachtet, die sehr fest mit der Plazenta verbunden waren und nicht keimten.

### 3.2.5 Weiterkultur der durch Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens gewonnenen Pflanzen

Die aus den Versuchen der ersten Kreuzungsperiode gewonnenen Pflanzen wurden auf 1/2 MS-Medium kultiviert. Die Bewurzelung der Pflanzen erfolgte ohne Wechsel der Medienzusammensetzung. Die Nachkommen aus beiden reziproken Kreuzungskombinationen zwischen *H. macrophylla* 'Doris' und 'Libelle' konnten mit einer Erfolgsrate von 100 % an die Gewächshausbedingungen angepasst werden (Tabelle 3-18). In Abbildung 3-19 sind die intermediären Blüteneigenschaften der ersten Tochtergeneration der Kreuzungen gezeigt. Die angewendete Bestäubungstechnik (Kastration etc.) war offensichtlich geeignet Kreuzungen erfolgreich durchzuführen.

Die Nachkommen der Kreuzung *H. macrophylla* 'Doris' mit *H. macrophylla* 'Blaumeise' starben im Verlauf der Kultur ab. Nach der Selbstung der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' konnte durch "embryo rescue" die Entwicklung von insgesamt 42 Pflanzen beobachtet werden. Diese starben jedoch zum Großteil noch während der Kultur auf den ER-Medien ab, so dass nur vier Pflanzen auf 1/2 MS-Medium in Glasgefäßen überführt werden konnten. Nach Wurzelbildung erfolgte die Überführung ins Gewächshaus. Erfolgreich akklimatisiert werden konnte eine Pflanze (Tabelle 3-18). Ebenfalls erfolgreich in Erde überführt werden konnte die Pflanze, die aus den Selbstungen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' gewonnen werden konnte. Während der Kultur der Fruchtknoten nach Selbstung der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' hatten sich sechs Pflanzen entwickelt. Diese konnten auf 11 Pflanzen vermehrt werden. Alle konnten erfolgreich akklimatisiert werden. Im weiteren Kulturverlauf starben jedoch vier Pflanzen ab (Tabelle 3-18). Aus den Fruchtknoten der Sorte *H. macrophylla* 'Doris' nach Selbstung entwickelten sich acht Pflanzen *in vitro*. Fünf dieser Pflanzen überlebten nicht, so dass drei Pflanzen ins Gewächshaus überführt wurden (Tabelle 3-18). Die Akklimatisierung war bei einer Pflanze erfolgreich. Alle akklimatisierten Pflanzen wurden an den Projektpartner, die Firma Synergy Breeding, zur weiteren züchterischen Bearbeitung abgegeben.



Tabelle 3-18: Weiterkultur der Pflanzen aus "embryo rescue"-Versuchen in der ersten Kreuzungsperiode (2006)

Mutterpflanze	Pollenspender	Anzahl vitaler Pflanzen nach sechs Monaten	Anzahl in Erde überführter Pflanzen	Anzahl erfolgreich akklimatisierter Pflanzen	Anzahl Pflanzpartner abgegeben
<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	281	281	281	281
<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	65	65	65	65
<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	4	0	0	0
<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	42	4	1	1
<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	1	1	1	1
<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	6	11	11	7
<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	8	3	1	1



**Abbildung 3-19: Intermediäre Blüteneigenschaften der Nachkommen aus beiden reziproken Kreuzungskombinationen zwischen *H. macrophylla* 'Doris' und 'Libelle'**

A: *H. macrophylla* 'Doris'

B: *H. macrophylla* 'Libelle'

C bis F: F<sub>1</sub>-Generation der Kreuzung *H. macrophylla* 'Doris' x *H. macrophylla* 'Libelle'

G bis J: F<sub>1</sub>-Generation der Kreuzung *H. macrophylla* 'Libelle' x *H. macrophylla* 'Doris'

(Balken entsprechen 1 cm)

In Tabelle 3-19 sind die Anzahl der Pflanzen dargestellt, die durch das "embryo rescue"-Verfahren in der zweiten Kreuzungsperiode gewonnen werden konnten und sechs Monate nach der Präparation der Fruchtknoten noch vital waren.

Tabelle 3-19: Anzahl Pflanzen aus "embryo rescue"-Versuchen in der zweiten Kreuzungsperiode (2007), die sechs Monate nach Präparation noch vital waren

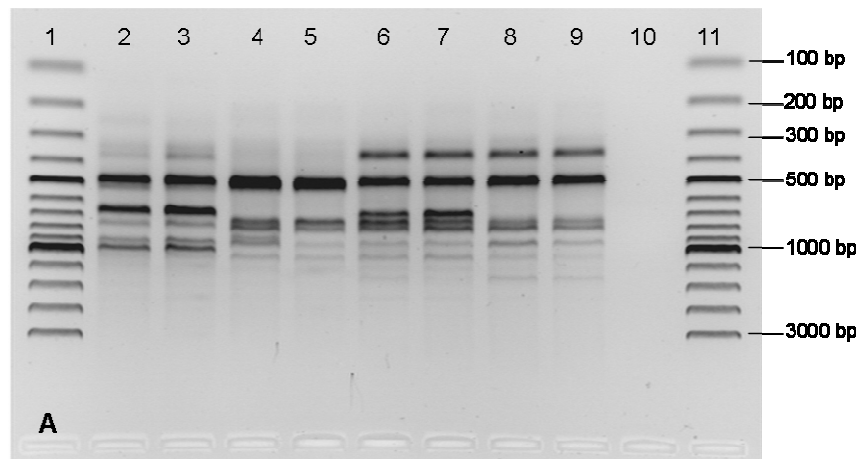
		Pollenspender						
		<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'	<i>H. macrophylla</i> 'Adria'	<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'	<i>H. macrophylla</i> 'Doris'	<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	<i>H. quercifolia</i> 'Pee Wee'	<i>H. paniculata</i> 'Unique'
<i>H. macrophylla</i> 'Libelle'		Klon1: 5			diverse Klone: 81			
<i>H. macrophylla</i> 'Adria'							Klon1: 0	Klon1: 9 Klon2: 1
<i>H. macrophylla</i> 'Blaumeise'				Klon: 10				Klon1: 3
<i>H. macrophylla</i> 'Doris'								
<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'								
<i>H. quercifolia</i> 'Pee Wee'								
<i>H. paniculata</i> 'Unique'								Klon1: 10 Klon2: 6 Klon3: 5
Mutterpflanze								

Alle In-vitro-Pflanzen aus der Kreuzung von *H. macrophylla* 'Libelle' mit *H. macrophylla* 'Doris' sowie aus den Selbstungen der Sorten *H. macrophylla* 'Libelle', *H. macrophylla* 'Blaumeise' und *H. paniculata* 'Unique' wurden in Kulturbechern mit 1/2 MS-Medium mit B5-Vitaminen und 0,2 mg/l BAP erfolgreich weiterkultiviert und anschließend an den Kooperationspartner, die Firma Synergy Breeding, zur weiteren züchterischen Bearbeitung abgegeben.

Die ebenfalls auf oben genanntem Medium (jedoch ohne BAP) vermehrten potentiellen Hybridsprosse aus der Kreuzung *H. macrophylla* 'Adria' x *H. paniculata* 'Unique' waren sehr schwachwüchsig und zeigten schnell Verbräunungen an den älteren Blättern. Um das Wachstum der Pflanzen zu fördern und eine höhere Vitalität zu erzielen, wurden die Sprosse auf verschiedene Medien überführt. So wurde versucht, durch Zugabe von 1 mg/l GA<sub>3</sub> die Streckung der Pflanzen zu fördern. Außerdem wurde die Zugabe von 5 g/l Aktivkohle in das Medium getestet. Weiterhin wurde die Zusammensetzung der Nährsalze variiert. Anstelle der Nährsalzformulierung nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) wurde eine Nährsalzkombination nach LLOYD UND MCCOWN (1980) (Tabelle 2-4) sowie nach GAMBORG ET AL. (1968) (Tabelle 2-3) jeweils in halber Konzentration verwendet. Durch keines der verwendeten Medien konnte die Verbräunung bzw. das Absterben der Pflänzchen verhindert werden. Daher wurde die Kultur in temporärer Immersion in RITA<sup>®</sup>-Gefäßen (Vgl. Kapitel 2.1.5.5) getestet. Als Nährmedium wurde WPM-Medium (Tabelle 2-4) mit B5-Vitaminen (Tabelle 2-7) und 1 mg/l GA<sub>3</sub> verwendet. Zusätzlich zu den potentiellen Hybriden wurden Pflanzen der Sorte *H. paniculata* 'Unique' in den Gefäßen kultiviert, um so eventuell einen positiven Einfluss auf die Entwicklung und das Wachstum der Hybridkandidaten zu bewirken. Zwei der drei in RITA<sup>®</sup>-Gefäße überführten Hybridkandidaten starben ab, die letzte Pflanze zeigte ebenfalls kein Wachstum, kontaminierte im Verlauf der Kultur und starb ebenfalls ab. Versuche, DNA aus den potentiellen Hybridpflanzen zu isolieren, schlugen aufgrund der geringen Menge an Pflanzenmaterial fehl.

### **3.2.6 Molekulargenetische Untersuchung der Selbstungsnachkommen**

Während keine DNA aus Material der potentiellen Hybridpflanzen isoliert werden konnte, war dies bei den Selbstungsnachkommen ohne Probleme möglich. Das mit RAPD-Primern erzeugte Bandenmuster der Sorten von *H. macrophylla* war sehr ähnlich (Abbildung 3-20). Es ist eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Sorten und den potentiellen Selbstungsnachkommen erkennbar.



**Abbildung 3-20: Untersuchung der Selbstungsnachkommen mittels RAPD-Analyse und Verwendung des Primers B3 (A)**

1 und 11 -Größenstandard, 2 - *H. paniculata* 'Unique', 3 - *H. paniculata* 'Unique' Selbstungsnachkomme, 4 - *H. macrophylla* 'Libelle', 5 - *H. macrophylla* 'Libelle' Selbstungsnachkomme, 6 - *H. macrophylla* 'Blaumeise', 7 - *H. macrophylla* 'Blaumeise' Selbstungsnachkomme, 8 - *H. macrophylla* 'Adria', 9 - *H. macrophylla* 'Adria' Selbstungsnachkomme, 10 - Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

### 3.3 Diskussion

#### 3.3.1 Pollenlagerung

Die Lagerung von Pollen ist bei zeitlich stark von einander abweichenden Blütezeitpunkten nützlich, um Kreuzungen realisieren zu können, ohne zwingend auf eine blühende Pflanze angewiesen zu sein. Um diese Möglichkeiten auch bei der Züchtung von *Hydrangea* zu nutzen, wurde der Einfluss der Lagertemperatur (24, 4 und -18 °C) auf die Vitalität und die Keimung in vitro von Pollen zweier *H. macrophylla* Sorten ('Blaumeise' und 'Libelle') sowie von *H. arborescens* 'Annabelle' untersucht. Die Bestimmung der Pollenvitalität erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes MTT. RODRIGUEZ-RIANO UND DAFNI (2000) untersuchten vier Färbemethoden zum Nachweis von vitalen Pollen bei acht Pflanzenarten. Während zwei Methoden auch abgetöteten und somit nicht vitalen Pollen färbten, war die Färbung mit MTT bei allen untersuchten Arten zum Nachweis vitaler Pollen geeignet und wurde daher in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Während die Lagerung bei Raumtemperatur schnell zum Vitalitäts- und Keimverlust der Pollen führte, war die Lagerung bei tieferen Temperaturen geeigneter. Erwartungsgemäß nahmen sowohl die Vitalität als auch die Keimrate in allen Temperaturvarianten über den Beprobungszeitraum ab, aber die Lagerung bei -18 °C führte zu einer höheren Anzahl vitaler und keimfähiger Pollen als die Lagerung bei höheren Temperaturen (Abbildung 3-5, Abbildung 3-6, Abbildung A 18 bis Abbildung A 21).

KUDO UND NIIMI (1999a) lagerten Pollen von vier *H. macrophylla* Sorten ('Blue diamond', 'Haruna', 'Eisvogel' und 'Blue sky') sowie von zwei *H. arborescens* Sorten ('Annabelle' und 'Grandiflora') bei 5 und - 20 °C ebenfalls über einen Zeitraum von einem Jahr. Die Lagerung erfolgte mit CaCl<sub>2</sub> (Anm.: ohne Applikationsbeschreibung). Auch in diesen Versuchen war die Lagerung bei niedrigeren Temperatur der Lagerung bei 5 °C, die zum Verlust der Pollenkeimfähigkeit in vitro innerhalb von fünf Monaten führte, deutlich überlegen. Im Gegensatz zu den eigenen Versuchen, bei denen gelagerter Pollen der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' nach 12 Monaten eine Pollenkeimrate von über 30 % (- 18 °C) hatte, war der Pollen der beiden von KUDO UND NIIMI (1999a) untersuchten *H. arborescens* Sorten nach 11 Monaten nicht mehr keimfähig.

Die Lagerung von Pollen scheint, zumindest bei den beiden untersuchten Arten, ohne Probleme möglich zu sein. Inwiefern die Keimfähigkeit dieser gelagerten Pollen ausreichend für erfolgreich Bestäubungen ist, muss noch getestet werden. Da aber Handbestäubungen durchgeführt werden und dabei eine Vielzahl von Pollen aufgetragen

wird und somit ein hohes Pollen/Eizellen Verhältnis gegeben ist, wird von einer erfolgreichen Bestäubung ausgegangen.

LORA ET AL. (2006) lagerten Pollen von Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) bei -20, -80 und -196 °C. Nach drei Monaten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Lagerungstemperaturen beobachtet werden. Die Pollenkeimraten betragen unabhängig von der Lagertemperatur zwischen 10,4 und 14,2 %. Anschließend Bestäubungsversuche mit gelagertem und frisch geerntetem Pollen waren sehr erfolgreich. Sowohl bei gelagertem als auch bei frisch geerntetem Pollen war an circa 60 % der Blüten die Bildung von Früchten zu verzeichnen.

Neben dem Temperatureinfluss ist auch die Luftfeuchtigkeit während der Lagerung von Bedeutung. Die Lagerung von getrocknetem Walnusspollen (*Juglans regia* L.) führte bei einer Lagerung bei - 20 C in geschlossenen Gefäßen ohne Regulation der Luftfeuchtigkeit zu einem kompletten Verlust der Keimfähigkeit in vitro (LUZA UND POLITO 1985). Erfolgte jedoch die Lagerung bei gleicher Temperatur und bei einer konstanten relativen Luftfeuchte von 30 % konnte die Keimfähigkeit, wenn auch auf einem niedrigerem Niveau, erhalten werden.

### **3.3.2 Intraspezifische Kreuzungen innerhalb der Art *H. macrophylla***

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines In-vitro-Protokolls, das die Gewinnung von Hybriden durch Anwendung von "embryo rescue" ermöglicht. In ersten Versuchen wurden hierfür intraspezifische Kreuzungen durchgeführt. Da diese in der Regel kompatibel sind, wurden die vitalen Samenanlagen (Embryonen) für die Identifikation eines Nährmediums, das im Anschluss für die Kultur unreifer Samenanlagen aus Hybridisierungen und Selbstungen von *Hydrangea spec.* verwendet werden sollte, genutzt. Neben zwei verschiedenen Saccharosegehalten (2 und 4,5 %) des Mediums (1/2 B5-Medium ohne Wachstumsregulatoren), wurden Samenanlagen unterschiedlicher Reife (drei, 4,5 und sechs Wochen nach Bestäubung) in die Untersuchungen einbezogen. Außerdem wurden die intraspezifischen Kreuzungen genutzt, um die Pollenkeimung auf der Narbe und das Pollenschlauchwachstum sowie die Entwicklung der Samenkapseln an der Pflanze und die Entwicklung der durch "embryo rescue" gewonnen Pflanzen nach kompatiblen Kreuzungen zu untersuchen und so mögliche Unterschiede zu interspezifischen Kreuzungen und Selbstungen zu erkennen.

Die Interaktionen zwischen dem Sporophyten und den gametophytischen Zellen sind die Grundlage für eine erfolgreiche Bestäubung. Daher erfolgt zunächst eine kurze

Zusammenfassung der molekulargenetischen und biochemischen Erkenntnisse bei kompatiblen Bestäubungen.

