

Technische Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

Somatische Embryogenese als modernes, biotechnologisches Vermehrungsverfahren

Daniela Klein

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. agr.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Treutter
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann
2. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel

Die Dissertation wurde am 14.01.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.03.2004 angenommen.

Für Flo

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Diagrammverzeichnis	VII
1. Überblick	1
1.1. Stand des Wissens	2
1.1.1. <i>Pelargónium</i> L'HERIT.	2
1.1.2. Somatische Embryogenese	3
1.1.3. Somatische Embryogenese bei <i>Pelargónium</i>	10
1.1.4. Anwendungsbereiche für somatische Embryonen bei <i>Pelargónium</i>	12
1.1.4.1. Künstliche Samen	12
1.1.4.2. Modell zur Untersuchung der Embryonalentwicklung	13
1.1.4.3. Biotechnologische Züchtung	13
1.2. Ziele der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Pflanzenmaterial	16
2.2. Nährmedien und Kulturgefäße	18
2.3. Inkulturnahme des Pflanzenmaterials	20
2.4. Kulturbedingungen	20
2.5. Übertragung ins Gewächshaus	21
2.6. Transformation mit der Genkanone	21
2.7. Auswertung der Versuche	23
2.8. Statistik	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Einfluss des Pflanzenmaterials auf die Bildung somatischer Embryonen	26
3.1.1. Genotyp (Sortenübersicht)	27
3.1.2. Explantat-Art	33
3.1.3. Explantat-Position an der Pflanze	37
3.1.3.1. Explantat-Position am Blatt	37
3.1.3.2. Explantat-Position an Blatt- und Blütenstandstielen	39
3.1.4. Jahreszeitlicher Verlauf	40

3.1.5. Pflanzen-Herkunft (Klimakammer und Gewächshaus)	44
3.1.6. Alter der Ausgangspflanzen	47
3.1.7. Etiolierung der Ausgangspflanzen	48
3.1.8. Selektion von Pflanzen mit embryogenem Potential	50
3.2. Einfluss des Nährmediums	52
3.2.1. Thidiazuron und Picloram	52
3.2.2. Thidiazuron verschiedener Hersteller mit unterschiedlichen Lösungsmitteln	54
3.2.3. Acetylsalicylsäure	56
3.3. Einfluss der in vitro Kultur-Bedingungen	57
3.3.1. Präparationsart der Explantate	57
3.3.2. Hitzeschock	61
3.3.3. Co-Kultur von Explantaten mit embryogenen Hypokotyl-Kulturen	62
3.4. Isolierung somatischer Embryonen und Überführung ins Gewächshaus	64
3.5. Versuche zu den Anwendungsbereichen	65
3.5.1. RITA-Gefäße bei Hypokotyl-Explantaten	65
3.5.2. RITA-Gefäße bei Petiolen-, Blütenstandstiel und Knospen-Explantaten	69
3.5.3. Transformation mit der Genkanone	72
4. Diskussion	74
4.1. Einfluss des Pflanzenmaterials	74
4.2. Einfluss des Nährmediums	80
4.3. Einflüsse der in vitro Kultur-Bedingungen	82
4.4. Isolierung und Überführung ins GWH	84
4.5. Anwendungsbereiche	84
4.5.1. Flüssigkultur (RITA-Gefäße)	84
4.5.2. Transformation mit der Genkanone	86
5. Zusammenfassung	88
6. Summary	90
7. Literaturverzeichnis	92
Danksagung	97
Lebenslauf	98

Abkürzungsverzeichnis

ASA	Acetylsalicylsäure
BA	6-Benzyladenin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
2,4-D	2,4 Dichlorophenoxyessigsäure
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Embr.	Embryonen
IAA	Indolyl-3-Essigsäure
IEDC	induced embryologically determined cell
KOH	Kalilauge
min	Minuten
M	molar
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
MS	MURASHIGE und SKOOG
NAA	Naphtylessigsäure
P.	Pelargónium
PEDC	preembryonic determined cell
PEM	proembryonic masses
PZH	<i>Pelargónium zonale</i> Hybride
s.E./Expl.	somatische Embryonen/Explantat
somat.	somatische
TDZ	Thidiazuron
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: globuläres Stadium eines somatischen Embryos _____	4
Abbildung 2: Herz-Stadium eines somatischen Embryos _____	5
Abbildung 3: Torpedo-Stadium eines somatischen Embryos _____	5
Abbildung 4: Kotyledonen-Stadium eines somatischen Embryos _____	6
Abbildung 5: junge Pflanze aus einem somatischen Embryo _____	6
Abbildung 6: zwei Embryonen im Kotyledonen-Stadium, einer mit Wurzel _____	7
Abbildung 7: normal entwickelte und vitrifizierte junge Pflanzen aus somatischen Embryonen _____	24
Abbildung 8: somatischer Embryo im Kotyledonen-Stadium mit verdrehten Keimblättern _____	24
Abbildung 9: Petiolen-Explantat von 'Rio' mit Kalluskugeln _____	32
Abbildung 10: Blütenstandstiel-Explantat von 'Perlenkette Scarlet' mit somatischen Embryonen _____	33
Abbildung 11: Petiolen-Explantat von 'Perlenkette Scarlet' _____	36
Abbildung 12: Knospen-Explantat von 'Perlenkette Scarlet' _____	37
Abbildung 13: globuläres Embryonen-Cluster an Blütenstandstiel- Explantat von 'Perlenkette Scarlet' _____	43
Abbildung 14: Embryonen-Cluster mit KotyledonenStadien an Knospen- Explantat von 'Perlenkette Scarlet' _____	44
Abbildung 15: Blütenstandstiel-Explantat von 'Perlenkette Scarlet' _____	46
Abbildung 16: zerlegtes RITA-Gefäß _____	67
Abbildung 17: Aufsicht auf geöffnetes RITA-Gefäß neben Petrischale, beide mit Hypokotyl-Explantaten _____	68
Abbildung 18: globuläre Embryonen mit blauer GUS-Färbung _____	72
Abbildung 19: Petiolen-Explantat mit exprimierten GUS-Konstrukt nach Lagerung in Ethanol _____	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Pelargonium-Zonale-Hybriden _____	16
Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums (nach MURASHIGE und SKOOG, 1962) _____	18
Tabelle 3: Einfluss verschiedener Genotypen und Explantat-Arten, Statistische Auswertung _____	29
Tabelle 4: Überlebensraten der Explantate in % _____	30
Tabelle 5: Höchstwerte innerhalb der Explantat-Arten _____	31
Tabelle 6: Einfluss der Explantatart, Statistische Auswertung _____	35
Tabelle 7: Überlebensrate der Explantate in % _____	35
Tabelle 8: Einfluss der Explantat-Position am Blatt, Statistische Auswertung _____	38
Tabelle 9: Einfluss der Explantat-Position bei Petiole und Blütenstandstiel, Statistische Auswertung _____	40
Tabelle 10: Einfluss der Jahreszeit, Statistische Auswertung _____	42
Tabelle 11: Einfluss der Pflanzen-Herkunft, Statistische Auswertung _____	45
Tabelle 12: Einfluss des Alters der Ausgangspflanzen, Statistische Auswertung _____	47
Tabelle 13: Einfluss der Vorbehandlung (Etiolierung), Statistische Auswertung _____	49
Tabelle 14: Einfluss von selektierten Genotypen, Statistische Auswertung _____	51
Tabelle 15: Einfluss von Thidiazuron und Picloram, Statistische Auswertung _____	54
Tabelle 16: Einfluss verschiedener Thidiazuron-Hersteller und Lösungsmittel, Statistische Auswertung _____	55
Tabelle 17: Einfluss von Acetylsalicylsäure, Statistische Auswertung _____	57
Tabelle 18: Einfluss der Präparationsart, Statistische Auswertung _____	59

Tabelle 19: Einfluss eines Hitzeschocks, Statistische Auswertung_____	62
Tabelle 20: Einfluss einer Co-Kultur von Petiolen- und Hypokotylen- Explantaten, Statistische Auswertung _____	63
Tabelle 21: Regenerierungsrate von isolierten somatischen Embryonen_____	64
Tabelle 22: Einfluss der Kulturgefäße bei Hypokotylen, Statistische Auswertung _____	66
Tabelle 23: Einfluss der Kulturgefäße bei Petiolen, Blütenstandstielen und Knospen, Statistische Auswertung_____	70
Tabelle 24: Überlebensrate der Explantate _____	71
Tabelle 25: Ergebnisse von Versuch 3.1.1., geordnet nach Züchtergruppen mit jeweiligem Minimum- und Maximum-Wert _____	74

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Einfluss verschiedener Genotypen (Sorten) und Explantat- Arten _____	28
Diagramm 2: Einfluss verschiedener Explantat-Arten bei 'Perlenkette Scarlet' _____	34
Diagramm 3: Einfluss der Explantatposition am Blatt _____	38
Diagramm 4: Einfluss der Explantatposition an Petiolen und Blütenstandstielen _____	39
Diagramm 5: Einfluss der Jahreszeit bei 'Tango Dark Red' _____	41
Diagramm 6: Einfluss der Jahreszeit bei 'Perlenkette Scarlet' _____	41
Diagramm 7: Einfluss von Gewächshaus- und Klimakammer- Ausgangspflanzen _____	45
Diagramm 8: Einfluss des Alters der Ausgangspflanzen _____	47
Diagramm 9: Einfluss einer Etiolierung der Ausgangspflanzen _____	49
Diagramm 10: Einfluss von selektiertem Pflanzenmaterial _____	50
Diagramm 11: Einfluss von Thidiazuron und Picloram _____	53
Diagramm 12: Einfluss verschiedener Thidiazuron-Hersteller und Lösungsmittel _____	55
Diagramm 13: Einfluss von Acetylsalicylsäure _____	56
Diagramm 14: Einfluss der Präparationsart der Explantate _____	58
Diagramm 15: Überlebensrate in % bei verschiedenen Präparationsarten ____	59
Diagramm 16: Einfluss eines Hitzeschocks _____	61
Diagramm 17: Einfluss einer Co-Kultur von Petiolen- und Hypokotylen- Explantaten _____	63
Diagramm 18: Einfluss der Kulturgefäße bei Hypokotyl-Explantaten _____	66
Diagramm 19: Einfluss der Kulturgefäße bei Petiolen, Blütenstandstielen und Knospen _____	69

1. Überblick

Die Gattung *Pelargonium* belegte auch im Jahr 2002 wieder Platz 1 der TOP 10-Liste auf dem deutschen Blumen- und Pflanzenmarkt im Bereich Beet und Balkonpflanzen (Quelle: www.florakom.de).

Ein Grund mehr, sich mit einem neuen Vermehrungsverfahren für diese wichtige Gattung zu beschäftigen. Die Vermehrung über somatische Embryogenese birgt einige Vorteile im Vergleich zum üblichen Vermehrungsverfahren über Stecklinge. Neben Kosteneinsparung bei der Vermehrung durch die Herstellung so genannter künstlicher Samen, bieten sich auch im biotechnologischen Bereich Grundlagen für züchterische Verfahren. Als Beispiel sei hier die Transformation von Pflanzenmaterial (somatischen Embryonen) mit Hilfe der so genannten Genkanone („particle bombardement“) genannt.

Für Pelargonien, die über Aussaat vermehrt werden, existiert bereits ein sicheres Verfahren zur Induktion somatischer Embryonen (Hypokotyle dienen hier als Ausgangsgewebe). Viel interessanter wäre diese Art der Vermehrung aber für Pelargonien, die nur über Stecklinge vermehrt werden können, gerade unter dem Gesichtspunkt, dass die Herstellung von somatischen Embryonen eine günstigere und schnellere Alternative bietet, als die Vermehrung über Stecklinge.

Ziel dieser Arbeit war es also, Faktoren zu bestimmen, die die Induktion bei Stecklingspelargonien beeinflussen und damit eine Grundlage bieten, um somatische Embryogenese bei Pelargonien sicher induzieren zu können. Die beiden wichtigsten Bereiche, in denen gearbeitet wurde, waren dabei das Nährmedium in seiner Zusammensetzung und das Pflanzenmaterial. Bezüglich des Pflanzenmaterials wurden Varianten wie die Art der Explantate, das Alter und die Position an der Pflanze und vor allem der Genotyp getestet.

Außerdem wurden Versuchs-Ansätze in Richtung zweier Anwendungsbereiche durchgeführt: die Kultivierung in Flüssigkultur mit RITA-Gefäßen als Grundlage für die Produktion künstlicher Samen und der Beschuss von somatischen Embryonen mit der Genkanone als Werkzeug der biotechnologischen Züchtung.

1.1. Stand des Wissens

1.1.1. *Pelargónium* L'HERIT.

Die Gattung *Pelargónium* (Pelargonie, Geranie) gehört zusammen mit 10 anderen Gattungen zur Familie *Geraniaceae* (Storchnabelgewächse).

Namensgebend ist die Frucht, die sich zusammensetzt aus fünf verwachsenen, langen Fruchtblättern. Am Grund entwickelt sich nur eine Samenanlage, und die darüber liegenden Grannen bilden den so genannten „Schnabel“. Die Grannen sind hygroskopisch und ziehen sich bei Trockenheit zusammen, so dass der Samen herausgeschleudert wird. Typisch für *Pelargónium* sind auch die fünfzähligen, dorsiventralen und gespornten Blüten (STRASBURGER 1991).

Die fünf Wildarten, aus denen die heutigen Kulturformen hervorgegangen sind, sind fast alle in Südafrika beheimatet (HORN 1996). Durch Artkreuzungen von *P. zonale*, *P. peltatum*, *P. grandiflorum*, *P. inquinans* und *P. lateripes*, beginnend im 18. Jahrhundert in Frankreich, entstanden die heute auf dem Markt befindlichen Hybriden. Erstmals nach Europa eingeführt wurde *Pelargónium zonale* 1609 (MITHILA et al. 2001).

Besondere wirtschaftliche Bedeutung haben neben den P.-Grandiflorum-Hybriden (*P. grandiflorum*, Edelpelargonie) vor allem P.-Peltatum-Hybriden (*P. peltatum* L., Efeublättrige Geranie) und P.-Zonale-Hybriden (*P. zonale* L., Stehende Geranie). Mit jährlich ca. 120 Millionen Stück verkaufte Pflanzen (jeweils 50 %) nehmen die beiden letztgenannten auf der TOP 10-Liste der Beet- und Balkonpflanzen nach wie vor den ersten Platz in Deutschland ein. Der Absatz ist aufgrund der Haupt-Verwendung als Balkonpflanze, vor allem von April bis Mai (HORN 1996). Weltweit, dabei vor allem in Europa und Nordamerika, wird der Warenverkaufswert von *Pelargónium* jährlich auf etwa US-\$ 450 Million geschätzt (MITHILA et al. 2001).

P.-Peltatum-Hybriden (PPH) und P.-Zonale-Hybriden (PZH) sind meist tetraploid mit einem Chromosomensatz von $2n=36$. Diese Sorten sind zum größten Teil nur über Stecklinge vermehrbar. Es existieren auch samenvermehrbar Sorten (Sämlingspelargonien), die jedoch meist diploid ($2n=18$) sind und sich dadurch auch bezüglich des Habitus unterscheiden: längere Internodien, weniger Verzweigungen. Sie nehmen von der Gesamtproduktion in Deutschland etwa 10% ein, in den USA 50%. Die in Deutschland hauptsächlich angewandte Art der Vermehrung ist die über Stecklinge. Hierzu ist eine große Menge an absolut virusfreiem

Mutterpflanzenmaterial erforderlich. Aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes bei der Stecklingsentnahme und damit verbundenen hohen Lohnkosten, werden die Mutterpflanzenbetriebe meist in südliche europäische Länder, wie z.B. Spanien verlegt (sogenannte „Südbetriebe“). Ein weiterer Vorteil dieser Betriebe ist natürlich das günstigere Klima.

Aber auch *Pelargónium*-Samen sind sehr teuer. So kosten 1000 Samen etwa US-\$ 80. (MITHILA et al. 2001). Diese Preise rechtfertigen sich durch die intensive Züchtung, ständige Verbesserung des Sortiments und den hohen Arbeitsaufwand auch im Bereich der damit verbundenen Gewebekultur.

1.1.2. Somatische Embryogenese

Der Begriff „somatische Embryogenese“ setzt sich aus zwei Wörtern zusammen. „Somatisch“ kommt von dem griechischen Wort *soma*, das „Leib“ oder „Körper“ bedeutet. Unter „Embryogenese“ versteht man die Entwicklung eines Embryos, beginnend bei einer Einzelzelle (BROCKHAUS ENZYKLOPÄDIE 1988).

Somatische Embryogenese bei Pflanzen ist die Entwicklung eines Embryos, ausgehend von einer somatischen Zelle. Somatische Zellen können z.B. aus dem Gewebe von Hypokotylen, Petiolen, Blattscheiden oder Wurzeln stammen. Dadurch dass auf vegetativem Wege ein erbgleiches Derivat der Ausgangszelle entstanden ist, bezeichnet man die sich daraus entwickelnde Pflanze auch als „Klon“ (HEß 1992). Eine ähnliche Entwicklung ist die, in der Natur vorkommende Apomixis, die so genannte Jungfernzeugung. Hierbei bildet sich ein Embryo ohne vorherige Verschmelzung von Gameten, den geschlechtlich differenzierten, haploiden Keimzellen (NEUMANN 1995). Es ist die völlige Degeneration der sexuellen Fortpflanzung und genetischen Rekombination und auch hier entstehen erbgleiche Nachkommen.