Eine kompatible Bestäubung umfasst die Anheftung des Pollens an die Narbe, die Hydrierung des Pollens, die Keimung sowie Penetration in den Griffel, das Pollenschlauchwachstum durch den Griffel bis zum Fruchtknoten und das Eindringen des Pollenschlauches in die Samenanlage und Entlassung der beiden männlich Spermazellen in den Embryosack und letztendlich die doppelte Befruchtung.

Bei der Anlagerung der Pollen treten Moleküle der Pollenhülle in Interaktion mit der Narbe (DICKINSON ET AL. 2000). In *Brassicaceae* spielen dabei Proteine eine Rolle, die auch in die Selbstinkompatibilitätsreaktionen involviert sind (DOUGHTY ET AL. 2000, TAKAYAMA ET AL. 2000). Nach der Pollenanlagerung erfolgt die Hydrierung der Pollen. Bei Vorhandensein von Exsudaten auf der Narbenoberfläche werden alle Pollenkörner hydriert. Bei trockenen Narben, die ohne Exsudate auf der Oberfläche sind, erfolgt eine Hydrierung erst nach Erkennung von spezifischen Pollenfaktoren (LORD 2003). Bei *Arabidopsis* sind Lipasen und Oleosine (Strukturproteine) der Pollenhülle involviert. Es konnte gezeigt werden, dass bei Verlust eines Oleosins bzw. bei fehlenden langkettigen Lipiden die Hydrierung der Pollen vermindert war (MAYFIELD UND PREUSS 2000, FIEBIG ET AL. 2000). Ist die Erkennung des spezifischen Pollenfaktors erfolgt, wird der Pollen durch einen kontrollierten Wassereinstrom von der Narbe in das Pollenkorn hydriert (LORD 2003).

Die Keimung des Pollens erfolgt durch die Ausbildung des Pollenschlauches. Dieser wächst ausschließlich an der Pollenschlauchspitze (KRICHEVSKY ET AL. 2007). In der Pollenschlauchspitze befinden sich die Spermazellen im Cytoplasma. Das Cytoplasma wird durch Ausbildung von Callosepfropfen vom hinteren Teil des Pollenschlauches abgetrennt, so dass es auf den vorderen Bereich des Pollenschlauches konzentriert bleibt (MASCARENHAS 1993).

Bei trockenen Narben tritt der Pollenschlauch am Ort der Anlagerung in den Griffel ein (LORD 2003). Hierfür ist eine Zersetzung der Narbencuticula durch Enzyme (z. B. Kutinase (HISCOCK ET AL. 1994), Polygalacturonase (DEARNALEY UND DAGGARD 2001), Pektinesterase (MU ET AL. 1994)) des Pollens nötig. Die extrazelluläre Matrix auf feuchten Narben ermöglicht das Pollenschlauchwachstum auf der Narbe vor Penetration in den Griffel. Bei *Nicotiana* existiert in der lipidhaltigen Matrix ein Wasserpotential, das den Eintritt des Pollenschlauches durch die Exsudationskanäle physikalisch fördert (WOLTERS-ARTS ET AL. 1998). Bei *Lilium* wurde ein Signalmolekül („stigma/stylar



cysteine-rich adhesin“, SCA) identifiziert, das eine Doppelfunktion hat (LORD UND RUSSEL 2002). Zum einen wirkt es als chemotrophes Signal, das die Pollenschläuche auf der Narbenoberfläche zur Öffnung des Griffels leitet (LORD 2003). Zum anderen hat es im Griffel in Verbindung mit Pektin eine haptotaktische Funktion und leitet auf diese Weise die Pollenschläuche durch den Griffel zum Fruchtknoten (MOLLET ET AL. 2000, PARK ET AL. 2000). Ob SCA dort auch auf die Pollenschlauchleitung wirkt, ist derzeit noch unklar (LORD 2003).

Bei *Nicotiana* wurde in der extrazellulären Matrix des Griffels ein Protein identifiziert (TTS), das die Pollenschlauchleitung chemotroph durch Ausbildung eines Gradienten beeinflusst (WHEELER ET AL. 2001). Bei *Petunia* sind im Griffel Pektine vorhanden, denen ebenfalls eine Rolle bei der Leitung der Pollenschläuche zugeschrieben wird (LENARTOWSKA ET AL. 2001). Die Pektine binden vor der Bestäubung  $\text{Ca}^{2+}$ . Durch Pektinasen, die sowohl vom Pollenschlauch abgesondert werden als auch in der extrazellulären Matrix des Griffels vorhanden sind, können Pektine abgebaut werden. Es wird vermutet, dass die freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Pollenschlauchwand eingebaut werden (LORD 2003). Auch in In-vitro-Studien war die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  ins Medium essentiell für das Wachstum der Pollenschläuche (LORD 2003), in der Narbe ist jedoch keine Quelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bekannt (LORD 2003).

Im Fruchtknoten hat vermutlich das Plazentagewebe Einfluss auf die Richtung des Pollenschlauchwachstums. Bei *Torenia fournieri* konnte gezeigt werden, dass die Synergiden eine chemotroph wirkende Substanz absondern, und so die Pollenschläuche zu den Eizellen zu leiten (HIGASHIYAMA ET AL. 1998, 2001). Die Pollenschläuche dringen durch die Mikropyle in die Samenanlage ein und entlassen nach Erreichen des Embryosackes die beiden männlichen Gameten in eine der Synergiden. Aus der doppelten Befruchtung gehen die diploide Zygote, die sich zum Embryo entwickelt, und das triploide Endosperm hervor (FAURE 1999). Das Endosperm hat hauptsächlich eine Nährfunktion (LOPES UND LARKINS 1993).

In den eigenen Versuchen wurden nach kompatiblen Kreuzungen befruchtete Samenanlagen zur Identifikation eines Nährmediums, das für die Kultur unreifer Samenanlagen geeignet ist, verwendet. Eine eindeutig bessere Eignung eines Medium für die Gewinnung von Pflanzen nach "embryo rescue" konnte nicht nachgewiesen werden. Beide verwendeten Saccharosekonzentration (2 bzw. 4,5 %) führten bei der Präparation von Fruchtknoten sechs Wochen nach Bestäubung zur Entwicklung von durchschnittlich

sechs Pflanzen je Fruchtknoten (Tabelle 3-15). Bei der Kultur von jüngeren Samenanlagen auf beiden Medien konnte zwar Pflanzenentwicklung beobachtet werden, die Anzahl war jedoch deutlich geringer. Demzufolge sind diese Medien für die Kultur älterer Samenanlagen geeigneter. Auch durch die Verwendung von BAP und IAA bzw. durch Verwendung eines 1/2 MS-Mediums (MURASHIGE UND SKOOG 1962) konnte keine Verbesserung erzielt werden (Tabelle 3-16).

REED (2000b) untersuchte bei acht intraspezifischen Kreuzungen von *H. macrophylla* die Keimung von präparierten Samenanlagen auf Medien (MS und B5-Medien) mit 2, 8 und 12 % Saccharose. Sowohl für Samenanlagen, die drei bis vier Wochen als auch für Samenanlagen, die fünf bis sechs Wochen nach Bestäubung präpariert wurden, war ein B5-Medium mit der geringsten Saccharosekonzentration am besten geeignet.

Die Untersuchungen zur Pollenkeimung auf der Narbe zeigten, dass bereits nach einem Tag eine Vielzahl der Pollen gekeimt und weit in den Griffel eingewachsen war. Nach spätestens zwei Tagen hatten die Pollenschläuche den Bereich der Samenanlagen erreicht (Abbildung 3-7). Ausnahme war die Kreuzung *H. macrophylla* 'Blaumeise' x 'Doris', im Gegensatz zur reziproken Kreuzung war das Pollenschlauchwachstum hier nur bis in den Griffel verfolgbar (nach 72 h). Da sowohl in den Fruchtknoten, die für das "embryo rescue"-Verfahren präpariert wurden, als auch in den Samenkapseln, die sich an der Pflanze entwickelten, nur schmale, nicht keimende Samenanlagen beobachtet wurden, wird davon ausgegangen, dass diese Kreuzung nicht kompatibel ist. Ursächlich könnte die unterschiedliche Ploidie der Kreuzungspartner sein, die Sorte 'Doris' ist diploid und die Sorte 'Blaumeise' triploid. Dies kann zu einem verlangsamten Wachstum des Pollenschlauches führen. Wurde jedoch Pollen der triploiden Sorte 'Blaumeise' zur Bestäubung genutzt, wuchsen die Pollenschläuche bis in den Bereich der Samenanlagen, dies war insofern nicht erwartet, da es bei polyploiden Pflanzen häufig zu Störungen bei der Chromosomenpaarung während der Meiose kommt. Bei Rosenarten der Sektion *Caninae*, die zumeist pentaploid ( $2n = 35$ ) sind, kommt es zu einer besonderen Form der Meiose (BLACKBURN UND HARRISON 1921, TÄCKHOLM 1922). Es erfolgt eine asymmetrische Aufteilung der Chromosomen in den Geschlechtszellen (balancierte Heterogamie). Zwei der fünf Chromosomensätze paaren sich und bilden Bivalente. Die restlichen 21 Chromosomen bleiben ungepaart (Univalente). Während der Meiose kommt es zur ungleichen Verteilung der Chromosomen und es entstehen Pollenkörner mit sieben paarungsfähigen Chromosomen und Pollenkörner mit einer unbestimmten Anzahl an Univalenten. Die Pollenkörner, die Univalente enthalten sind nicht lebensfähig und de-

generieren. Durch diesen Mechanismus wird der Pollen, der pentaploiden Pflanzen, haploid erhalten. Erkenntnisse darüber ob es einen ähnlichen Mechanismus auch bei *Hydrangea* gibt, könnten detaillierte mikroskopische Untersuchungen der Pollenmeiosen liefern.

Die Untersuchungen bei intraspezifischen Kreuzungen zeigten, dass die verwendete Methode zum "embryo rescue" für die Kultur unreifer Samen geeignet ist, und diese wurde ohne Änderung bei den interspezifischen Kreuzungen angewendet.

### 3.3.3 Interspezifische Kreuzungen von *Hydrangea spec.*

Es wurden die reziproken Kreuzungskombinationen zwischen *H. macrophylla* und den Arten *H. arborescens* 'Annabelle', *H. paniculata* 'Unique' sowie *H. quercifolia* 'Pee Wee' durchgeführt (Tabelle 3-6). Bei Verwendung von *H. macrophylla* als Pollenspender kam es weder zur Anhaftung noch zur Keimung von Pollen auf der Narbe der drei untersuchten Arten. Ausnahme war die Kreuzung von *H. arborescens* 'Annabelle' und *H. macrophylla* 'Adria', bei der wenige Einzelpollen auf einigen wenigen Narben sichtbar waren, deren extrem kurzer Pollenschlauch jedoch nicht in die Narbe einwuchs (Abbildung 3-11 A-C). Aufgrund des größtenteils völlig fehlenden Pollens auf der Narbe von *H. arborescens* 'Annabelle' wird hier nicht von einer Hybridisierungsincompatibilität aufgrund von genetischer oder biochemischer Reaktion, sondern aufgrund von morphologischen Ursachen ausgegangen. Die Untersuchung der Pollengröße und der Narbenpapillen kann hier Aufschluss darüber geben, ob z. B. der Pollen zu groß war und es daher zu keiner Anlagerung kam. Dementsprechend entwickelten sich nach Bestäubung keine Samenkapseln an den Pflanzen und bei Präparation der Fruchtknoten drei bis sechs Wochen nach Bestäubung wurden nur schmale, nicht befruchtete Samenanlagen gefunden. Auch bei Hybridisierungsversuchen von REED (2000a), bei denen 13 Kreuzungskombinationen zwischen *H. paniculata* und *H. macrophylla* sowie drei Kombinationen zwischen *H. quercifolia* und *H. macrophylla* untersucht wurden, blieb die Entwicklung von Samen aus. Die ebenfalls von REED (2000a) durchgeführten Kreuzungen zwischen *H. arborescens* und *H. macrophylla* führten in einer (*H. arborescens* 'Annabelle' x *H. macrophylla* 'Blue Billow') von drei untersuchten Kreuzungskombinationen zur Entwicklung von Samenkapseln mit scheinbar reifen Samen, deren Keimung ex vitro jedoch ausblieb. Untersuchungen zur Pollenkeimung auf der Narbe bzw. zum "embryo rescue" wurden nicht durchgeführt. Laut Berichten von KUDO UND NIIMI (1999a) konnten nach

Hybridisierung von *H. arborescens* 'Annabelle' mit vier Sorten von *H. macrophylla* nach Kultur unreifer Samenanlagen *in vitro* geringe Keimraten (zwischen 0 und 8,9 %) beobachtet werden. Allerdings entwickelte sich nur bei einer Kreuzung (*H. arborescens* 'Annabelle' x *H. macrophylla* 'Blue diamond') ein Sämling, der jedoch im Kotyledonenstadium abstarb.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Verwendung von *H. macrophylla* als maternaler Elter unabhängig vom verwendeten Kreuzungspartner immer Pollenkeimung und das Einwachsen bis in unterschiedliche Bereiche des Griffels beobachtet werden. Die Pollenschläuche von *H. arborescens* 'Annabelle' waren nach 48 h bis in den Griffel gewachsen. In diesem Bereich stoppte das Wachstum der meisten Schläuche und nur in Ausnahmen waren einzelne Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen nach 72 bzw. 96 h sichtbar. Dies war bei Kreuzungen der Fall, bei denen in drei bis sechs Wochen nach Bestäubung präparierten Fruchtknoten, neben schmalen auch wenige ovale Samenanlagen vorhanden waren. Keimung konnte jedoch nie beobachtet werden. Die Samenkapseln, die sich nach jeder der Kreuzungen bildeten, enthielten nur schmale, abortierte Samenanlagen. Diese Beobachtungen wurden auch bei Hybridisierungen mit Pollen von *H. quercifolia* 'Pee Wee' gemacht. Jedoch mit einer Ausnahme, nach Kreuzung mit *H. macrophylla* 'Adria' und anschließender Kultur von Samenanlagen nach "embryo rescue" entwickelte sich ein Pflänzchen. Dieses war jedoch sehr schwachwüchsig und starb innerhalb von vier Monaten ab. Im Gegensatz hierzu konnten nach Kreuzung von *H. macrophylla* 'Adria' bzw. 'Blaumeise' mit *H. paniculata* 'Unique' durch Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens Pflanzen gewonnen werden. Diese waren ebenfalls wenig vital und schwachwüchsig. Durch Überführung auf verschiedene Nährmedien, sowie durch die Kultur im RITA-Gefäß bei temporärer Immersion (TIS) wurde versucht, das Wachstum der Pflanzen zu fördern. Dies ist jedoch nicht gelungen, die Pflanzen starben ab, so dass eine Verifizierung des Hybridstatus nicht möglich war.

Das Absterben bzw. die Schwachwüchsigkeit von Hybriden tritt bei vielen Arten auf (z. B. bei *Triticum*: HERMSEN 1967, *Phaseolus*: SHII ET AL. 1980). Der molekulare Wirkmechanismus der Hybridlethalität ist weitestgehend noch unbekannt. Das Dobzhansky-Muller Modell (DOBZHANSKY 1937, MULLER 1942 in BOMBLIES UND WEIGEL 2007) führt die Inkompatibilitätsreaktion auf die Wirkung von Genen zurück, die einen gemeinsamen Ursprung haben, sich jedoch evolutionär in unterschiedlichen Arten unterschiedlich entwickelt haben. Während das einzelne Gen im Genom der jeweiligen Pflanze normal wirkt, ist die Wirkweise beider Gene im Hybridgenom antagonistischer

Natur und bedingt die Letalität. Die Identifizierung und die Kartierung solcher Gene ist bereits für einige Pflanzen erfolgt (z.B. bei *Triticum*: CHU ET AL. 2006, *Gossypium*: SONG ET AL. 2009, *Arabidopsis*: BOMBLIES ET AL. 2007). Die Struktur und die Funktion der Gene sind jedoch noch weitestgehend unbekannt.