Obwohl hier keine Zygote die Basis für eine Embryonalentwicklung ist, zeigen sich doch morphologisch starke Parallelen im Entwicklungsverlauf und das Produkt ist in beiden Fällen eine intakte Pflanze. Neben dem Begriff somatischer Embryo existieren noch die Bezeichnungen embryoähnliche Strukturen, Embryoid oder Adventivembryo (HEß 1992). Wie auch bei einer zygotischen Embryogenese kommt es zu Beginn zu einer asymmetrischen Zellteilung.

Einige Voraussetzungen müssen gegeben sein, damit es zur Bildung von somatischen Embryonen kommen kann: Die Zelle muss eine embryogene Kompetenz besitzen, um sich von einer somatischen in eine embryogene Zelle

umwandeln zu lassen. Des Weiteren muss ein geeigneter Stimulus vorhanden sein um diese Embryonalentwicklung auszulösen und letztlich muss ein Medium vorhanden sein, in dem sich diese Entwicklung vollziehen kann.

Wenn all diese Bedingungen erfüllt sind, kann es zur somatischen Embryogenese kommen. Man unterscheidet bei der Entwicklung folgende Stadien:

Das globuläre Stadium (Abbildung 1): Nach erfolgreicher Stimulation bildet sich, ausgehend von einer somatischen Zelle, eine kugelförmige Struktur.

Das Herz-Stadium (Abbildung 2): Aus dieser kugeligen Struktur heraus beginnen sich die Kotyledonen abzuzeichnen. Die beiden Erhebungen geben dem Embryo eine herzförmige Struktur.

Das Torpedo-Stadium (Abbildung 3): Die Struktur ähnelt der des Herz-Stadiums, das Hypokotyl jedoch streckt sich und der Embryo besitzt nun eine längliche Form.

Das Kotyledonen-Stadium (Abbildung 4): Die Kotyledonen bilden sich noch stärker heraus und sind nun auch als solche erkennbar.

Nach Erreichen des vierten Stadiums bezeichnet man den Embryo als reif, da er seine Embryonalentwicklung abgeschlossen hat. Er ist nun in der Lage, sich in eine intakte Pflanze weiter zu entwickeln (Abbildung 5).

Die einzelnen Stadien, wie sie bei den Versuchen beobachtet wurden, zeigen Abbildungen 1 bis 5.

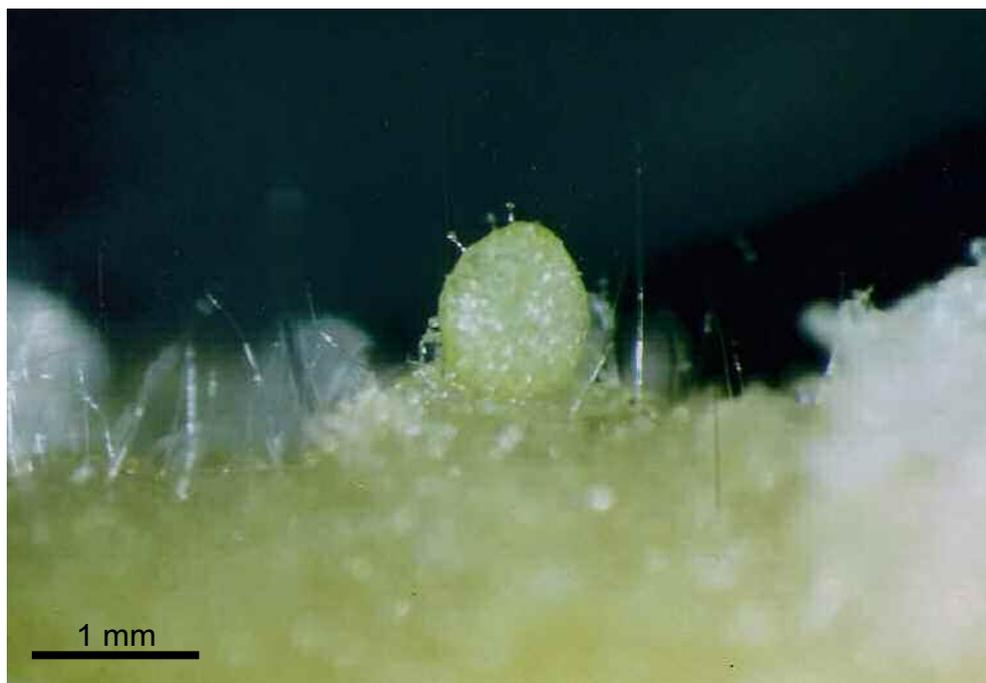


Abbildung 1: globuläres Stadium eines somatischen Embryos



Abbildung 2: Herz-Stadium eines somatischen Embryos

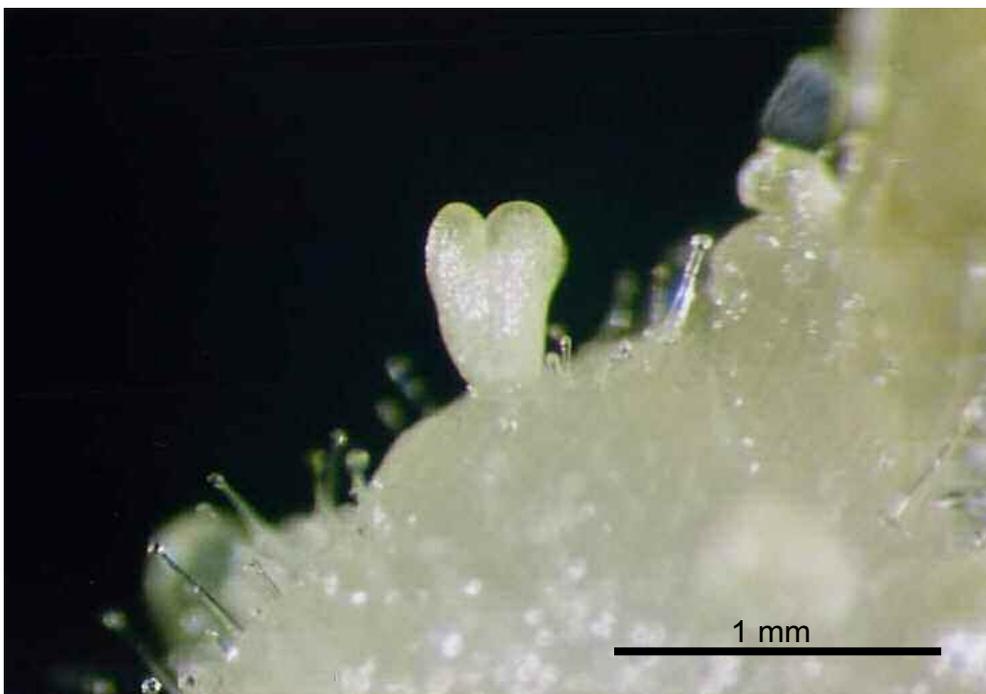


Abbildung 3: Torpedo-Stadium eines somatischen Embryos



Abbildung 4: Kotyledonen-Stadium eines somatischen Embryos



Abbildung 5: junge Pflanze aus einem somatischen Embryo

Im Gegensatz zur Embryogenese steht die Organogenese, die weitaus häufiger bei *in vitro* Vermehrungen genutzt wird. Hierbei wird nur ein Organ der Pflanze induziert. Z.B. wird über ein Apikalmeristem mit Phytohormonen ein Apikalspross induziert. In einem zweiten Schritt wird dann an diesem Apikalspross eine Wurzel induziert (STANDARDI und PICCIONI 1998). Bei der Embryogenese hingegen bildet sich eine bipolare Struktur. Sowohl Wurzel- als auch Sprossanlagen sind vorhanden und bilden sich in einem Schritt aus. Die in Abbildung 5 gezeigte junge Pflanze, die sich noch am Explantat befindet, ist nur seitlich dünn mit ihm verbunden und zeigt im unteren Bereich die Wurzelanlagen. Eine bereits ausgebildete Wurzel bei einem somatischen Embryo im Kotyledonen-Stadium zeigt Abbildung 6.



Abbildung 6: zwei Embryonen im Kotyledonen-Stadium, einer mit Wurzel

Kennzeichnend für eine Organogenese ist außerdem die klare Verbindung zum Ausgangsgewebe, aus dem der Apikalspross sich entwickelt hat. Bei der Embryogenese hingegen ist die Verbindung zum Ausgangsgewebe sehr dünn und der Embryo bildet ein eigenes Gefäßsystem aus (THORPE 1993).