An den bestäubten Pflanzen im Gewächshaus kam es zwar zur Bildung von Samenkapseln, diese enthielten jedoch nur schmale Samenanlagen, die nicht keimten. Da bei frühzeitiger Entnahme der Samenanlagen und Kultur auf Nährmedien aber ovale Samenanlagen mit Embryonen beobachtet wurden wird vermutet, dass neben einem Inkompatibilitätsmechanismus, der das Pollenschlauchwachstum zumeist im Griffel stoppte auch ein postzygotischer Mechanismus wirksam ist, der erst später, nämlich bei Entwicklung und Reifung des Embryos zum Tragen kommt (z. B. Embryo-Endosperm-Inkompatibilität oder unzureichende Entwicklung des Endosperms und somit keine ausreichende Versorgung des Embryos).

REED (2000a) konnte nach Hybridisierungen von *H. macrophylla* mit *H. paniculata* bzw. *H. quercifolia* an den Pflanzen den Ansatz von Samenkapseln mit reifen Samen beobachten. Einige dieser Samen keimten bei Aussaat ex vitro, starben jedoch im Kotyledonenstadium bzw. nach Bildung des ersten Blattpaares ab. In anschließenden Versuchen wurde eine "embryo rescue"-Methode entwickelt (REED 2000b). Die Kultur der Samen erfolgte auf einem wachstumsregulatorfreien Medium nach GAMBORG ET AL. (1968). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde dieses Medium jedoch in voller Nährstoffkonzentration verwendet. Pflanzen die sich aus Samenanlagen, die REED (2000b) drei bis sechs Wochen nach Bestäubung kultiviert hatte, entwickelten starben ausnahmslos in einem sehr frühen Entwicklungsstadium ab. Die Gewinnung potentieller Hybriden gelang aus Samenanlagen die neun bis zehn Wochen nach Bestäubung präpariert wurden. Auch in den eigenen Untersuchungen war auffällig, dass die Pflanzen aus den unreifsten Samenanlagen (drei Wochen nach Bestäubung präpariert) zu einem deutlich früheren Zeitpunkt abstarben als die etwas reiferen Samenanlagen (sechs Wochen nach Bestäubung präpariert). Das verwendete Nährmedium ist demzufolge für die Kultur von etwas reiferen Samenanlagen geeignet. Für die Kultur jüngerer Samenanlagen bedarf esweiterer Medienanpassungen. Da die Kultur junger Embryonen in der Regel auf Medien mit hohem Saccharosegehalt erfolgreicher ist (BRIDGEN 1994, SHARMA ET AL. 1996) schlägt REED (2000b) eine anfängliche Kultur der unreifen Samenanlagen auf Medien mit hoher Saccharosekonzentration vor, umso möglicher-

weise die Keimrate zu erhöhen. Die Weiterkultur sollte dann auf einem Nährmedium mit reduziertem Saccharosegehalt geschehen.

Jüngste phylogenetische Untersuchungen mit Hilfe molekularer Marker (RINEHART ET AL. 2006) gruppieren die drei Arten *H. arborescens*, *H. quercifolia* und *H. paniculata* nah beieinander und relativ weit entfernt von *H. macrophylla*. Wesentlich näher verwandt sind *H. macrophylla* und *H. serrata*, aber auch *H. luteovenosa*, *H. lobbii* und *H. angustipetala* zeigen genetische Ähnlichkeiten zu *H. macrophylla*. Hybridisierungen innerhalb dieser Gruppe sind vermutlich erfolgreicher.

Durch die Anwendung der "embryo rescue"-Technik in den eigenen Versuchen konnte bei einigen Kreuzungen die Inkompatibilität kurzfristig überwunden werden und dies bietet die Grundlage für Versuche zur Steigerung der Vitalität bzw. zur Überwindung der Hybridletalität. KUDO UND NIIMI (1999b) berichten über die erfolgreiche Regeneration von Hybridpflanzen, aus Kallus von Kotyledonen der Embryonen, die sich nach Kreuzung von *H. macrophylla* und *H. arborescens* entwickelt hatten. Auch in den eigenen Untersuchungen konnte Kallusbildung an Stängeln und Blättern einiger potentieller Hybriden beobachtet werden. Die Regeneration von Pflanzen aus diesem Kallus könnte eine Möglichkeit darstellen, das Problem der Letalität zu überwinden.

### 3.3.4 Selbstungen von *Hydrangea spec.*

In der Literatur gibt es gegensätzliche Berichte über die Selbstkompatibilität bzw. -inkompatibilität bei *Hydrangea*. Während KUDO UND NIIMI (1999a) nach Selbstungen von *H. macrophylla* und *H. arborescens* eine große Anzahl keimender Samen erhielten, konnten in Selbstungsversuchen mit *H. macrophylla*, *H. paniculata* und *H. quercifolia* von REED (2000a) nur sehr wenige lebensfähige Samen geerntet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Selbstungen mit allen vier Arten durchgeführt.

Samenkapseln entwickelten sich nur nach Selbstungen von *H. macrophylla* 'Blaumeise' und 'Doris'. Die darin enthaltenen Samen keimten jedoch nicht. Bei allen anderen Selbstungen entwickelten sich keine Samenkapseln. Dies lässt eine Selbstinkompatibilität vermuten.

Die Selbstinkompatibilität ist in den meisten Fällen durch einen multiallelen S-Genlocus kontrolliert. Die Gene dieses Locus codieren Faktoren (S-Genprodukte), die zum einen im Griffel und zum anderen im Pollen zur Wirkung kommen. Die Interaktion beider Faktoren bedingt die Selbstinkompatibilität (WHEELER ET AL. 2001). Bei der sporophytischen Selbstinkompatibilität beeinflusst der Genotyp des Pollenelters (Sporophyt) die

Inkompatibilitätsreaktion (DIXIT UND NASRALLAH 2001). Das S-Genprodukt wurde hier in den Papillen der Narbe lokalisiert. Es handelt sich um eine transmembrane S-rezeptor-Kinase. In der Pollenhülle wurde ein cysteinreiches Protein identifiziert, dass in die Selbstinkompatibilität involviert ist (SCHOPFER ET AL. 1999, SHIBA ET AL. 2001). Man geht davon aus, dass die Interaktion zwischen der S-Rezeptor-Kinase der Narbe und dem cysteinreichen Protein der Pollenhülle zur Ablehnung des Pollens führt (KACHROO ET AL. 2001).

Bei Vorhandensein einer gametophytischen Selbstinkompatibilität hängt die Erkennungsreaktion vom haploiden Pollengenotyp (Gametophyt) ab (WHEELER ET AL. 2001). Es sind zwei Arten gametophytischer Selbstinkompatibilität bekannt. Ein System wurde in *Papaveraceae* gefunden. Durch die Interaktion eines S-Proteins der Narbe mit einem noch unbekanntem S-Genlocusprodukt im Pollenschlauch wird eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bedingte Signalkette im Pollenschlauch ausgelöst. Diese Signalkette führt durch den Abbau von F-Aktin zu einer Art vorprogrammierten Zelltod und zum Stoppen des Pollenschlauchs auf der Narbe (*Papaver* hat keinen Griffel) (WHEELER ET AL. 2001).

Das zweite gametophytische Selbstinkompatibilitätssystem wurde in *Solanaceae* gefunden. Im Griffel wurden hier RNasen identifiziert, die für den Abbau von Ribosomen im Pollenschlauch verantwortlich sind (MCCUBBIN UND KAO 2000). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass ein F-Box Protein der bestimmende Faktor im Pollen ist (SIJACIC ET AL. 2004). F-Box Proteine fördern den Proteinabbau (CRAIG UND TYERS 1999). Es wird daher vermutet, dass es sich um einen RNase-Inhibitor handelt, der alle RNasen außer denen, die auch im Pollen kodiert vorliegen, hemmt (LORD UND RUSSEL 2002, FRANKLIN TONG UND FRANKLIN 2003).

Aufschluss über die Art der Inkompatibilität sollten Untersuchungen zur Pollenkeimung geben. Nach Selbstung von *H. arborescens* 'Annabelle' und *H. quercifolia* 'Pee Wee' wurden nur ein geringerer Teil der Narben mit jeweils wenigen Pollenkörnern beobachtet. War jedoch Pollen vorhanden, keimte dieser ausnahmslos. Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen waren zu keinem Zeitpunkt (48, 72 bzw. 96 h nach Bestäubung) sichtbar. Nach Selbstungen von *H. paniculata* 'Unique' waren auf einem Drittel der Blüten wenige Pollen (< 20) sichtbar. Nach Keimung konnte nur in Ausnahmefällen Pollenschlauchwachstum bis in den Bereich der Samenanlagen beobachtet werden. Die meisten Pollenschläuche waren bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt (96 h nach Bestäubung) nur bis in den Griffel gewachsen. Bei den Selbstungen innerhalb der Art *H.*

*macrophylla* war deutlich mehr keimender Pollen sichtbar. Dieser wuchs teilweise bis in den Bereich der Samenanlagen ('Adria', 'Doris') bzw. konnte nur bis in den Griffel verfolgt werden ('Blaumeise', 'Libelle').

Da es bei Vorhandensein von Pollen auf den Narben immer zur Keimung und zum Einwachsen in den Griffel kam liegt die Vermutung einer gametophytischen Selbstinkompatibilität nahe.

Auch in Selbstungsversuchen von REED (2004a) mit Sorten von *H. paniculata* (u. a. 'Unique') und *H. quercifolia* (u.a. 'Pee Wee') bzw. mit *H. macrophylla* (2004b) war Pollenkeimung mit anschließendem inhibiertem Pollenschlauchwachstum zu beobachten. Bereits acht Stunden nach Bestäubung war das Wachstum von Pollenschläuchen bei *H. paniculata*, nach 24 h bei *H. quercifolia* bzw. nach 72 h bei *H. macrophylla* deutlich geringer als bei intraspezifischen Kreuzungen. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit wurden nie Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen nach Selbstung der beiden Arten beobachtet.

Durch Anwendung des "embryo rescue"-Verfahrens konnten Nachkommen aus Selbstungen aller *H. macrophylla* Sorten und aus der Selbstung von *H. paniculata* 'Unique' gewonnen werden. Da dies auch bei Kreuzungen gelang, bei denen keine Pollenschläuche im Bereich der Samenanlagen sichtbar waren, besteht die Vermutung, dass die Pflanzen apomiktischer Abstammung sind. Bei Apomixie kommt es zur Entwicklung eines Embryos ohne Befruchtung durch den Pollen. Die Tatsache, dass es jedoch bei unbestäubten, kastrierten Blüten sowohl in den eigenen als auch in Untersuchungen von REED (2004a) zu keiner Embryonenentwicklung kam, widerspricht dieser Vermutung. Vielmehr weist dies auf postzygotische Barrieren hin, die zu einer Abortion des Embryos nach der Befruchtung führen (z. B. mangelhafte Ernährungsfunktion des Endosperms oder das Vorhandensein rezessiver letaler Gene, die erst bei Selbstung zum Tragen kommen). Eine Erklärung dafür, dass es trotz der vermuteten Selbstinkompatibilität bei *Hydrangea* in einigen Fällen (KUDO UND NIIMI 1999a) zu Samenantritt kam, könnte das Phänomen der "Pseudo-Selbstkompatibilität" liefern. Vermutlich führt die Einwirkung verschiedener Faktoren zur "Pseudo-Selbstkompatibilität". So dokumentierten EAST AND PARK (1917, in REED (2004b)) bei selbststerilen Pflanzen, den Ansatz von Samen zum Ende der Blütezeit. Auch Knospenbestäubung bzw. Bestäubungen bei hohen Temperaturen führen bei einigen Arten zu gesteigertem Samenantritt nach Selbstung.



Die molekulargenetischen Untersuchungen der Selbstungsnachkommen mittels RAPD-Analyse, zeigte eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Sorten und den potentiellen Selbstungsnachkommen (Abbildung 3-20). Das Vorhandensein weniger anderer Banden lässt, auf eine Selbstung schließen. Die Tatsache, dass wie bereits erwähnt, eine apomiktische Herkunft als nicht sehr wahrscheinlich eingestuft wird und die verwendete Technik (Kastration etc.) für erfolgreiche Bestäubungen geeignet war, untermauern die Annahme Selbstungsnachkommenschaft.

## 4 Literatur

- BAILEY, D. A., SECKINGER, G. R. UND P. A. HAMMER** (1986): In Vitro Propagation of Florists' Hydrangea. HortScience 21, 525-526
- BIAHOVA, A. UND L. BONNEAU** (1999): Control of in vitro somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. Plant Cell Rep. 19,185-190
- BISWAS, M. K., ISLAM, R. UND M. HOSSAIN** (2007): Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 90, 49-54
- BLACKBURN, K. UND J. H. W. HARRISON** (1921): The status of the British rose forms as determined by their cytological behaviour. Ann. Bot. 35, 159-188
- BOCCON-GIBOD, J., BILLARD, C. UND S. MALTETE** (2000): In vitro regeneration system of *Hydrangea macrophylla* plantlets from leaves and internodes. Acta Horticult. 508, 229-231
- BOMBLIES, K., LEMPE, J., EPPLE, P., WARTHMANN, N. LANZ, C., DANGL, J. L. UND K. D. WEIGEL** (2007): Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants. PLoS Biol. 5, 1962-1972
- BOMBLIES, K. UND D. WEIGEL** (2007): Hybrid necrosis: autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. Nature Rev. Genetic. Doi:10.1038/nrg2082
- BRESINSKY, A., KÖRNER, C., KADEREIT, J. W., NEUHAUS, G. UND U. SONNEWALD** (2008): Strasburger Lehrbuch der Botanik, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 801
- BRIDGEN, M. P.** (1994): A review of plant embryo culture. HortScience 29, 1243-1245
- CABONI, E., TONELLI, M. G., LAURI, P., ANGELI, S. D. UND C. DAMIANO** (1999): *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. Plant Cell Tiss. Organ Cult 59, 1-7

- CASTILLO, B. UND M. A. L. SMITH** (1997): Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Rep.* 16, 385-388
- CHEN, J.-T. UND W.-C. CHANG** (2001): Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Growth Regulat.* 34, 229-232
- CHU, C. G., FARIS, J. D., FRIESEN, T. L. UND S. S. XU** (2006): Molecular mapping of hybrid necrosis genes *Ne1* and *Ne2* in hexaploid wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 112, 1347-1381
- COOKE, T. J., RACUSEN, R. H. UND J. D. COHEN** (1993): The role of auxin in plant embryogenesis. *Plant Cell* 5, 1494-1495
- CRAIG, K. L. UND M. TYERS** (1999): The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72,299-328
- DAS, A. B., ROUT, G. R. UND P. DAS** (1995): In vitro somatic embryogenesis from callus culture of the timber yielding tree *Hardwickia binata* Roxb. *Plant Cell Rep.* 15, 147-149
- DEARNALEY, J. D. W. UND G. A. DAGGARD** (2001): Expression of a polygalacturonase enzyme in germinating pollen of *Brassica napus*. *Sex. Plant Reprod.* 13, 265-271
- DECLERCK, V. UND S. S. KORBAN** (1996): Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J. Hort. Sci.* 71, 49-55
- DICKINSON, H. G., ELLEMAN, C. J. UND J. DOUGHTY** (2000): Pollen coatings - chimaeric genetics and new functions. *Sex. Plant Repr.* 12, 302-309
- DIXIT, R. UND J. B. NASRALLAH** (2001): Recognizing self in the self-incompatibility response. *Plant Physiol.* 125, 105-108
- DOBZHANSKY, T. H.** (1937): *Genetics and the origin of species.* Columbia University Press, New York

- DOIL, A., ZHANG, R., SCHUM, A., SEREK, M. UND T. WINKELMANN** (2008): In vitro regeneration and propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb. 'Nachtigall'. Prop. Ornamental Plants 8, 151-153.
- DOROKHOV, D.B. UND E. KLOCKE** (1997): A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. Russian Journal of Genetics 33 (4), 358-365
- DOUGHTY, J. WONG, H. Y. UND H. G. DICKINSON** (2000): Cysteine-rich pollen coat proteins (PCPs) and their interactions with stigmatic S (incompatibility) and S-related proteins in *Brassica*: putative roles in SI and pollination. Ann. Bot. 85, 161-169
- DRIVER, J. A. UND A. H. KUNIYUKI** (1984): In Vitro Propagation of Paradox walnut Rootstock. Hort. Sci. 19, 507-509
- DUDITS, D., GYORGYEY, J., BOGRE, L. UND L. BAKO** (1995): Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (Ed.) *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston; London, 267-308
- EAST, E. M. UND J. B. PARK.** (1917): Studies on self-sterility. I. The behavior of self-sterile plants. Genetics 2, 505-609
- EDWARDS, K., JOHNSTONE, C. UND C. THOMPSON** (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research 19, 1349
- EGERTSDOTTER, E.-M. U. UND S. VON ARNOLD** (1995): Development of somatic embryos in Norway spruce. J. Exp. Bot. 49, 155-162
- FAST PLANTS** (1997): Pollen Germination with Fast Plants. Wisconsin Fast Plants, University of Wisconsin-Madison, College of Agricultural and Life Sciences, Department of Plant Pathology
- FAURE, J.-E.** (1999): Double fertilization in flowering plants: Origin, mechanisms and new information from in vitro fertilization. In Creste, M., Cai, G. und A. Moscatelle (Hrsg.) Fertilization in higher plants: Molecular and cytological aspects. Springer-Verlag, Berlin, 79-89