Bei der zygotischen Embryogenese, also die Entstehung eines Embryos in einem Samen, sind die Entwicklungsschritte der einzelnen Stadien identisch. Im Unterschied dazu hat ein zygotischer Embryo am Ende seiner Entwicklung im reifen Samen jedoch ein Endosperm, das ihn während der Keimung mit Nährstoffen

versorgt und als äußerste Schicht eine feste Samenhülle zum Schutz. Diese beiden Schichten sind beim somatischen Embryo nicht vorhanden.

Grundsätzlich unterscheidet man bei der somatischen Embryogenese noch zwei verschiedene Formen. Zum einen die indirekte Embryogenese, bei der es zunächst zu einer Kallusbildung kommt und erst anschließend zu einer Embryogenese. Wenn ein Embryo aus einer induzierten Kalluszelle entsteht, wird diese auch „induced embryologically determined cell“ (IEDC) genannt. Die Zelle wird also zunächst in eine undifferenzierte Kalluszelle transformiert und anschließend in eine embryogene.

Bei der direkten Embryogenese entsteht der Embryo direkt aus einer (meist parenchymatischen) Zelle. Die Zelle, aus der der Embryo entsteht wird auch „pre-embryonic determined cell“ (PEDC) genannt (BHOJWANI S.S. und RAZDAN M.K. 1983). Der Vorteil, den eine direkte Embryogenese bietet, ist der, dass es zu weitaus weniger somaklonaler Variation kommt, Mutationen die durch eine Kallusbildung oft hervorgerufen werden. Die direkte somatische Embryogenese wurde jedoch bislang bei sehr viel weniger Pflanzenarten beschrieben als die indirekte (NEUMANN 1995).

Erstmals beschrieben wurde die somatische Embryogenese 1958 von REINERT und von STEWARD et al. bei der Karotte (*Daucus carota*). Dabei beobachteten STEWARD et al. Embryonen bei sekundären Phloemzellen in Suspensionskultur. Die Entwicklung der einzelnen Zellen nach einigen Teilungsstadien beschrieben sie als vergleichbar einer zygotischen Embryogenese. Sie vermuteten die Ursache der Totipotenz in der Isolation von einzelnen Zellen oder Zellgruppen. STEWARD et al. (1958) arbeiteten noch mit Kokosnussmilch als Zusatz zum Nährmedium, während REINERT (1958) somatische Embryonen auch auf Medium ohne diesen Zusatz nachwies.

Ein weiteres Beispiel für die Entwicklung eines sicheren Vermehrungsverfahrens über die somatische Embryogenese ist die Ölpalme (*Elaeis guineensis*). Über die Induktion somatischer Embryonen (indirekt) an Kalluskulturen mithilfe hoher 2,4-D (2,4 Dichlorophenoxyessigsäure) -Konzentrationen (gehört zur Phytohormon-Gruppe der Auxine) konnte man dem Bedarf an Klonen von Pflanzen mit hohem Ölgehalt gerecht werden (PIERIK 1997).

Ein Verfahren zur Produktion von künstlichen Samen existiert z.B. für die Luzerne (*Medicago sativa*), bei der die somatische Embryogenese auch eingehend untersucht ist. Die auf Kallus induzierten somatischen Embryonen werden bei der Luzerne zur Herstellung künstlicher Samen genutzt (HEß 1992).

Die Familie der *Umbelliferae* und hier vor allem die Karotte waren Standardobjekt zur Untersuchung der somatischen Embryogenese. Aber auch bei Vertretern anderer Familien, wie *Ranunculaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, *Apiaceae* und *Poaceae* ließen sich somatische Embryonen induzieren (PIERIK 1997). NEUMANN (1995) spricht mittlerweile von 100 Arten aus 60 Familien, bei denen somatische Embryogenese beobachtet wurde. THORPE (1988) geht sogar von über 130 Arten aus.

So unterschiedlich die Arten, so unterschiedlich auch das Gewebe, an dem man somatische Embryonen induziert, wie z.B. Petiolen von *Begonia gracilis* (CASTILLO und SMITH 1997), Stempel diverser *Citrus*-Arten (CARIMI et al. 1999), Blätter von *Arachis hypogaea* L., der Erdnuss (BAKER und WETZSTEIN 1998) oder Mikrosporen von *Datura innoxia* (GUHA und MAHESHWARI 1964).

Bei den meisten Arbeiten stellte sich heraus, dass eine hohe Auxin-Konzentration (meist 2,4-D) zu Beginn der Kultur die Bildung somatischer Embryonen auslöst. Anschließend musste meist eine Auxin-schwache oder -freie Phase folgen.

Als Ausgangsmaterial für die Bildung einzelner somatischer Embryonen wurden zum einen einzelne Zellen aber auch Zellverbände (sogenannte PEM= proembryogenic masses) beschrieben.

Das Interesse an der somatischen Embryogenese ist hoch, vor allem deswegen, weil eine große Zahl von Pflanzen, auf kleinem Raum mit wenig Ausgangsmaterial hergestellt werden kann. Es gibt jedoch zwei Faktoren, die diese Art der Vermehrung eingrenzen. Zum einen die somaklonale Variation, die vor allem bei einer sekundären Embryogenese über Kallus gegeben sein kann. Bei der Herstellung von Klonen sind solche Mutationen nicht erwünscht. Zum anderen wurden erst bei sehr wenigen Arten sichere Verfahren entwickelt (AMMIRATO et al. 1990).

1.1.3. Somatische Embryogenese bei *Pelargónium*

Kalluskulturen waren 1956 bei *Pelargónium*, wie bei vielen anderen Pflanzenarten auch die ersten in vitro Kulturen, mit denen man arbeitete (MAYER 1956). Hervorgerufen wurde die Regeneration von Kallus durch Auxin. Die direkte Induktion von Sprossen erfolgte dann 1967, auch an Stiel-Explantaten (CHEN und GALSTON 1967).

Seither dienen verschiedene Explantat-Typen zur Induktion von Kallus, aus dem im weiteren Entwicklungsverlauf dann Sprosse und Wurzeln entstehen. Solche Explantat-Typen sind: Markzellen, Blattstiele (Petiolen), Antheren und Sprossspitzen (CHEN und GALSTON 1967, PILLAI und HILDEBRANDT 1968, DEBERGH und MAENE 1977). PILLAI und HILDEBRANDT (1969) arbeiteten dabei mit einem hohen Cytokinin-Auxin Verhältnis.

Auch das wirtschaftliche Interesse großer Pelargonium-Produzenten nahm einen Einfluss auf den Verlauf der wissenschaftlichen Arbeiten. Das Interesse war schon immer groß, kostengünstigere Vermehrungsverfahren zu entwickeln als Alternative zur herkömmlichen Stecklingsvermehrung. PILLAI und HILDEBRANDT waren 1968 die ersten, die Pflanzen aus Meristem-Kulturen regenerierten, eine Grundlage bei der Stecklingsvermehrung zur Herstellung virusfreier Mutterpflanzen.

Zur Induktion von Adventiv-Sprossen wurde eine Reihe von Versuchen angestellt. Neben dem Explantat-Typ (MATHILA 2001) und einer Optimierung der Phytohormone (DESILETS et al. 1993) war eine Reduktion der Salzkonzentrationen im Stamm-Medium förderlich (HILDEBRANDT und HARNEY 1988).

Es zeigte sich, dass Hypokotyl-Explantate von jungen Sämlingen das höchste Potential zur Regeneration besitzen (CHANG et al. 1996). Des Weiteren wurden aber auch Pflanzen regeneriert an Petiolen (ROBICHON et al. 1997) mit Thidiazuron (TDZ) und Indolyl-3-Essigsäure (IAA).

CASSELLS berichtete 1979 erstmals von vegetativen Embryonen mit einer bipolaren Struktur bei der PZH Sorte 'Irene'. Er arbeitete mit Kallus, den er mit einem Zeatin- und Naphtylessigsäure (NAA)-haltigen Medium an Petiolen-Explantaten induzierte.

MARSOLAIS et al. verwendeten dann 1991 den Begriff somatische Embryogenese bei ihren Arbeiten. Induziert wurden die somatischen Embryonen an Petiolen und Hypokotylen von Pelargonium-Zonale-Hybriden und Petiolen von Pelargonium-Grandiflorum-Hybriden. Sie untersuchten diverse Einflussfaktoren auf die Bildung somatischer Embryonen, wie den des Nähr-Mediums (Auxinart und -konzentration,

Aminosäuren, pH-Wert, Basalmedium) aber auch den Einfluss des Genotyps. Mit einem Medium, das IAA und 6-Benzyladenin (BA) enthielt, konnten sie bei allen verwendeten 30 Sorten eine Bildung von somatischen Embryonen erzielen und zwar in einem Bereich von 0,2 bis 6,9 Embryonen pro Hypokotyl-Explantat, abhängig von der Sorte.