- FEHER, A., PASTERNAK, T. P. UND D. DUDITS** (2003): Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74, 201-228
- FEHER, A.** (2005): Why somatic plant cells start to form embryos? *Plant Cell Monogr.* 2, 85-101
- FIEBIG, A., MAYFIELD, J. A., MILEY, N. L., CHAU, S., FISHER, R. L. UND D. PREUSS** (2000): Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* 12, 2001-2008
- FRANKLIN-TONG V. E. UND F. C. H. FRANKLIN** (2003): Gametophyte self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science* 8, 598-605
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A. UND K. OJIMA** (1968): Nutrient requirement suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- GEORGE, E. F. UND G.-J. DE KLERK** (2008): The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In George, E. F., Hall, M. A. und G. J. De Klerk (Hrsg.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1 The Background.* Springer Verlag Dordrecht, 65-114
- GOPI UND PONMURUGAN** (2006): Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. *J. Biotech.* 126, 260-264
- GRAF, C.** (2008): In-vitro-Etablierung und -Vermehrung von *Hydrangea spec.* Diplomarbeit am Fachbereich Gartenbau und Lebensmitteltechnologie der Fachhochschule Weihenstephan, Freising
- HANKE, M.** (2008): Hortensien für Zimmer und Garten sind gut gefragt. *Das Magazin für Zierpflanzen* 5, 10-11
- HARI, V.** (1980): Effect of cell density changes and conditioned media on carrot somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.* 96, 227-231
- HAUSER, E. J. P. UND J. H. MORRISON** (1964): The cytochemical reduction of nitroblue tetrazolium as an index of pollen viability. *Americ. J. Bot.* 51, 748-752

- HAWORTH-BOOTH, M.** (1950): The Hydrangeas. Constable Publishers, London
- HERMSEN, J. G. T.** (1967): Hybrid dwarfness in wheat. *Euphytica* 16,134-162
- HIGASHIYAMA, T., KUROIWA, H., KAWANO, S. UND T. KUROIWA** (1998): Guidance *in vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri*. *Plant Cell* 10, 2019-2031
- HIGASHIYAMA, T., YABE, S., SASAKI, N. NISHIMURA, Y., MIYAGISHIMA, S., KUROIWA, H. UND T. KUROIWA** (2001): Pollen tube attraction by synergid cell. *Science* 293, 1480-1483
- HISCOCK, A. J., DEWEY, F. M., COLEMAN, J. O. D. UND H. G. DICKINSON** (1994): Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta* 193, 337-384
- JANSEN, H., BACHTHALER, E., FÖLSTER, E. UND H.-C. SCHARPF** (1998): Gärtnerischer Pflanzenbau. Ulmer Verlag, Stuttgart. S. 77
- JIMÉNEZ, V. M., GUEVARA, E., HERRERA, J. UND F. BANGERTH** (2005): Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 23, 567-572
- KACHROO, A., SCHOPFER, C. R. NASRALLAH, M. E. UND J. B. NASRALLAH** (2001): Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science* 293, 1824-1826
- KARAMI, O. UND A. SAIDI** (2009): The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol. Biol. Rep.* DOI 10.1007/s11033-009-9764-3
- KOBORI, S. UND W. MARUBASHI** (2004): Programmed Cell Death Detected in Interspecific Hybrids of *Nicotiana repanda* x *N. tomentosiformis* Expressing Hybrid Lethality. *Breeding Science* 54, 347-350
- KOLEVA-GUDEVA, L. R., SPASENOSKI, M. UND F. TRAJKOVA** (2007): Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Sci. Hort.* 111, 114-119

- KOPERTEKH, L. G. UND R. G. BUTENKO** (1995): Naturally occurring phytohormones in wheat explants as related to wheat morphogenesis in vitro. *Russ. J. Plant Physiol.* 42, 488-491
- KRICHEVSKY, A., KOZLOVSKY, S. V., TIAN, G.-W., CHEN, M.-H., ZALTMANN, A. UND V. CITOVSKY** (2007): How pollen tubes grow. *Dev. Biol.* 303, 405-420
- KÜBLER, C.** (2008) In-vitro-Mutagenese an Blattexplantaten von *Hydrangea macrophylla* mittels Röntgenstrahlung. Diplomarbeit am Fachbereich Gartenbau und Lebensmitteltechnologie der Fachhochschule Weihenstephan, Freising
- KUDO, N. UND Y. NIIMI** (1999a): Production of Interspecific Hybrids between *Hydrangea macrophylla* f. hortensia (Lam.) Rehd. and *H. arborescens* L. J. *Japan. Soc. Hort. Sci.* 68, 428-439
- KUDO, N. UND Y. NIIMI** (1999b): Production of Interspecific Hybrid Plants through Cotyledonary Segment Culture of Embryos Derived from Crosses between *Hydrangea macrophylla* f. hortensia (Lam.) Rehd. and *H. arborescens* L. J. *Japan. Soc. Hort. Sci.* 68, 803-809
- KUHLEN, H.** (1956): I. Geschichte der Hortensien und die Entwicklung des Sortiments. In Möhring, H. K., Kuhlen, H. und G. Bosse (Hrsg.) Hortensien. Verlag Deutsche Gärtnerbörse, Aachen, 9-19
- LAKSHMANAN, P. UND A. TAJI** (2000): Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biol.* 2,136-148
- LEDBETTER, D. I. UND J. E. PREECE** (2004): Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from *Hydrangea quercifolia* Bartr. leaf explants. *Sci. Hort.* 101, 121-126
- LELJAK-LEVANIC, D., NAANA, B., UND M. S. JELASKA** (2004): Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep.* 23, 120-127

- LENARTOWSKA, M., RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. UND E. BEDNARSKA** (2001): Immunocytochemical localization of esterified and unesterified pectins in unpollinated and pollinated styles of *Petunia hybrida* Hort. *Planta* 213, 182-191
- LLOYD, G. UND B. MCCOWN** (1980): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30, 421
- LOPES, M. A. UND B. A. LARKINS** (1993): Endosperm origin, development and function. *Plant Cell* 5, 1383-1399
- LORA, J., PÉREZ DE OTEYZA, M. A., FUENTETAJA, P. UND J. I. HORMAZA** (2006): Low temperature storage and in vitro germination of cherimoya. *Sci. Hort.* 108, 91-94
- LORD, E. M.** (2003): Adhesion and guidance in compatible pollination. *J. Exp. Biol.* 54, 47-54
- LORD, E. M. UND S. C. RUSSELL** (2002): The Mechanisms of Pollination and Fertilization in Plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 81-105
- LO SCHIAVO, F., PITTO, L., GIULIANO, G., TORTI, G., NUIT-RONCHI, V., MARAZZITI, D., VERGARA, R., ORSELLI, S. UND M. TERZI** (1989): DNA methylation of embryogenic carrot cell culture and its variation as caused by mutation differentiation hormones and hypomethylating. *Theor. Appl. Genet.* 77, 325-331
- LUZA, J. G. UND V. S. POLITO** (1985): In vitro germination and storage of English walnut pollen. *Sci. Hort.* 27, 303-316
- MACRAE, D. H. UND J. BONNER** (1953): Chemical structure and antiauxin activity. *Physiol. Plant.* 6, 485-510
- MALLET, C.** (2008): Hortensienatlas, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- MARSOLAIS, A. A., WILSON, D. P. M., TSUJITA, M. J. UND T. SENARATNA** (1991): Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium x hortorum*) and regal (*Pelargonium x domesticum*) geranium. *Can. J. Bot.* 69, 1188-1193



- MARUBASHI, W., YAMADA, T. UND M. NIWA** (1999): Apoptosis detected in hybrids between *Nicotiana glutinosa* and *N. repanda* expressing lethality. *Planta* 210, 168-171
- MASCARENHAS, J. P.** (1993): Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 5, 1303-1314
- MATT, A. UND J. A. JEHLE** (2005): *In vitro* plant regeneration from leaves and internodes sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Plant Cell Rep.* 24, 468-476
- MAYFIELD, J. A. UND D. PREUSS** (2000): Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat. Cell Biol.* 2, 128-130
- MCCUBBIN, A. G. UND T.-H. KAO** (2000): Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 333-364
- MCCCLINTOCK** (1957): A monograph of the genus *Hydrangea*. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 29, 147-256
- MERKLE, S. A., PARROTT, W. A. UND B. S. FLINN** (1995): Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In Thorpe T. A. (Hrsg.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 155-203
- MOLLET, J.-C., PARK, S.-Y., NOTHNAGEL, E. A. UND E. M. LORD** (2000): A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell* 12, 1737-1749
- MORTREAU, E., H. BERTRAND, C. LAMBERT UND J. LALLEMAND** (2003): Collection of *Hydrangea*: Genetic Resources Characterisation. *Acta Horticult.* 623, 231-238
- MOSHKOV, I. E., NOVIKOVA, G. V., HALL, M. A. UND E. F. GEORGE** (2008): Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In George, E. F., Hall, M. A. und G. J. De Klerk (Hrsg.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1 The Background*. Springer Verlag Dordrecht, 227-282

- MOSMANN, T.** (1983): Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *J. Immunological Methods* 65, 55-63
- MU, J. H., STAINS, J. P. UND T. H. KAO** (1994): Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.* 25, 539-544
- MULLER, H. J.** (1942): Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biol. Sym.* 6, 71-125
- MURASHIGE, T.** (1961): Suppression of shoot formation in cultured tobacco cells by gibberellic acid. *Science* 134, 280
- MURASHIGE, T. UND F. SKOOG** (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
- NAKAGAWA, H., TAKESHI, S., YAMAUCHI, N., SHIGYO, M., KAKO, S. UND A. ITO** (2001): Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Sci. Hort.* 90, 85-92
- PARK, S.-Y., JAUH, G.-Y., MOLLET, J.-C., ECKARD, K. J. UND E. A. NOTHNAGEL** (2000): A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* 12, 151-163
- PIERIK, R. L. M.** (1997): In vitro culture of higher plants. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht
- POBUDKIEWICZ, A. K. UND J. NOWAK** (1994): The Influence of Flurprimidol and Uniconazole on Growth of the CMM dwarf *Dianthus caryophyllus* L. cr. 'Snowmass'. *J. Fruit and Ornamental Plant Research* II (4), 135-142
- PREIL, W., KÜHNE, H. UND M. HOFFMANN** (1978): Hydrangea ringspot virus-freie Hortensien durch „Meristemkultur“ - Kritische Betrachtungen der Erfolgsaussichten. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 30, 88-90
- REED, S. M.** (2000a): Compatibility studies in *Hydrangea*. *J. Environ. Hort.* 18, 29-33

- REED, S. M.** (2000b): Development of an in ovulo embryo culture procedure for *Hydrangea*. J. Environ. Hort. 18, 34-39
- REED, S. M., RIEDEL, G. L. UND M. R. POOLER** (2001): Verification and Establishment of *Hydrangea macrophylla* 'Kardinal' x *H. paniculata* 'Brussels Lace' Interspecific Hybrids. J. Environ. Hort. 19 (2), 85-88
- REED, S. M.** (2004a): Self-incompatibility and Time of Stigma Receptivity in Two Species of *Hydrangea*. HortScience 39, 312-315
- REED, S. M.** (2004b): Pollination Biology of *Hydrangea macrophylla*. HortScience 40, 335-338
- REINERT, J.** (1958): Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. Naturwissenschaften 45,334-345
- RINEHART, T. A., SCHEFFLER, B. E. UND S. M. REED** (2006): Genetic Diversity Estimates for the Genus *Hydrangea* and Development of a Molecular Key Based on SSR. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 131, 787-798
- RODRIGUEZ-RIANO, T. UND A. DAFNI** (2000): A new procedure to assess pollen viability. Sex. Plant Reprod. 12, 241-244
- RYERSON, D. E. UND M. C. HEATH** (1996): Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragment during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. Plant Cell 8, 393-402
- SCHOPFER, C. R., NASRALLAH, M. E. UND J. B. NASRALLAH** (1999): The male determinate of self-incompatibility in *Brassica*. Science 286, 1697-1700
- SEBASTIAN, T. K. UND CH. W. HEUSER** (1987): In Vitro Propagation of *Hydrangea quercifolia* Bartr. Sci. Hort. 31, 303-309
- SHARMA, D. R., KAUR, R. UND K. KUMAR** (1996): Embryo rescue in plants - a review. Euphytica 89, 325-337

- SHIBA, H., TAKAYAMA, S., IWANO M., SHIMOSATO, H. UND M. FUNATO (2001): A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol.* 125, 2095-2103
- SHII, C. T., MOK, M. C., TEMPLE, S. R. UND D. W. S. MOK (1980): Expression of developmental abnormalities in hybrid of *Phaseolus vulgaris* L. Interaction between temperature and allelic dosage. *J. Hered.* 71, 218-222
- SIJACIC, P., WANG, X., SKIRPAN, A. L., WANG, Y., DOWD, P. E. ET AL. (2004): Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429, 302-305
- SONG, L., WANGZHEN, G. UND T. ZHANG (2009): Interaction of novel Dobzhansky-Muller type genes for the induction of hybrid lethality between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* cv. Coastland R4-4. *Theor. Appl. Genet.* 119, 33-41
- STEWART, F. C., MAPES, M. O. UND K. MEARS (1958): Growth and development of cultivated cells. III Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *American J. Bot.* 45,709-713
- STOLTZ, L. P (1984): *In Vitro* Propagation and Growth of *Hydrangea*. *HortScience* 19(5), 717-719
- TÄCKHOLM, G. (1922): Zytologische Studien über die Gattung *Rosa*. *Acta Hortic. Berg.* 7, 97-381
- TANG, H., ZHENGLONG, R., REUSTLE, G. UND G. KRCZAL (2002): Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. *Sci. Hort.* 93, 235-244
- TAKAYAMA, S., SHIBA, H., IWANO, M., ASANO, K., HARA, M., CHE, F.-S., WATANABE, M., HINATA, K. UND A. ISOGAI (2000): Isolation and characterization of pollen coat proteins of *Brassica campestris* that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97, 3765-3770
- VAAKBLAD VOOR DE BLOEMISTERIJ (2007). 21a, 71

- VAN DER SALM, T. P. M., VAN DER TOORN, C. J. G., HÄNISCH TEN CATE, C. H., DUBOIS, L. A. M., DE VRIES, D. P. UND H. J. M. DONS** (1994): Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 37, 73-77
- VISSER, C., QURESHI, J. A., GILL, R. UND P. K. SAXENA** (1992): Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin-cytokinin requirement of somatic embryogenesis in hypocotyl cultures of geranium. *Plant Physiol.* 99, 1704-1707
- VON ARNOLD, S.** (2008): Somatic Embryogenesis. In E. F. George, M. A. Hall und G. J. De Klerk (Hrsg.): *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer
- VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHOKOV, P., DYACHOK, J. UND L. FILONOVA** (2002): Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69, 233-249
- WANG, H., LI, J., BOSTOCK, R. M. UND D. G. GILCHRIST** (1996): Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 8, 375-391
- WERBROUCK, S. P. O., VAN DER JEUGT, B., DEWITTE, W., PRINSEN, E., VAN ONCKELEN, H. A. UND P. C. DEBERGH** (1995): The metabolism of benyladenine in *Spatiphyllum floribundum* 'Schott Petite' in relation to acclimatisation problems. *Plant Cell Rep.* 14, 662-665
- WHEELER, M. J., FRANKLIN-TONG, V. E. UND F. C. H. FRANKLIN** (2001): The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytol.* 151, 565-584
- WINKELMANN, T., HOHE, A., PÜSCHEL, A.-K. UND H.-G. SCHWENKEL** (2000): Somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. *Curr. Topics Plant Biol.* 2: 51-62
- WILSON, D. P. M., SULLIVAN, J. A., MARSOLAIS, A. A., TSUJITA, M. J. UND T. SENARATNA** (1996): Improvement of somatic embryogenesis in zonal geraniums. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 47, 27-32

**WOLTERS-ARTS, M., LUSH, W. M. UND C. MARIANI (1998):** Lipids are required for directional pollen tube growth. *Nature* 392, 818-821

**YOON, H. W., KIM, M. C., SHIN, P. G., KIM, J. S., KIM, C. Y., LEE, S. Y., HWANG, I., BAHK, J. D., HONG, J. C., HAN, C. UND M. J. CHO (1997):** Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soybean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. *Mol. Gen. Genet.* 255, 359-371

## 5 Anhang

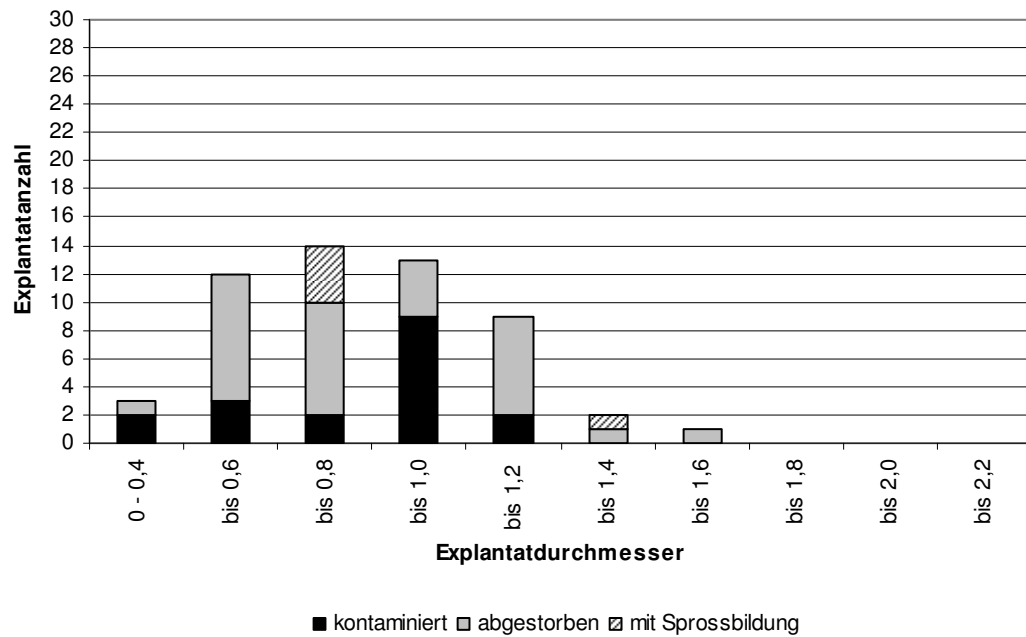


Abbildung A 1: Entwicklung der Explantate der Sorte *H. macrophylla* 'Sensation 75' in Abhängigkeit vom Explantatdurchmesser

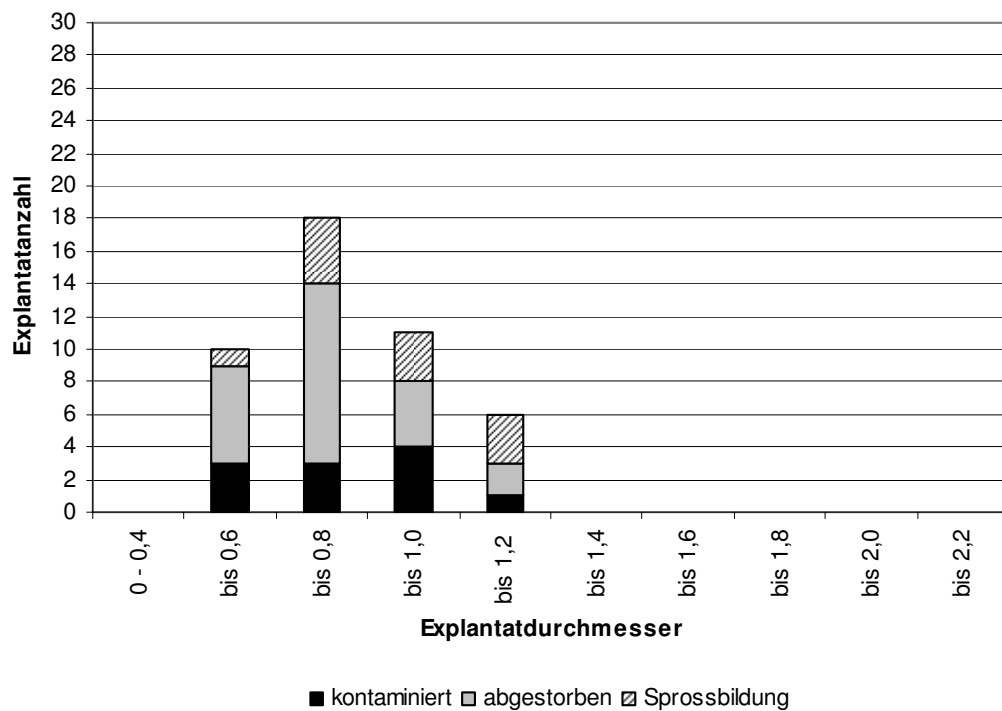


Abbildung A 2: Entwicklung der Explantate der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit vom Explantatdurchmesser

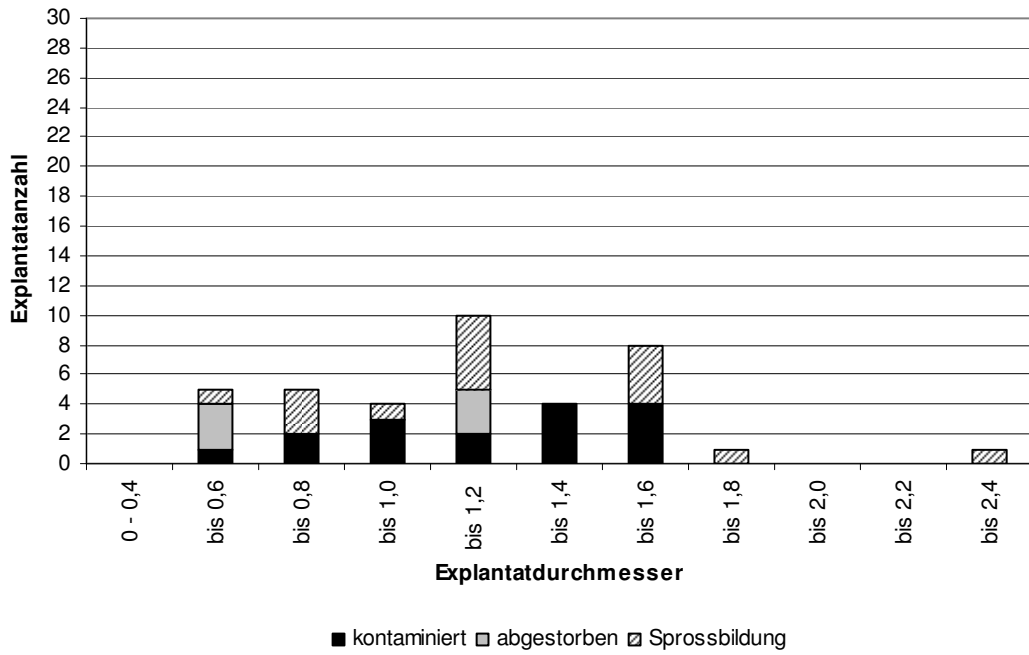


Abbildung A 3: Entwicklung der Explantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit vom Explantatdurchmesser

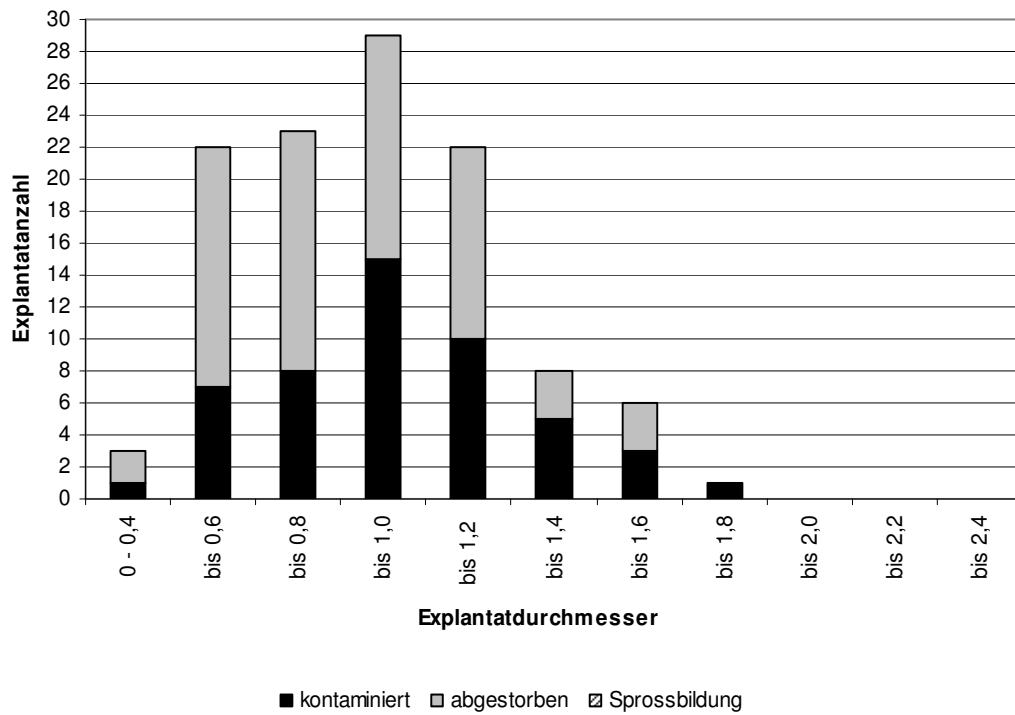


Abbildung A 4: Entwicklung der Explantate der Sorte *H. macrophylla* 'Doris' in Abhängigkeit vom Explantatdurchmesser



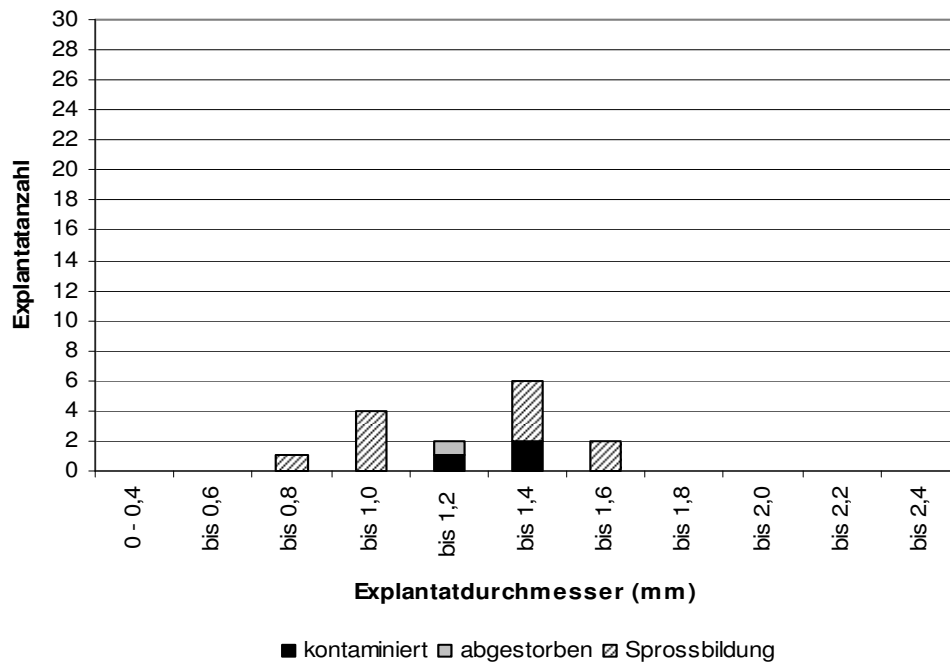


Abbildung A 5: Entwicklung der Explantate der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' in Abhängigkeit vom Explantatdurchmesser

Tabelle A 1: Sprosslängen von Sprossen der Sorte *Hydrangea macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 2, Versuchsdurchgang 1)

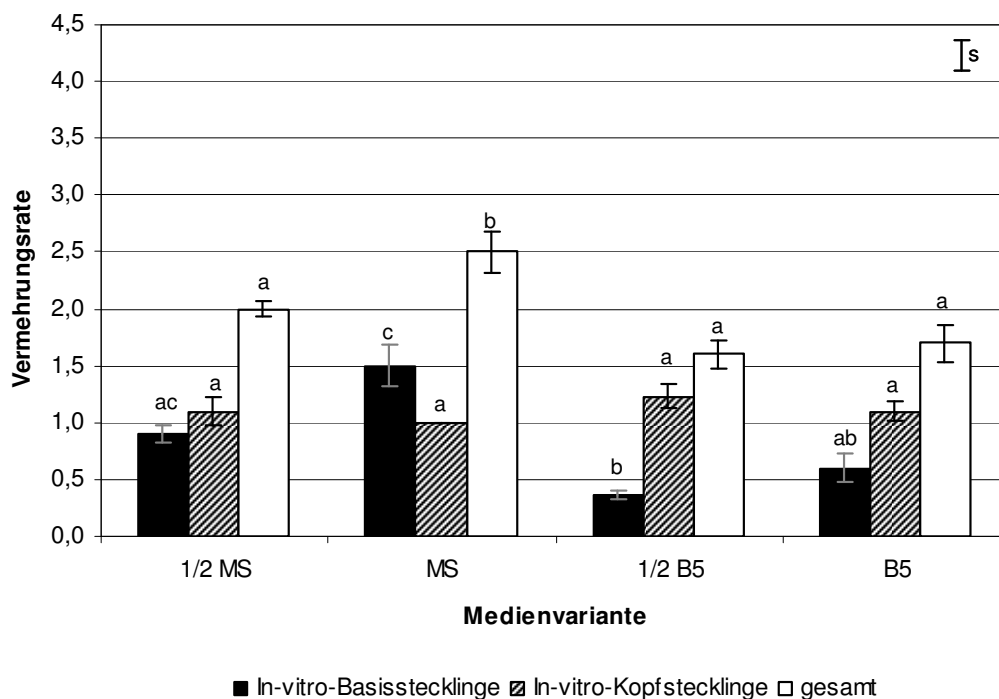
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Sprosslänge (cm)	
	$\bar{x}$	s
1/2 MS	2,6 <sup>a</sup>	± 0,3
MS	3,8 <sup>b</sup>	± 0,1
1/2 B5	1,6 <sup>c</sup>	± 0,2
B5	1,4 <sup>c</sup>	± 0,1

Tabelle A 2: Kallusbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 2, Versuchsdurchgang 1 und 2)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Anteil Pflanzen mit Kallusbildung (%)			
	1. Versuchsdurchgang		2. Versuchsdurchgang	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1/2 MS	100 <sup>a</sup>	0	60 <sup>a</sup>	± 13
MS	100 <sup>a</sup>	0	60 <sup>a</sup>	± 6
1/2 B5	97 <sup>ab</sup>	± 4	97 <sup>b</sup>	± 4
B5	77 <sup>b</sup>	± 13	77 <sup>ab</sup>	± 13



**Abbildung A 6: Vermehrungsraten der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 2, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

**Tabelle A 3: Sprosslängen von Sprossen der Sorte *Hydrangea macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 2, Versuchsdurchgang 1)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Sprosslänge (cm)	
	$\bar{x}$	s
1/2 MS	2,6 <sup>a</sup>	± 0,3
MS	3,8 <sup>b</sup>	± 0,1
1/2 B5	1,6 <sup>c</sup>	± 0,2
B5	1,4 <sup>c</sup>	± 0,1

**Tabelle A 4: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 3, Versuchsdurchgang 1)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	<b>s</b>	$\bar{x}$	<b>s</b>
1/2 MS	97 <sup>a</sup>	± 4,1	93 <sup>a</sup>	± 5,2
MS	96 <sup>a</sup>	± 4,5	96 <sup>a</sup>	± 4,5
1/2 B5	90 <sup>a</sup>	± 5,8	85 <sup>a</sup>	± 5,0
B5	90 <sup>a</sup>	± 8,4	90 <sup>a</sup>	± 8,4