WILSON et al. (1996) arbeiteten auch mit Hypokotyl-Explantaten von PZH. Auch bei ihnen war die Sorte 'Scarlet Orbit Improved', wie bei den meisten Untersuchungen mit Hypokotylen die erfolgreichste bei der Induktion somatischer Embryonen mit BA. MARSOLAIS et al. (1991) induzierten dagegen mit IAA. Als förderliche Einflussfaktoren fanden sie zusätzlich eine optimale Zuckerkonzentration von 3-6 % und eine Zugabe von Ammonium-Nitrat.

Variationen bei diesen Versuchen betrafen vor allem das Basalmedium und die Phytohormone (WILSON et al. 1996, MARSOLAIS et al. 1991, HAENSCH 1999, MURTHY et al. 1996). So entwickelten z. B. MARSOLAIS et al. 1991 das Basalmedium GCM, speziell für *Pelargónium*. Die Phytohormon-Gruppe der Auxine zeigte sich als geeignetster Stimulus.

1992 berichteten VISSER et al. erstmals von Thidiazuron (TDZ) zur Induktion von somatischen Embryonen bei Hypokotyl-Explantaten von Pelargonium-Zonale-Hybriden. Sie arbeiteten mit einer TDZ-Konzentration von 10 μM und einer Induktionsdauer von drei Tagen, bevor die Explantate auf phytohormonfreies Medium überführt wurden.

TDZ ist eine Phenylharnstoffverbindung (N-Phenyl-N'1,2,3-Thidiazurol-5-yl-Harnstoff) mit einer Cytokinin-ähnlichen Wirkung. Damit wurde die bis dahin gültige Annahme verworfen, dass allein Auxin bzw. eine Auxin-Cytokinin-Kombination (vor allem IAA und BA) zur Induktion von somatischen Embryonen geeignet sind (MARSOLAIS et al. 1991). Man nimmt an, dass TDZ in die Biosynthese oder den Metabolismus von endogenen Auxinen eingreift (VISSER et al. 1992, HUTCHINSON und SAXENA 1996b).

Die Anzahl somatischer Embryonen konnte bei Hypokotyl-Explantaten von Pelargonium-Zonale-Hybriden drastisch erhöht werden. So erreichten GILL et al. 1993 bei Explantaten, die aus der Epidermis und einigen subepidermalen Zellschichten von Hypokotylen bestanden, mit 1,5 μM TDZ ein Maximum von 51 somatischen Embryonen pro Explantat.

GILL et al. waren es auch, die 1994 die ersten künstlichen Samen erzeugten, durch Einkapselung von somatischen Embryonen in Natrium-Alginat und Calciumchlorid. Nach erfolgreicher Keimung entwickelten sich diese zu blühende Pflanzen.

1.1.4. Anwendungsbereiche für somatische Embryonen bei *Pelargónium*

1.1.4.1. Künstliche Samen

Durch die Vermehrung über ein in vitro Verfahren ergeben sich eine Reihe von Vorteilen im Vergleich zum üblichen Vermehrungsverfahren über Stecklinge: Schnellere Vermehrung, niedrigere Produktionskosten, Vereinfachung im Handling, Lagerung und Transport und eine geringere Verseuchungs-Gefahr (MITHILA et al. 2001).

Verbunden mit der hauptsächlich praktizierten Stecklingsvermehrung ist der Aufbau einer absolut virusfreien Mutterpflanzenkultur. Gewährleistet werden kann dies über eine Meristemkultur in vitro. Viruserkrankungen, die man hierdurch eliminieren möchte, sind z.B.: Pelargonienringmuster-Virus, Arabismosaik-Virus oder Pelargonienblattkräusel-Virus. Der Aufbau einer solchen virusfreien Mutterpflanzenkultur benötigt ca. drei Jahre und kann ein Jahr zur Stecklingsentnahme genutzt werden. (HORN 1996).

Diese Mutterpflanzenkultur stellt dann die Basis zur Produktion von Stecklingen dar. Aufgrund des hohen Lichtbedarfs einer solchen Kultur, befinden sich diese Jungpflanzenbetriebe meist in südlichen Ländern, wie z. B. auf der kanarischen Insel Teneriffa. In diesen Betrieben werden dann vor allem von November bis März die Stecklinge entnommen und anschließend an die sogenannten Produktionsbetriebe z.B. in Deutschland verschickt, die dann die Blühware produzieren.

Es besteht bei einigen Sorten auch die Möglichkeit der Vermehrung über Samen. Skarifiziertes Saatgut ist im Handel erhältlich, jedoch relativ teuer. In Deutschland hat diese Art der Vermehrung kaum Bedeutung, wohl auch, weil die Hauptzüchter die Hauptstecklingserzeuger sind.

Die Kosten für einen bewurzelten Steckling liegen bei ungefähr 20 Cent, ein „natürlicher“ Samen kostet ca. 6 Cent. REDENBAUGH et al. (1991) haben künstliche Samen von Luzerne hergestellt und dabei Kosten von 0,026 US Cent pro künstlichen Samen errechnet.

Eine kostengünstigere Alternative würde folglich die Produktion solcher "artificial seeds" (künstliche Samen oder Embryoide) darstellen. Bei diesem Verfahren werden somatische Embryonen, die in Flüssigkultur eines Bioreaktors oder in einem „temporary immersion system“ (z.B. RITA) entstanden sind, in verschiedene Hüllschichten gebracht, die der Struktur und Funktion von natürlichen Samen ähneln. So kann z.B. eine Alginat-Schicht die Nähr- und Reservestoffe zur Keimung bieten, ähnlich dem Endosperm und eine Samenhülle zum mechanischen Schutz kann durch eine Kunststoffschicht ersetzt werden (HEß 1992). Ein Verfahren, wie es z.B. für *Medicago sativa* und *Daucus carota* schon existiert. Solche künstlichen Samen keimen normal, wie natürliche Samen auch, können jedoch nicht so lange gelagert werden.

Für *Pelargonium* haben GILL et al. 1994 solche künstlichen Samen entwickelt. Diese mit Hydrogel eingekapselten Samen keimten normal und entwickelten sich zu vollständigen Pflanzen heran.

1.1.4.2. Modell zur Untersuchung der Embryonalentwicklung

Auch wenn keine Gametenverschmelzung, wie bei der zygotischen Embryogenese, vorausgeht, so sind doch viele Entwicklungsschritte bei der somatischen Embryogenese parallel zu denen der zygotischen Embryogenese.

Die Bildung somatischer Embryonen ist eine Entwicklung, die extern z.B. mit Phytohormonen gesteuert werden kann. Sie liefert die Möglichkeit, einzelne Entwicklungsschritte der Embryogenese an diesem Modell besser studieren zu können. Hier sind vor allem der Einfluss und das Zusammenspiel verschiedener Phytohormongruppen von Interesse, aber auch die Signal-Wirkung anderer Moleküle. Die Entwicklungsschritte, die bei zygotischen Embryonen im Schutz der Samenhülle stattfinden, können hier wesentlich einfacher untersucht werden.

1.1.4.3. Biotechnologische Züchtung

Ein weiteres großes Anwendungsgebiet liegt in der biotechnologischen Züchtung, wie z.B. die Verwendung somatischer Embryonen zur Transformation. Als Beispiel sei hier zum einen die Methode des direkten Gentransfers mithilfe des „particle bombardement“ genannt. Bei diesem Verfahren wird Pflanzengewebe mithilfe einer so genannten Genkanone durch hohen Druck mit Mikroprojektilen (Gold- oder Wolframpartikel), die mit DNA ummantelt sind beschossen. Nach erfolgreicher Integration der DNA-Stücke in das zelleigene Genom wird versucht, daraus eine

intakte Pflanze zu regenerieren. Hierbei kann entweder ein somatischer Embryo direkt als Zielobjekt zum Beschuss dienen oder aber erst im Anschluss daran eine somatische Embryogenese eingeleitet werden.

Eine weitere Art der Transformation durch indirekten Gentransfer wird mit *Agrobacterium* durchgeführt. Diese Bakterien können genetische Informationen, die auf ihrem Plasmid lokalisiert sind, in das Genom von Pflanzenzellen einbringen. Dieses System macht man sich zur gezielten Einbringung von erwünschten Genen zunutze (ODENBACH 1997).

Bei der biotechnologischen Züchtung bietet sich ein breites Einsatzgebiet für somatische Embryonen als Alternative zur klassischen Züchtung.

Zunächst einmal kann hierbei auf die Tatsache zurück gegriffen werden, dass es bei einer somatischen Embryogenese, vor allem bei einem sekundären Entwicklungsverlauf mit vorheriger Kallusphase, zu somaklonaler Variation kommen kann. Mutationen also, wie sie bei der Züchtung neuer Sorten erwünscht sein können um z.B. neue Blütenfarben zu erhalten.

Die bei der Protoplastenfusion erwünschte anschließende Regeneration ist bei Zellen, die aus bereits regeneriertem Material, z.B. aus einer somatischen Embryogenese stammen, oft höher. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, nach erfolgreicher Fusion von Protoplasten und beginnender Kallusentwicklung gezielt eine somatische Embryogenese zu induzieren um daraus Pflanzen zu regenerieren.

All diese Methoden können als neue Möglichkeiten gesehen werden, das Sortiment von *Pelargonium* vergrößern zu können.

Auch bei dem „embryo rescue“ Verfahren finden sich Anwendungen für somatische Embryonen. Hierbei werden Embryonen aus dem Samen isoliert und in vitro kultiviert. Man versucht damit, z.B. die Samenruhe zu brechen oder aus Artkreuzungen hervorgegangene Hybriden zu kultivieren. Bei solchen Artkreuzungen kommt es oft zu Blockaden in der Entwicklung, die oft durch das Endosperm hervorgerufen werden. Durch eine Isolierung vom Endosperm kann dadurch der Embryo oft „gerettet“ werden. Bei diesem embryo rescue kommt es häufig zur Bildung somatischer Embryonen am zygotisch entstandenen Embryo, der isoliert wurde und man erhält dadurch Klone.

Die Kryokonservierung lässt sich auch bei somatischen Embryonen anwenden. Hierbei wird Pflanzenmaterial mithilfe flüssigen Stickstoffs auf eine Temperatur bis zu -196°C eingefroren und anschließend gelagert. Bei somatischen Embryonen kann

es zu gewissen Schwierigkeiten kommen, durch den hohen Organisationsgrad. Dieser beruht z.T. auf den interzellulären Verbindungen, die durch dieses Verfahren gefährdet sind. Lässt sich dieses Problem beheben, durch geeignete Behandlung, bietet sich die Möglichkeit mit somatischen Embryonen über Kryokonservierung eine Genbank anzulegen.

1.2. Ziele der Arbeit

Ziel vorliegender Arbeit war es, bei PZH neben den gut untersuchten Hypokotylen auch Organe von Stecklingspflanzen zu finden, die sich zur Bildung somatischer Embryonen eignen. Zu diesem Zweck wurde ein breites Sortenspektrum untersucht und zusätzlich verschiedene Explantat-Arten.

Es wurde untersucht, welche Faktoren das Pflanzenmaterial selbst beeinflussen, wie z.B. die Position der Explantate an der Pflanze oder eine Vorbehandlung, wie z.B. eine Etiolierung. Auch Umwelteinflüsse der Ausgangspflanzen, wie jahreszeitlicher Verlauf oder Alter der Pflanzen wurden untersucht.

Ein zweiter Versuchsblock beschäftigte sich mit dem Einfluss des Nährmediums, und hier vor allem dem Phytohormon Thidiazuron zur Induktion somatischer Embryonen. Neben dem Nährmedium boten sich auch bei den *in vitro* Kultur-Bedingungen Einflussfaktoren, die untersucht wurden, wie z.B. ein Hitzeschock vor Kulturbeginn oder eine Co-Kultur mit embryogenen Hypokotyl-Kulturen.

Wie in Kapitel 1.1.4. dargelegt, bieten sich eine Reihe von Anwendungsbereichen für somatische Embryonen. Aus diesem Grund wurden zwei davon exemplarisch untersucht: die Transformation mit der Genkanone und eine Kultur in dem temporary immersion system RITA.

Durch Testen all dieser Einflussfaktoren wurde versucht, bei Stecklingspelargonien ein sicheres System zu entwickeln zur Induktion somatischer Embryonen *in vitro*.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Ausgangsmaterial zur Explantatentnahme waren vegetativ vermehrte Pelargonium-Zonale-Hybriden, die als bewurzelte Stecklinge vom Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TUM, bei den Firmen Elsner pac, Dresden und Fischer pelfi, Hillscheid zugekauft wurden. In den zum Lehrstuhl gehörenden Gewächshäusern wurden die Pflanzen unter praxisüblichen Bedingungen kultiviert. Einen Überblick über die verwendeten Sorten gibt Tabelle 1. Bedingt durch unterschiedlich gute Eignung der Sorten zur Induktion von somatischen Embryonen und um ein möglichst breites Sortenspektrum testen zu können, ist die Anzahl der Sorten zwar relativ hoch, ihre Verwendung in den einzelnen Versuchen jedoch begrenzt.

Tabelle 1: Verwendete Pelargonium-Zonale-Hybriden

Sorte	Serie/Typ	Züchter	Versuch Nr.
'Avenida'	Stark	Fischer pelfi	1.1./3.1./4.
'Alba'	Kompakt	Fischer pelfi	1.1./1.3.2./1.6./2.2./ 2.3./3.2./3.3.
'Charleston 2002'	Kompakt	Fischer pelfi	1.1./1.5.
'Samba'	Kompakt	Fischer pelfi	1.1./1.3.1./1.8./3.3./4.
'Kardino'	Kompakt	Fischer pelfi	1.1.
'Kardino 2002'	Kompakt	Fischer pelfi	1.1.
'Schöne Helena'	Mittel	Fischer pelfi	1.1./1.3.2./1.6./2.3.
'Dolce Vita'	Mittel	Fischer pelfi	1.1.
'Bravo'	Dunkellaubig	Fischer pelfi	1.1.
'Tango Pink'	Dunkellaubig	Fischer pelfi	1.1./1.3.1./2.1./2.2./3.3.
'Tango Dark Red'	Dunkellaubig	Fischer pelfi	1.1./1.3.1./1.3.2./1.4./ 1.6./1.7./2.3./3.2.
'Brasil 99'	Dunkellaubig	Fischer pelfi	1.1./2.1./3.3./5.3.
'Opera'	Dunkellaubig	Fischer pelfi	1.1.
'Rio'	Dunkellaubig	Fischer pelfi	1.1./1.3.1
'Montevideo'	Dunkellaubig	Fischer pelfi	1.1.

Sorte	Serie/Typ	Züchter	Versuch Nr.
'Boogy'	Dunkellaubig	Fischer pelfi	1.1.
'Perlenkette Scarlet'	Quality	Elsner pac	1.1./1.2./1.4./1.5./1.7./1.8. 2.1./2.2./3.1./4./5.2./5.3.
'Perlenkette Orange'	Quality	Elsner pac	1.1./1.5.
'Perlenkette Sabine'	Quality	Elsner pac	1.1.
'Signal'	Quality	Elsner pac	1.1.
'Robe'	Quality	Elsner pac	1.6./3.3.
'Meloda'	Tempo	Elsner pac	1.1.
'Melody'	Tempo	Elsner pac	1.1.
'Samelia'	dark line	Elsner pac	1.1.
'Saxonia Crimson'	saxonia	Elsner pac	1.1.
'Saxonia Orange'	saxonia	Elsner pac	1.1.
'Bruni'		Elsner pac	1.3.2./2.1./2.3./3.3.

Die Explantatentnahme erfolgte im Gewächshaus, wobei bei den Blättern darauf geachtet wurden, dass sie jung, das heißt vom ersten bis maximal dritten Nodium stammten. Blütenstandstiele wurden entnommen, wenn ihre Blüten noch geschlossen und noch nicht Farbe zeigend waren. Die Knospen davon wurden in einigen Versuchen auch verwendet.