**Tabelle A 5: Sprosslängen von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 3, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Sprosslänge (cm)	
	$\bar{x}$	<b>s</b>
1/2 MS	1,7 <sup>b</sup>	± 0,2
MS	2,6 <sup>a</sup>	± 0,2
1/2 B5	1,1 <sup>b</sup>	± 0,1
B5	1,5 <sup>b</sup>	± 0,1

**Tabelle A 6: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Medienvariante (Versuch Verm 3, Versuchsdurchgang 2)**

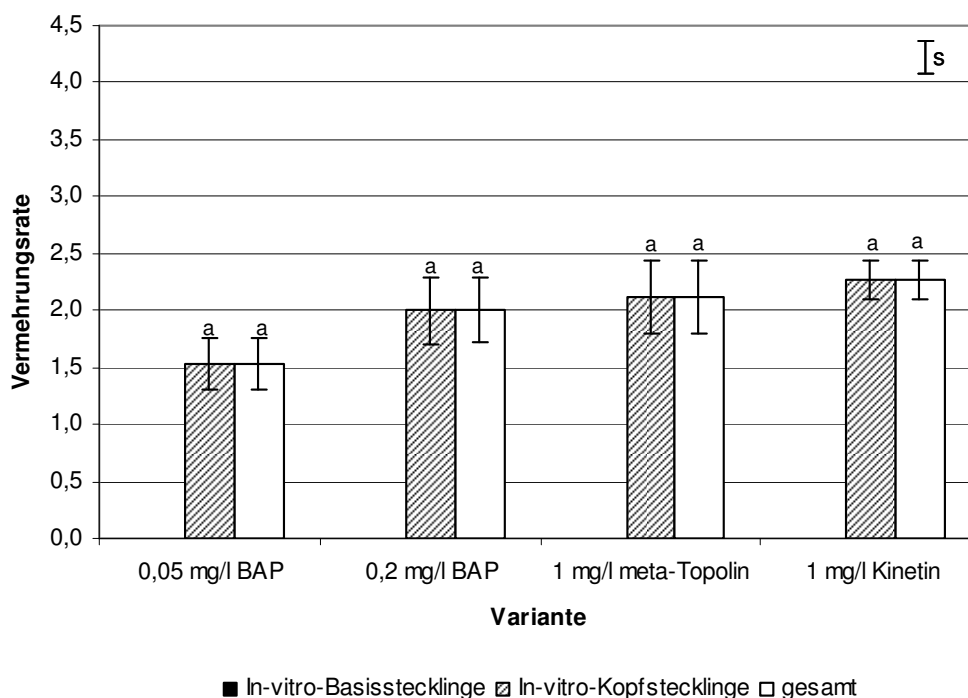
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	<b>s</b>	$\bar{x}$	<b>s</b>
1/2 MS	100 <sup>a</sup>	0	97 <sup>a</sup>	± 4,1
MS	100 <sup>a</sup>	0	80 <sup>a</sup>	± 12,7
1/2 B5	100 <sup>a</sup>	0	37 <sup>b</sup>	± 7,5
B5	100 <sup>a</sup>	0	93 <sup>a</sup>	± 5,2

**Tabelle A 7: Sprosslängen von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 1)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage aus zwei Versuchsdurchgängen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 12$  Wiederholungen

Variante	Sprosslänge (cm)	
	$\bar{x}$	s
0,05 mg/l BAP	1,6 <sup>a</sup>	± 0,1
0,2 mg/l BAP	2,0 <sup>a</sup>	± 0,2
1 mg/l meta-Topolin	1,3 <sup>a</sup>	± 0,2
1 mg/l Kinetin	1,3 <sup>a</sup>	± 0,2



**Abbildung A 7: Vermehrungsraten der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 5, Versuchsdurchgang 1)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach paarweisen Wilcoxon-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

**Tabelle A 8: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 5, Versuchsdurchgang 1)**

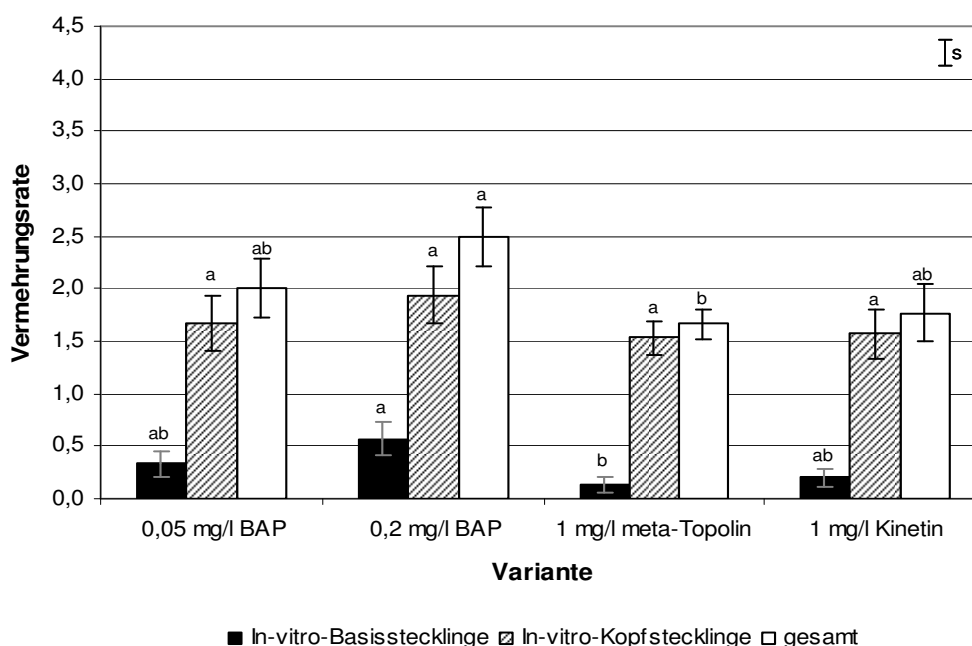
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach paarweisen Wilcoxon-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Variante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
0,05 mg/l BAP	47 <sup>a</sup>	± 8	77 <sup>a</sup>	± 16
0,2 mg/l BAP	67 <sup>a</sup>	± 21	80 <sup>a</sup>	± 13
1 mg/l meta-Topolin	62 <sup>a</sup>	± 5	70 <sup>a</sup>	± 10
1 mg/l Kinetin	67 <sup>a</sup>	± 8	97 <sup>a</sup>	± 4

**Tabelle A 9: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 5, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach paarweisen Wilcoxon-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Variante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
0,05 mg/l BAP	17 <sup>a</sup>	± 4	100 <sup>a</sup>	0
0,2 mg/l BAP	13 <sup>a</sup>	± 8	100 <sup>a</sup>	0
1 mg/l meta-Topolin	17 <sup>a</sup>	± 8	100 <sup>a</sup>	0
1 mg/l Kinetin	20 <sup>a</sup>	± 9	100 <sup>a</sup>	0



**Abbildung A 8: Vermehrungsraten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit vom verwendeten Wachstumsregulator (Versuch Verm 6, Versuchsdurchgang 2)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

**Tabelle A 10: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Art und der Konzentration der Eisenform bzw. der Nährsalze**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Variante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1/2 MS + 100 $\mu$ M Fe-Na-EDTA	100 <sup>a</sup>	0	3 <sup>a</sup>	± 4
1/2 MS + 100 $\mu$ M Fe-EDDHA	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>b</sup>	0
1/2 MS + 200 $\mu$ M Fe-EDDHA	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>b</sup>	0
1/2 DKW + 100 $\mu$ M Fe-Na-EDTA	92 <sup>a</sup>	± 5	4 <sup>a</sup>	± 4

**Tabelle A 11: Kallus- bzw. Wurzelbildung an Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit vom verwendeten Verfestigungsmittel**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der zweiten sechswöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Variante	Anteil Pflanzen mit			
	Kallusbildung (%)		Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
8 g/l Plant Agar	100 <sup>a</sup>	0	90 <sup>a</sup>	± 6
3,8 g/l Gelrite	98 <sup>a</sup>	± 3	60 <sup>b</sup>	± 9

**Tabelle A 12: Sprosslängen und Wurzelbildung von Sprossen der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' in Abhängigkeit von der Kulturmethode**

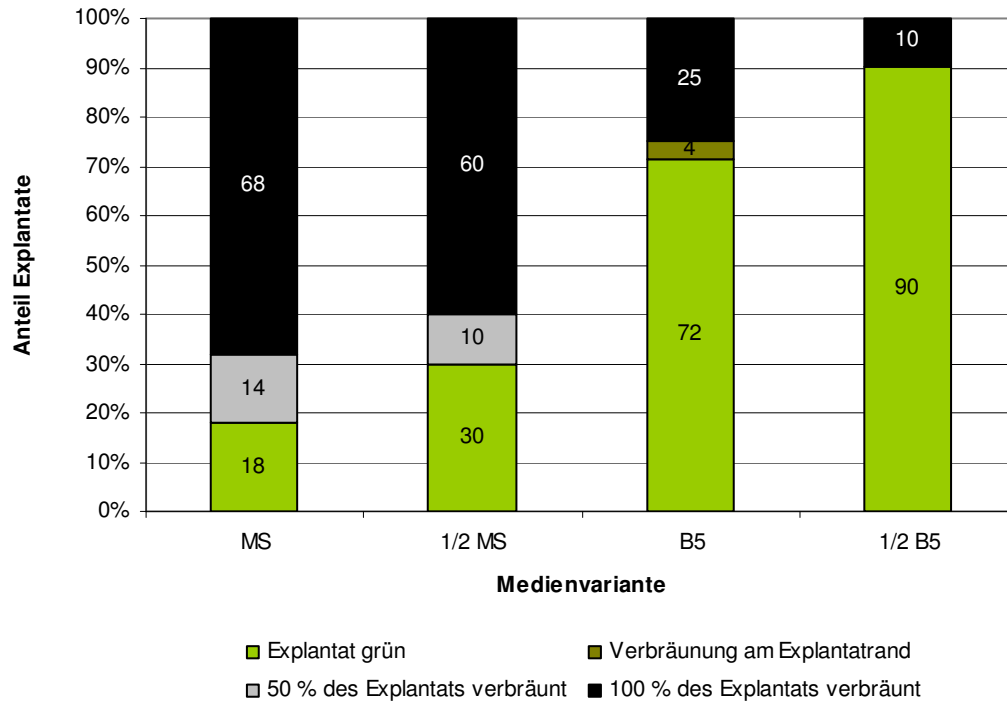
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der dritten dreiwöchigen Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 3$  Gefäße mit je 15 Pflanzen bei Kultur in TIS bzw. 10 Gefäße mit je 2 Pflanzen bei Kultur in PIS und auf Festmedium

Kultur- methode	Sprosslänge (cm)		Anteil Pflanzen mit Bewurzelung (%)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
	TIS(1*16)	1,7 <sup>bc</sup>	± 0,2	100 <sup>a</sup>
TIS(2*8)	2,1 <sup>a</sup>	± 0,1	98 <sup>a</sup>	± 2
TIS(4*4)	3,4 <sup>b</sup>	± 0,2	100 <sup>a</sup>	0
PIS	2,8 <sup>b</sup>	± 0,2	60 <sup>a</sup>	± 20
Fest	1,5 <sup>c</sup>	± 0,1	80 <sup>a</sup>	± 13

**Tabelle A 13: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit vom verwendeten Grundmedium**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten bei  $p \leq 0,05$ ;  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Kallusbildungsraten (%)			
	1. Versuchsdurchgang		2. Versuchsdurchgang	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
MS	100 <sup>a</sup>	0	96 <sup>a</sup>	± 4
1/2 MS	92 <sup>a</sup>	± 5	100 <sup>a</sup>	0
B5	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0
1/2 B5	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0



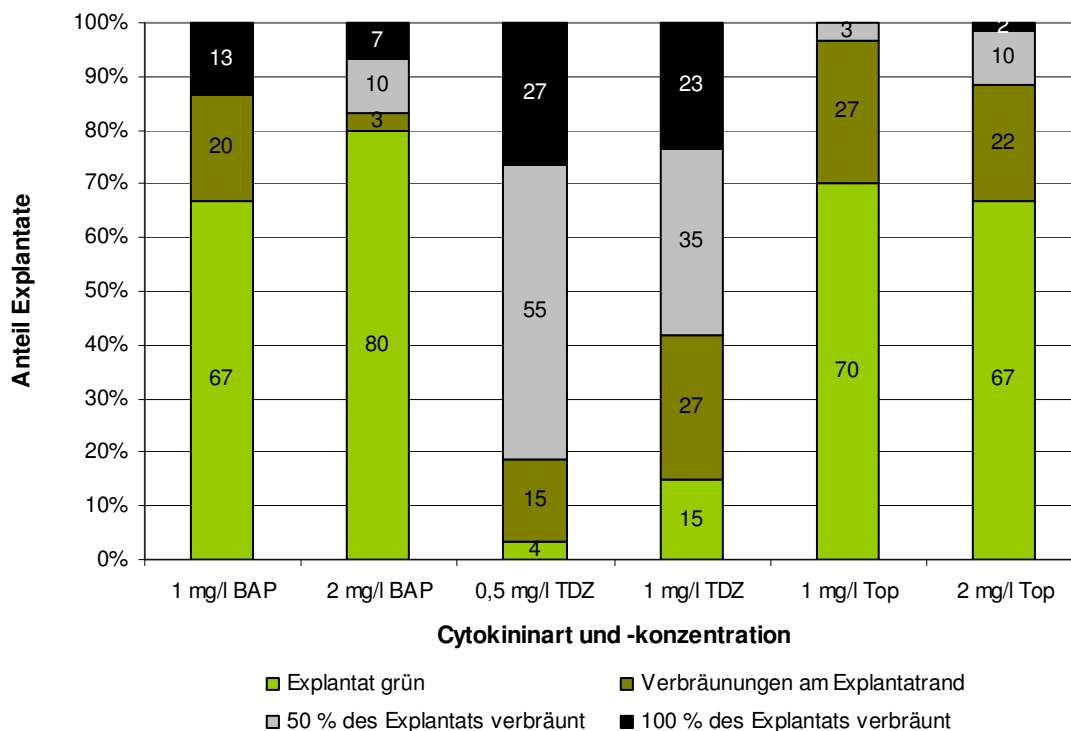
**Abbildung A 9: Grad der Verbrauung der Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Nahstoffzusammensetzung und deren Konzentration**

Dargestellt ist das Mittel aus zwei Versuchsdurchgängen nach je zwei vierwöchigen Kulturpassagen, n = 12 Wiederholungen (2 Versuchsdurch-gänge  6 Petrischalen)

**Tabelle A 14: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit vom verwendeten Grundmedium**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten bei  $p \leq 0,05$ ; n = 6 Wiederholungen

Medienvariante	Kallusbildungsraten (%)			
	1. Versuchsdurchgang		2. Versuchsdurchgang	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
MS	70 <sup>a</sup>	8	100 <sup>a</sup>	0
1/2MS	97 <sup>b</sup>	4	100 <sup>a</sup>	0
B5	97 <sup>b</sup>	4	100 <sup>a</sup>	0
1/2B5	100 <sup>b</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0



**Abbildung A 10: Grad der Verbräunung der Blatexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Nachtigall' nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen in Abhängigkeit vom verwendeten Cytokinin und dessen Konzentration**

Dargestellt ist das Mittel aus zwei Versuchsdurchgängen, n = 12 Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

**Tabelle A 15: Kallusbildung an Blatexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von der Cytokininart und -konzentration**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten bei  $p \leq 0,05$ ; n = 6 Wiederholungen

Cytokininart und -konzentration	Kallusbildungsrate (%)			
	1. Versuchsdurchgang		2. Versuchsdurchgang	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1 mg/l BAP	100 <sup>a</sup>	0	93 <sup>ab</sup>	± 5
2 mg/l BAP	90 <sup>a</sup>	± 5	83 <sup>a</sup>	± 4
0,5 mg/l TDZ	90 <sup>a</sup>	± 5	83 <sup>a</sup>	± 8
1 mg/l TDZ	93 <sup>a</sup>	± 5	93 <sup>ab</sup>	± 5
1 mg/l meta-Topolin	87 <sup>a</sup>	± 8	100 <sup>b</sup>	0
2 mg/l meta-Topolin	87 <sup>a</sup>	± 5	50 <sup>c</sup>	± 10