2.2. Nährmedien und Kulturgefäße

Die Zusammensetzung der Nährmedien entsprach zum größten Teil der nach MURASHIGE und SKOOG, 1962 (MS-Medium). Die genaue Zusammensetzung findet sich in Tabelle 2. Zur Herstellung wurden Stammlösungen von den Makronährstoffen (10fache Konzentration) und den Mikronährstoffen (100fache Konzentration) hergestellt. Weitere Stammlösungen wurden angesetzt von Eisen Chelat NaFe-EDTA (3670 mg/l), Inosit (10 mg/l) und von Glycin, Nicotinsäure und Pyridoxin (je 0,1 mg/l).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums (nach MURASHIGE und SKOOG, 1962)

Makronährstoffe	[mg/l]
Kaliumnitrat (KNO ₃)	1900
Ammoniumnitrat (NH ₄ NO ₃)	1650
Calciumchlorid (CaCl ₂ * 2H ₂ O)	440
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ * 7 H ₂ O)	370
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	170
Mikronährstoffe	
Mangansulfat (MnSO ₄ * H ₂ O)	16,9
Zinksulfat (ZnSO ₄ * 7 H ₂ O)	8,6
Borsäure (H ₃ BO ₃)	6,2
Kaliumjodid (KJ)	0,83
Natriummolybdat (Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O)	0,25
Kupfersulfat (CuSO ₄ * 5 H ₂ O)	0,025
Kobaltchlorid (CoCl ₂ * 6 H ₂ O)	0,025
Weitere Zusätze	
myo-Inosit	100
Thiamin	0,1
Pyridoxin	0,5
Nicotinsäure	0,5
Eisen (NaFe-EDTA)	36,7
Glycin	2
Ascorbinsäure	50.000

Citronensäure	50.000
Thidiazuron (bei Induktionsmedien)	2,2
Saccharose	30.000
Gelrite (bei Festmedien)	3.000

Es erfolgte eine Zugabe von 30 g/l Saccharose und 3 g/l Gelrite zur Verfestigung des Nährmediums. Um den phenolischen Ausscheidungen der Explantate entgegen zu wirken, wurden je 50 g/l Ascorbin- und Citronensäure zugegeben (nach MARSOLAIS et al. 1991). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren durch Zugabe von KOH (1 n) bzw. HCl (1 n) auf 5,6 eingestellt. Auch die verwendeten Phytohormone wurden vor dem Autoklavieren zugegeben, wobei TDZ mit Dimethylsulfoxid (DMSO), in späteren Versuchen aufgrund der besseren Lösbarkeit mit KOH gelöst wurde. Eine Konzentration von 10 μ M TDZ entspricht dabei 2,2 g/l. Autoklaviert wurde über 15 Minuten mit 1,4 bar bei 121 °C.

Zur Kultivierung der Explantate wurden sterile 90 mm Petrischalen aus Kunststoff verwendet, die mit Parafilm verschlossen wurde. Sie wurden zuvor mit je 25 ml Nährmedium gefüllt, welches in 1 l Duran Schott Flaschen autoklaviert und noch flüssig in der reinen Werkbank ausgegossen wurde.

Zur weiteren Kultur der somatischen Embryonen nach der Abtrennung vom Ausgangsgewebe wurden diese in Reagenzgläser einzeln überführt, die mit Flachbodengläsern verschlossen wurden.

Die Versuche in Flüssigkultur erfolgten in sogenannten RITA-Gefäßen der Firma Cirad, Frankreich. Diese becherförmigen, ca. 15 cm hohen 1 l-Gefäße arbeiten mit einer zeitlich begrenzten und über eine angeschlossene Pumpe ausgelösten Überflutung des Pflanzenmaterials mit flüssigem Nährmedium. Die Gefäße bestehen aus zwei Bereichen: Im unteren befindet sich das flüssige Nährmedium, im oberen, auf einem Einsatz mit einer dünnen Schaumstoff-Schicht, das Pflanzenmaterial. Die Nährmedienzusammensetzung zur Induktion und Expression war die gleiche wie oben beschrieben, jedoch ohne den Zusatz von Gelrite, da keine Nährbodenverfestigung nötig war. In die RITA-Gefäße wurden jeweils 200 ml Flüssigmedium gegeben und anschließend konnten die verschlossenen Gefäße autoklaviert werden, bevor sie an der sterilen Werkbank mit Pflanzenmaterial gefüllt wurden. Die Explantate befanden sich auf einem Einsatz, der alle 6 Stunden für 90

Sekunden mit Medium überspült wurden. Verantwortlich für das Anstauen war eine angeschlossene Pumpe.

Falls Induktion und Expression in RITA-Gefäßen erfolgte, wurde das Induktions-Medium in der reinen Werkbank ausgeschüttet und nach dreimaligen Waschen der Gefäße mit sterilem Wasser das Expressionsmedium eingefüllt. Das Pflanzenmaterial befand sich auf dem Einsatz, der währenddessen herausgenommen werden konnte.

2.3. Inkulturnahme des Pflanzenmaterials

Nach Entnahme des Pflanzenmaterials aus dem Gewächshaus wurde dieses zur Entfernung von kontaminierenden Mikroorganismen zunächst 3 min in 70 %igen Ethanol und anschließend für weitere 5 min in eine Natriumhypochlorit-Lösung (1 % aktives Chlor), der einige Tropfen Tween 20 zur besseren Benetzung zugefügt wurden, gegeben. Beide Vorgänge erfolgten unter Zugabe von einem Rührstäbchen in ein Becherglas auf einem Magnetrührer.

Anschließend wurde das Pflanzenmaterial dreimal in entionisiertem und sterilisiertem Wasser gewaschen.

Ab dem Waschvorgang des Pflanzenmaterials erfolgten die weiteren Arbeitsschritte unter axenischen Bedingungen an einer reinen Werkbank. Die Explantate wurden auf sterilen Plastik-Petrischalen präpariert, indem ca. 1 cm große Explantate mithilfe von Pinzette und Skalpell geschnitten wurden. Bei Petiolen und Blütenstandstielen wurden die Randstücke (ungefähr 1-2 cm lang) verworfen und das verbliebene Material in Explantate zerschnitten. Zum Teil erfolgte noch eine Halbierung der Explantate, die dann mit der Schnittfläche auf das Medium gelegt wurden. Bei den Knospen wurden diese vom Blütenstandboden getrennt und die unverletzten Explantate mit möglichst langem Knospenstiel verwendet.

Sämtliche Explantate wurden längs auf das Medium gelegt und nicht eingetaucht. Die Anzahl an Explantaten betrug meist 8, selten 10 pro Petrischale.

2.4. Kulturbedingungen

Die mit Parafilm verschlossenen Petrischalen wurden zunächst eine Woche ohne Licht kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Rubarth-Schränken (Lichtthermostat 1200, Rubarth Hannover) bei einer Temperatur von 25 °C. Nach einer Woche wurden die Explantate unter axenischen Bedingungen auf hormonfreies Nährmedium überführt und die Petrischalen erneut mit Parafilm verschlossen. Die weitere Kultur erfolgte

dann bei einer Beleuchtungsdauer von 16 Stunden am Tag in zuvor erwähnten Rubarth-Schränken. Als Lichtquelle dienten dabei Osram 32/36 W Röhren.

2.5. Übertragung ins Gewächshaus

Bei einigen Versuchen, bei denen eine gute Induktion von somatischen Embryonen erzielt werden konnte (meist bei der Sorte 'Perlenkette Scarlet'), wurden die Embryonen isoliert weiter kultiviert. Hierzu wurden die Explantate insgesamt ca. 4-6 Wochen auf dem Medium belassen, um möglichst weit entwickelte und damit für die Handhabung einfachere, da größere somatische Embryonen zu erhalten. Diese wurden mithilfe einer Skalpellspitze durch leichtes Anstoßen abgebrochen und konnten dann in ein Reagenzglas mit phytohormonfreiem MS-Medium und je 50 mg/l Ascorbin- und Zitronensäure überführt werden.

Nach weiteren 8 Wochen, nachdem die jungen Pflanzen einige Wurzeln entwickelt hatten, konnten sie extra vitrum überführt werden. Sie wurden zunächst aus dem Reagenzglas entnommen und in lauwarmem Leitungswasser von Nährmedien-Resten befreit. Die Kultivierung erfolgte dann in 77er Multitopfplatten, die gefüllt waren mit einer Mischung aus gesiebttem Floraton 1 und Quarzsand. Nach dem Einsetzen der Pflanzen in die Erde wurde mit 0,1 % Ronilan (BASF) als Fungizid angegossen. Die Platten wurden die erste Woche mit einer Glasscheibe abgedeckt, um eine höhere Luftfeuchte zu erhalten.

Nach vierwöchiger Kultur der Pflanzen in Multitopfplatten wurden diese in Floraton 1 umgetopft und wie herkömmliche Jungpflanzen bis zur Blüte weiterkultiviert.

2.6. Transformation mit der Genkanone

Die Explantate (Petiolen und Knospen) wurden zunächst wie oben beschrieben kultiviert, d.h. es erfolgte eine einwöchige Induktion mit 10 μ M TDZ. Beim Umsetzen auf hormonfreies Medium wurden nur noch 4 gut regenerierende Explantate sternförmig in die Mitte einer Petrischalen platziert, da der spätere Wirkungs-Radius der Genkanone nur ca. 3 cm groß war. Nach einer weiteren Woche Kultur auf hormonfreiem Medium erfolgte der Beschuss mit der Genkanone. Es wurde mit 650 oder 1350 psi gearbeitet.

Die Microcarrier wurden wie folgt vorbereitet:

Nach Zugabe von 60 mg Goldpartikel (Biorad, 1 μ m Durchmesser) zu 1 ml 70 %igem Ethanol und 3 min Vortexen wurde diese Mischung 15 min stehen gelassen.

Die Microcarrier wurden durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, anschließend wurde der Alkohol abgegossen.

Es folgten drei Waschdurchgänge mit destilliertem Wasser und jeweils kurzem Zentrifugieren zum Pelletieren.