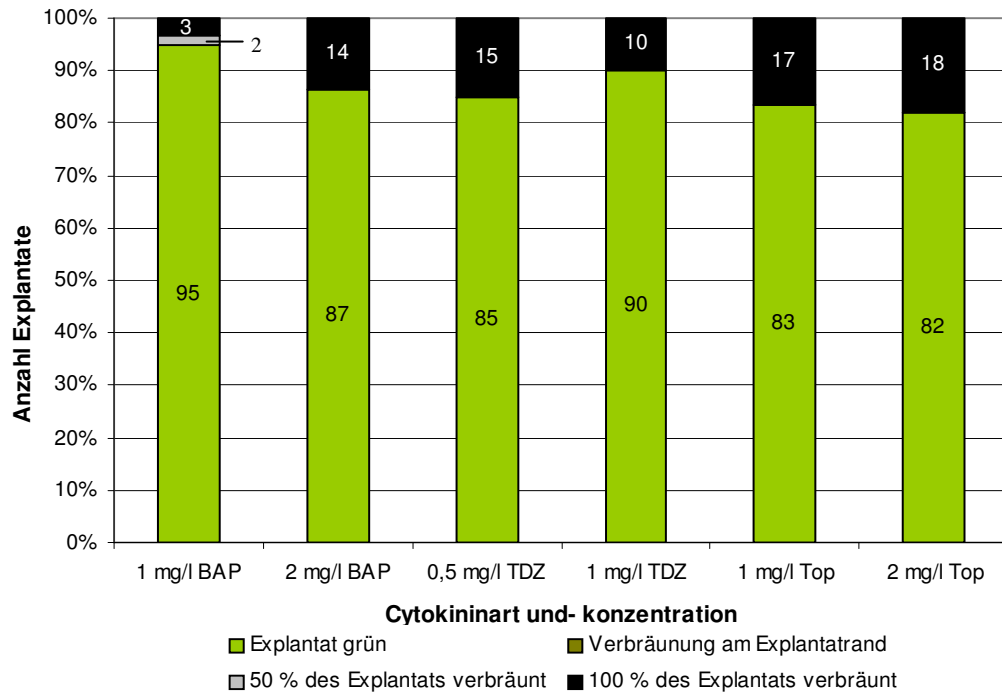


Abbildung A 11: Grad der Verbräunung der Blatexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit vom Wachstumsregulator und dessen Konzentration (Versuch Reg 2)

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen, n = 12 Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

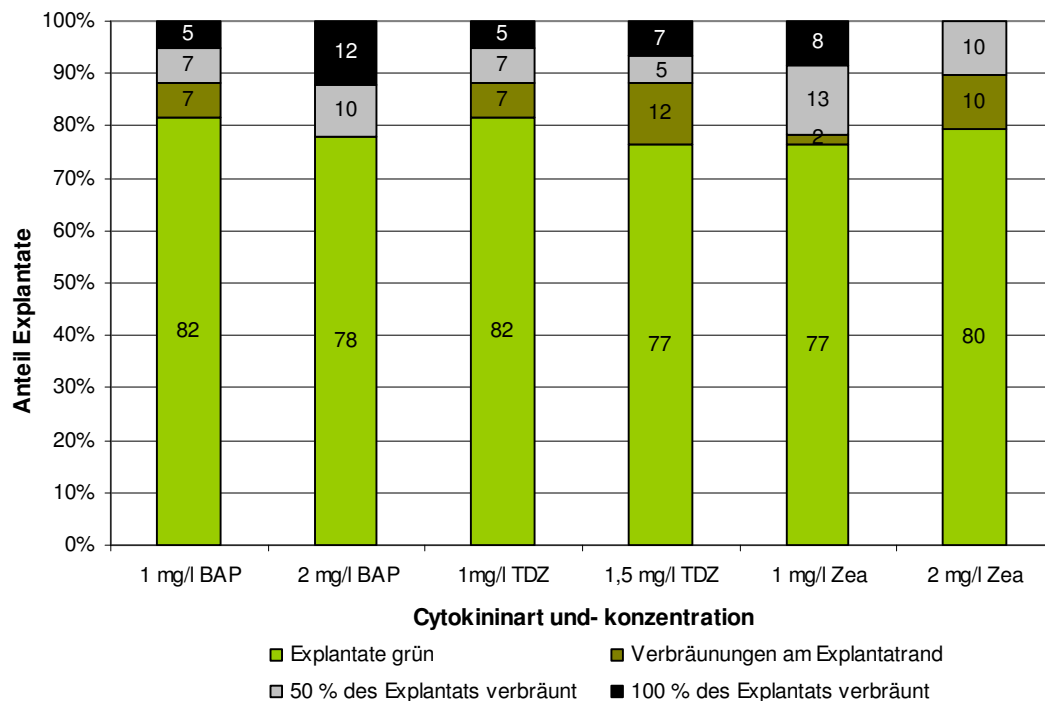


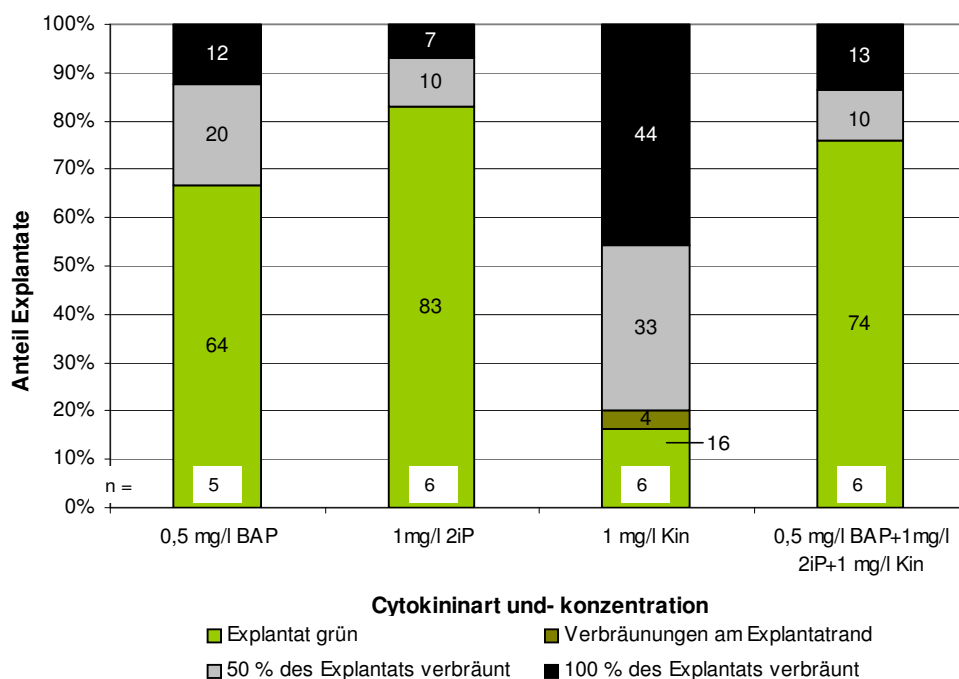
Abbildung A 12: Grad der Verbräunung der Blatexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit vom Wachstumsregulator und dessen Konzentration (Versuch Reg 3)

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen, n = 12 Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 6 Petrischalen)

**Tabelle A 16: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit vom Wachstumsregulator (Versuch Reg 4)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten bei  $p \leq 0,05$ ; n = Anzahl der Wiederholungen

Medienvariante	n	Kallusbildungsrate (%)	
		$\bar{x}$	s
0,5 mg/l BAP	5	96 <sup>a</sup>	± 4
1 mg/l 2iP	6	93 <sup>a</sup>	± 5
1 mg/l Kin	6	81 <sup>a</sup>	± 9
0,5 mg/l BAP + 1 mg/l 2iP + 1 mg/l Kin	6	97 <sup>a</sup>	± 4



**Abbildung A 13: Grad der Verbräunung der Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit vom Wachstumsregulator (Versuch Reg 4)**

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen, n = Anzahl der Wiederholungen

**Tabelle A 17: Wurzelbildung an Explantaten von *H. arborescens* 'Annabelle' in Abhängigkeit vom verwendeten Cytokinin und dessen Konzentration (Versuch Reg 8)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Verschiedene Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Medienvarianten bei  $p \leq 0,05$ ; n = 6 Wiederholungen mit Blattexplantaten bzw. n = 4 Wiederholungen mit Stängel explantaten

Cytokininart und -konzentration	Wurzelbildungsraten (%)			
	an Blattexplantaten		an Stielexplantaten	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1 mg/l BAP	7 <sup>a</sup>	± 5	45 <sup>a</sup>	± 13
2 mg/l BAP	0 <sup>a</sup>	0	60 <sup>a</sup>	± 8
1 mg/l TDZ	0 <sup>a</sup>	0	65 <sup>a</sup>	± 10
1,5 mg/l TDZ	3 <sup>a</sup>	± 4	20 <sup>bc</sup>	± 8
1 mg/l meta-Topolin	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0
2 mg/l meta-Topolin	3 <sup>a</sup>	± 4	0 <sup>b</sup>	0

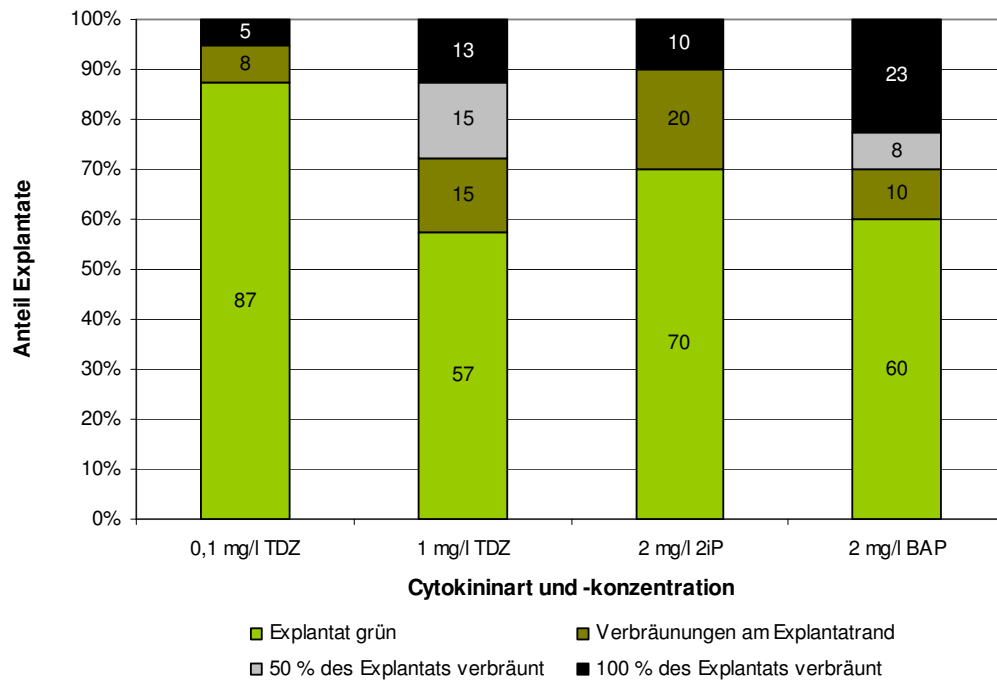


Abbildung A 14: Grad der Verbräunung der Blatexplantate der Sorte *H. arborescens* 'Annabelle' in Abhängigkeit vom Wachstumsregulator und dessen Konzentration (Versuch Reg 9)

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen, n = 6 Wiederholungen

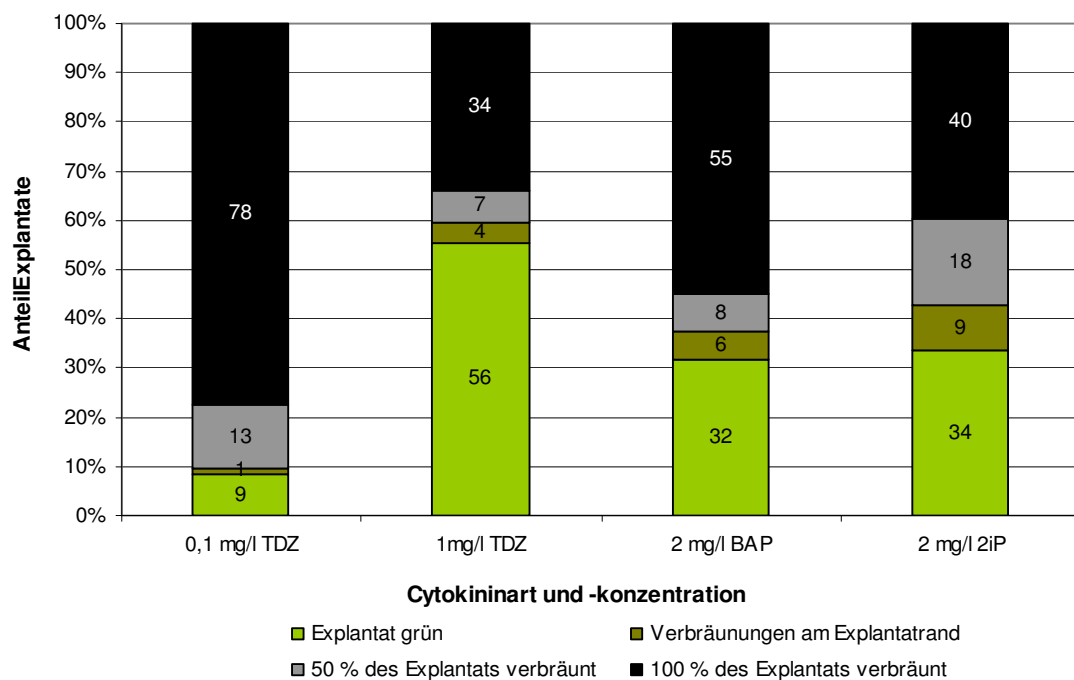


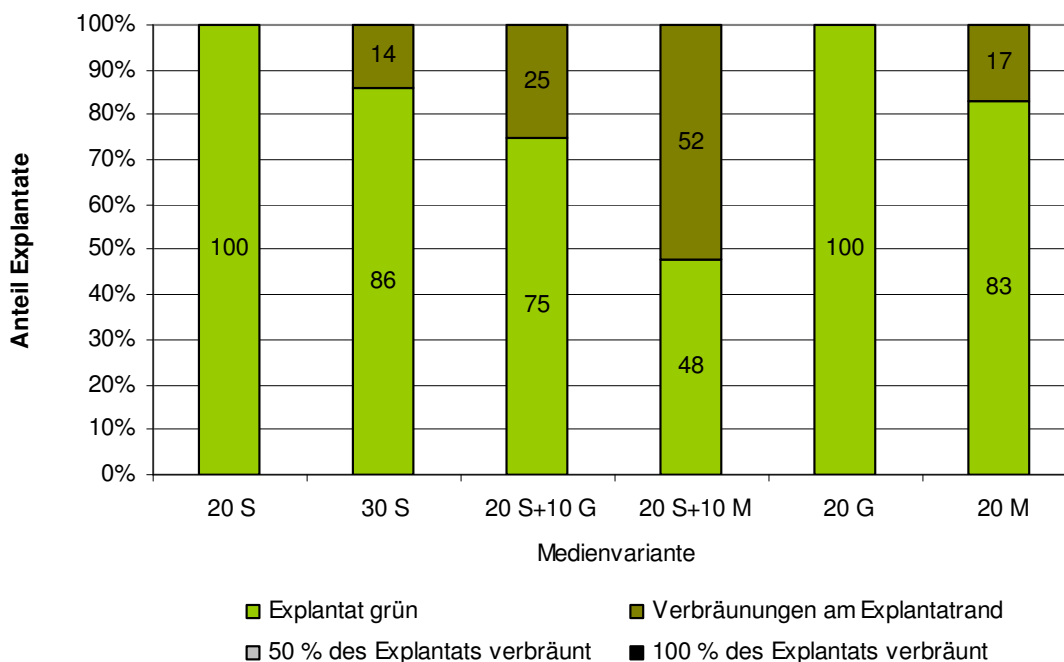
Abbildung A 15: Grad der Verbräunung der Blatexplantate der Sorte *H. quercifolia* 'Pee Wee' in Abhängigkeit vom Wachstumsregulator und dessen Konzentration (Versuch Reg 10)

Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen aus zwei Versuchsdurchgängen, n = 14 Wiederholungen (2 Versuchsdurchgänge à 7 Petrischalen)

**Tabelle A 18: Kallusbildung an Blatt- bzw. Stängel explantaten von *H. arborescens* 'Annabelle' in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 6$  Wiederholungen

Medienvariante	Kallusbildungsraten (%)			
	Blattexplantate		Stängel explantate	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
20 g/l Saccharose	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0
30 g/l Saccharose	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0
20 g/l Saccharose + 10 g/l Glukose	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0
20 g/l Saccharose + 10 g/l Maltose	97 <sup>a</sup>	± 4	97 <sup>a</sup>	± 4
20 g/l Glukose	100 <sup>a</sup>	0	97 <sup>a</sup>	± 4
20 g/l Maltose	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0



**Abbildung A 16: Grad der Verbräunung der Blattexplantate der Sorte *H. macrophylla* 'Blaumeise' in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquellen (Versuchsdurchgang 2)**

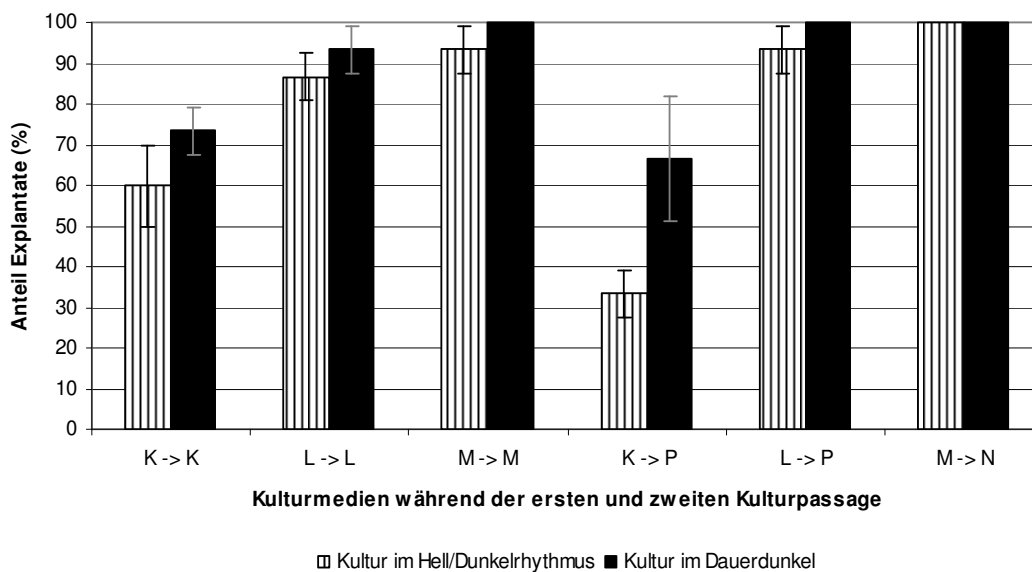
Dargestellt ist das Mittel nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen,  $n = 6$  Wiederholungen

20 S - 20 g/l Saccharose  
 30 S - 30 g/l Saccharose,  
 20 S+10 G - 20 g/l Saccharose + 10 g/l Glukose  
 20 S+10 M - 20 g/l Saccharose + 10 g/l Maltose  
 20 G - 20 g/l Glukose  
 20 M - 20 g/l Maltose

**Tabelle A 19: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Adria' in Abhängigkeit von der Lichtbedingung (Versuch sE 5)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung nach der ersten bzw. der zweiten Kulturpassage. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede nach Tukey-Test bei  $p \leq 0,05$ ,  $n = 14$  Wiederholungen

Kulturbedingung	Anteil Explantate mit Kallusbildung (%)			
	nach der ersten Kulturpassage		nach der zweiten Kulturpassage	
	$\bar{x}$	S	$\bar{x}$	S
Hell/Dunkelrhythmus	43 <sup>a</sup>	± 12	80 <sup>a</sup>	± 9
Dauerdunkel	86 <sup>b</sup>	± 7	94 <sup>b</sup>	± 6



**Abbildung A 17: Kallusbildung an Blattexplantaten der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle' in Abhängigkeit von den verwendeten Kulturmedien (Versuch sE 6)**

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung nach zwei vierwöchigen Kulturpassagen, Kulturmedium während der ersten Passage -> Kulturmedium während der zweiten Passage: K – 2 mg/l BAP+0,5 mg/l 2,4-D; L – 2 mg/l Zeatin + 0,5 mg/l 2,4-D; M – 0,5 mg/l BAP + 0,004 mg/l NAA + 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>; N - 0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l IAA, P - 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kinetin + 1 mg/l NAA;  $n = 3$  Wiederholungen

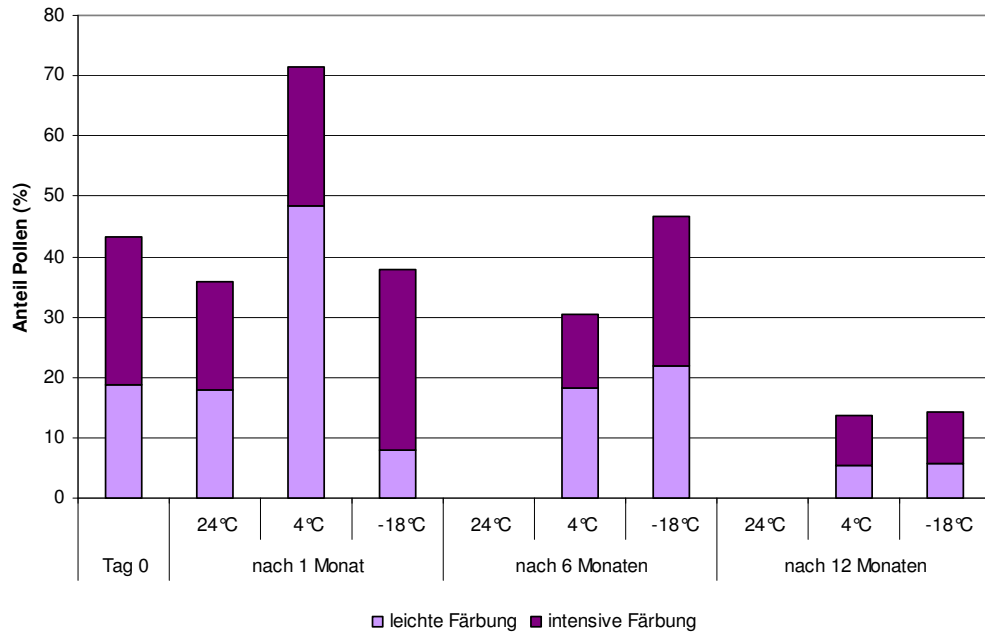


Abbildung A 18: Vitalität von frisch geerntetem (Tag 0) bzw. gelagertem Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle', ermittelt durch Färbung mit MTT

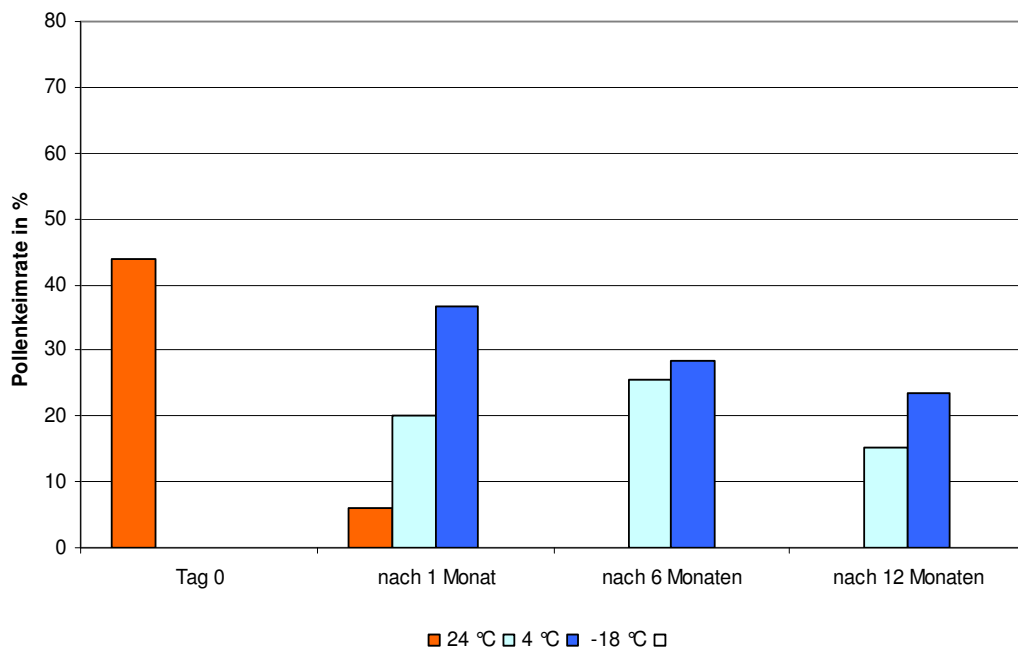


Abbildung A 19: Keimraten von frisch geerntetem (Tag 0) bzw. gelagertem Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Libelle'

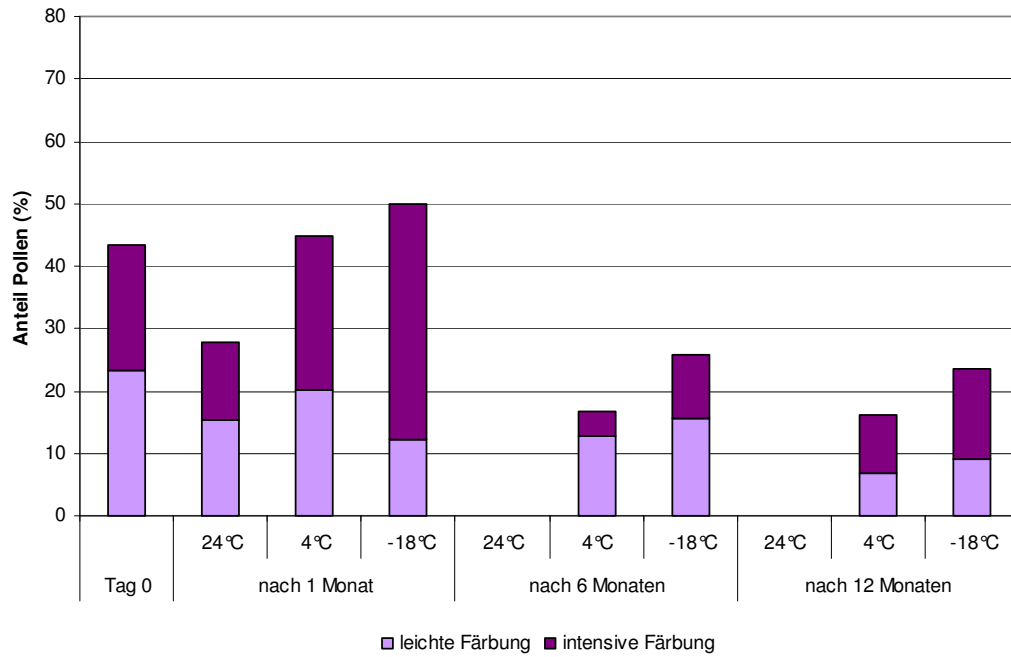


Abbildung A 20: Vitalität von frisch geerntetem (Tag 0) bzw. gelagertem Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Annabelle', ermittelt durch Färbung mit MTT

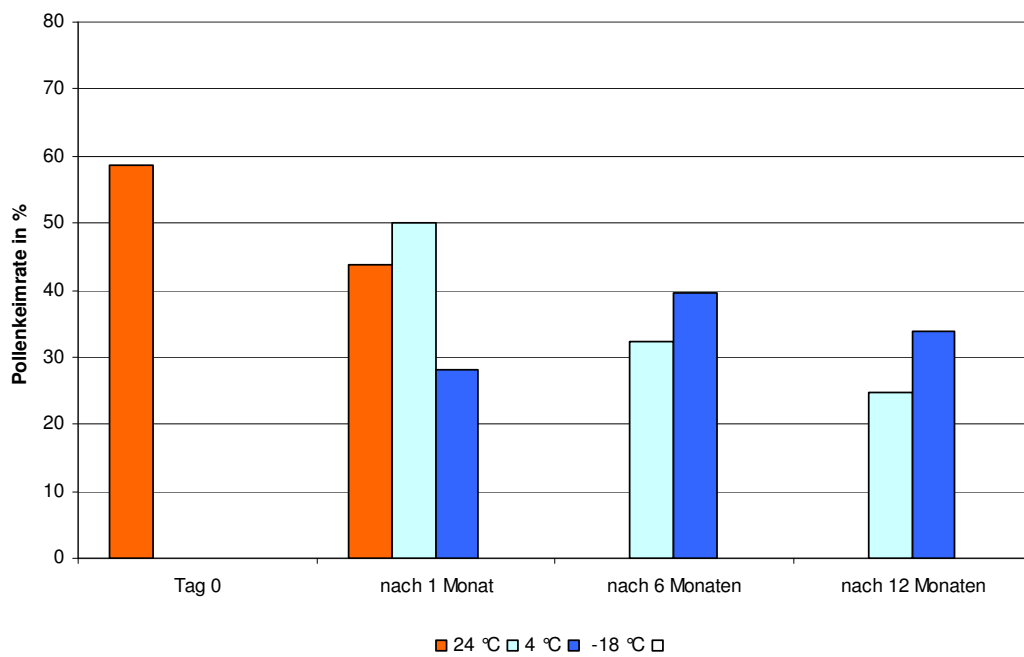


Abbildung A 21: Keimraten von frisch geerntetem (Tag 0) bzw. gelagertem Pollen der Sorte *H. macrophylla* 'Annabelle'

## Danksagung

Diese Seite möchte ich nutzen, um mich bei all denjenigen zu bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet und auf vielfältige Art unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein ganz besonderer Dank Frau Prof. Dr. Traud Winkelmann. Ihr danke ich für die Überlassung des Themas, für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und für ihr außerordentliches Engagement, mit dem sie mich während der gesamten Arbeit begleitet hat.

Für die Mitwirkung in der Prüfungskommission bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Margrethe Serek und Herrn Prof. Dr. Hans-Michael Poehling.

Bei den Kooperationspartnern Frau Dr. Evelyn Klocke, Frau Dr. Anegret Schum, Frau Dipl. Ing. Frauke Engel und bei meiner Mitdotorandin Susanne Gürtler bedanke ich mich für die Unterstützung und die Zusammenarbeit während des Projektes.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der Leibniz Universität Hannover bedanken. Namentlich bei Friederike Schröder, Karin Lein, Anette Steding, Wiltrud von Oertzen, Gisela Bölsing Herbert Geyer, sowie bei allen Mitdotoranden.

Bei Dr. Bernhard Hauser bedanke ich mich für die Möglichkeit die Labor- und Kulturräume des Gewächshauslaborzentrums der TU München zu nutzen. Für die Unterstützung bei der Mikroskopie und im Laboralltag gilt mein Dank Ina Tittel und Irene Ziegler.

Für ihre Unterstützung möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilung Zierpflanzenbau der Forschungsanstalt Weißenstephan in Freising: Dipl. Ing. Franziska Kohlrusch, Dipl. Ing. Hans Haas, Katharina Brandmaier, Claudia Pertschy, Melanie Huber sowie bei dem gesamten Gärtnerteam bedanken.

Herzlichen Dank auch an Carolin Graf und Christine Kübler sowie an Rui Zhang, die mit ihren Diplom- und Bachelorarbeiten einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

M.Sc. Julia Meiners danke ich für eine tolle gemeinsame Bürozeit, für viele hilfreiche Gespräche und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Dr. Melanie Bartsch und bei Dipl. Ing. Kathrin Rump bedanke ich mich für die vielen wertvollen Anregungen bei der Durchsicht dieses Manuskripts.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie dafür, dass sie mich meinen Weg gehen lassen hat und mich dabei in so vielfältiger Weise unterstützt hat, dass diese Seite nicht ausreicht, alles aufzulisten. Ganz besonders möchte ich aber meiner Mama und meiner Schwester danken, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.