Durch Zugabe von 1 ml sterilem 50%igem Glycerin wurde eine Endkonzentration der Microcarrier von 60 mg pro ml Glycerin erreicht.

Zur Ummantelung der DNA wurde wie folgt vorgegangen (bezogen auf jeweils sechs Schüsse):

50 µl der vorbereiteten Microcarrier-Lösung wurden unter Vortexen vermischt mit 5 µl DNA (GUS-Gen-Konstrukt mit Hygromycin-Selektionsmarker) (1 mg/ml), 50 µl CaCl₂ (2,5 M) und 20 µl Spermidin (0,1M). Nach Vortexen und Zentrifugieren wurde das Pellet mit 140 µl 70%igem Ethanol und anschließend mit 140 µl 100%igem Ethanol ohne Resuspendierung gewaschen. Die Microcarrier wurden dann in 48 µl 100%igem Ethanol resuspendiert. Je 8 µl dieser Suspension wurden auf das Zentrum der Macrocarrier zum Beschuss überführt. Der Beschuss des Pflanzenmaterials mit der Genkanone erfolgte dann mit zwei unterschiedlich starken Macrocarrier-Scheiben für entsprechend verschiedene Drücke (650 und 1350 psi).

Nach 2 Tagen wurde mit einigen Explantaten eine GUS-Färbung durchgeführt um die Expression des übertragenen GUS-Gens zu überprüfen und die Aktivität der dadurch produzierten Glucuronidase nachzuweisen.

Hierzu wurden 10 ml folgender Lösung hergestellt:

- 5,2 mg x-GlcA gelöst in 100 µl DMSO
- 7 µl β-Mercaptoethanol
- 100 µl Triton X-100
- 9,8 ml 50 mM Kpi, pH 7,0

In diese Lösung wurden einige Explantate überführt und kurz einem Vakuum ausgesetzt zur Verteilung der Lösung in die Zellzwischenräume. Nach 24 Stunden in einem Klimaschrank bei 37 °C wurden die Explantate zur Zerstörung des Chlorophylls in 70 % Ethanol überführt. Die blaue Färbung wurde dadurch wesentlich deutlicher.

Nach insgesamt 4 Wochen wurden die übrigen Explantate auf Hygromycin-haltiges Medium überführt. Zur Herstellung wurden dem leicht abgekühlten Medium nach dem Autoklavieren und vor dem Ausgießen in die Petrischalen 25 mg Hygromycin gelöst in 1 ml sterilem Wasser durch Sterilfiltration zugegeben.

Nach weiteren zwei Wochen wurde dann überprüft, wie viele der Explantate auf diesem Medium regenerierten und somit eine erfolgreiche Transformation zeigten.

2.7. Auswertung der Versuche

Die Auswertung der Versuche erfolgte unter dem Binokular. Die Anzahl somatischer Embryonen pro Explantat und deren Entwicklungs-Stadien (Siehe Kapitel 1.1.2.) wurden gezählt, wobei folgendes beachtet wurde:

Abnorme Embryonen, d.h. solche mit abnormer Blattform oder Größe wurden nicht mitgezählt. Auch nicht gewertet wurden Embryonen, die vitrifiziert waren und durch ihr glasiges Erscheinungsbild gekennzeichnet waren. Abbildung 7 zeigt zum Vergleich eine normal entwickelte junge Pflanze aus einem somatischen Embryo (links) neben einer vitrifizierten (rechts), die sich durch sein glasiges und wässriges Erscheinungsbild auszeichnet. Weitere abnorm entwickelte Embryonen waren vollkommen weiß, die keinerlei Chlorophyll ausbildeten. Sie wurden nicht mitgezählt, da sie sich auch nur bis zum Kotyledonen-Stadium entwickelten und anschließend abstarben.

Eine weitere beobachtete Abnormität waren somatische Embryonen im Kotyledonen-Stadium, deren Keimblätter sich verdreht ausbildeten. Dies kam jedoch sehr selten vor und wurde in die Auswertung mit einbezogen, da sich die Embryonen im weiteren Verlauf normal entwickelten. Einen solch verdrehten Embryo zeigt Abbildung 8.

Außerdem wurde in die Auswertung die Anzahl abgestorbener Explantate aufgenommen, d.h. solche, die sich nach kurzer Zeit braun verfärbten und keinerlei Wachstum mehr zeigten.



Abbildung 7: normal entwickelte und vitrifizierte junge Pflanzen aus somatischen Embryonen



Abbildung 8: somatischer Embryo im Kotyledonen-Stadium mit verdrehten Keimblättern

2.8. Statistik

Bei der statistischen Auswertung der Versuche stellte sich das Problem, dass die Daten nicht normalverteilt waren. Somit war die Grundvoraussetzung für eine Varianzanalyse nicht gegeben. Auch durch Transformation der Werte konnte dies nicht geändert werden.

Somit fiel die Entscheidung für das parameterfreie Testverfahren nach Kruskal-Wallis (SACHS 1984), das auch ohne Normalverteilung durchführbar ist. In den meisten Versuchen wurden die Signifikanzen der einzelnen Versuchsvarianten über alle Prüfglieder betrachtet getestet (für den gesamten Versuch). Der Einfluss der Sorte war jedoch in den meisten Versuchen hoch signifikant und überdeckte dadurch den Einfluss anderer Prüfglieder. Aus diesem Grund wurde bei der statistischen Auswertung der Versuche zusätzlich die Wirkung der Prüffaktoren für jede Sorte einzeln betrachtet.

Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm SAS (Version 8.02, SAS-Institute, USA, 1999-2001).

Die Signifikanzgrenzen, die in den statistischen Tabellen für den Einfluss der Prüfglieder (Variablen) angegeben sind, sind folgendermaßen abgekürzt:

- n.s. Einfluss ist nicht signifikant
- * Einfluss zu 95%
- ** Einfluss zu 99%
- *** Einfluss zu 99,9%

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss des Pflanzenmaterials auf die Bildung somatischer Embryonen

Folgender Versuchsblock behandelt den Einfluss der Explantate, die entnommen wurden, auf die Bildung somatischer Embryonen. Zum einen den Einfluss des Genotyps, d.h. welche Sorten eignen sich zur Induktion von somatischen Embryonen und zum anderen die Auswahl der geeigneten Pflanzenorgane, denen die Explantate entnommen wurden. Zusätzlich wurde untersucht, ob es bei den verschiedenen Pflanzenorganen Unterschiede gibt zwischen verschiedenen Positionen an den Pflanzenorganen.

Inwieweit die Bildung von somatischen Embryonen an Explantaten auf die Wachstumsbedingungen der Ausgangspflanzen, von denen die Explantate entnommen wurden, zurückzuführen ist, wurde im weiteren untersucht. Hierzu zählt der jahreszeitliche Verlauf, dem die Pflanzen im Gewächshaus ausgesetzt sind, wodurch sich Temperaturen, Lichtintensität und –dauer ergeben und die Frage, ob sich diese Bedingungen in der Klimakammer simulieren lassen und zu einem besseren Ergebnis führen können.

Auch das Alter der Ausgangspflanze selber wurde als Einflussfaktor untersucht.

Ein weiterer Versuchsansatz beschäftigte sich mit der Frage, ob eine Etiolierung der Ausgangspflanzen zu einer stärkeren Induktion der Embryonen führen könnte, ähnlich wie dies bei Hypokotyl-Explantaten beobachtet wurde.

Letztlich wurde hinsichtlich des Ausgangsmaterials untersucht, ob in vitro Pflanzen, die aus erfolgreich induzierten somatischen Embryonen entstanden sind, eine positive genetische Konstellation besitzen und ihrerseits in der Lage sind, eine höhere Anzahl somatischer Embryonen hervorzubringen.

3.1.1. Genotyp (Sortenübersicht)

Bei den durchgeführten Versuchen zur somatischen Embryogenese zeigte sich sehr bald, dass der Genotyp einen sehr großen Einfluss auf die Bildung solcher Embryonen hat. In einem groß angelegtem Versuch wurden aus diesem Grund 25 verschiedene Sorten im Vergleich getestet. Es wurde dabei darauf geachtet, dass aus den Sortimenten der Firma Fischer pelfi und Elsner pac ein möglichst breites Spektrum der Sortengruppen abgedeckt wurde. Je Sorte wurden drei Arten von Explantaten entnommen: Petiolen, Blütenstandstiele und Blütenknospen. Je Variante wurden 5 Petrischalen mit je 8 Segmenten angesetzt. Es ergab sich somit eine Gesamtzahl von 40 Segmenten pro Variante.

Einen Überblick über das Ergebnis der Auswertung nach 28 Tagen gibt das Diagramm 1.

Diagramm 1: Einfluss verschiedener Genotypen (Sorten) und Explantat-Arten

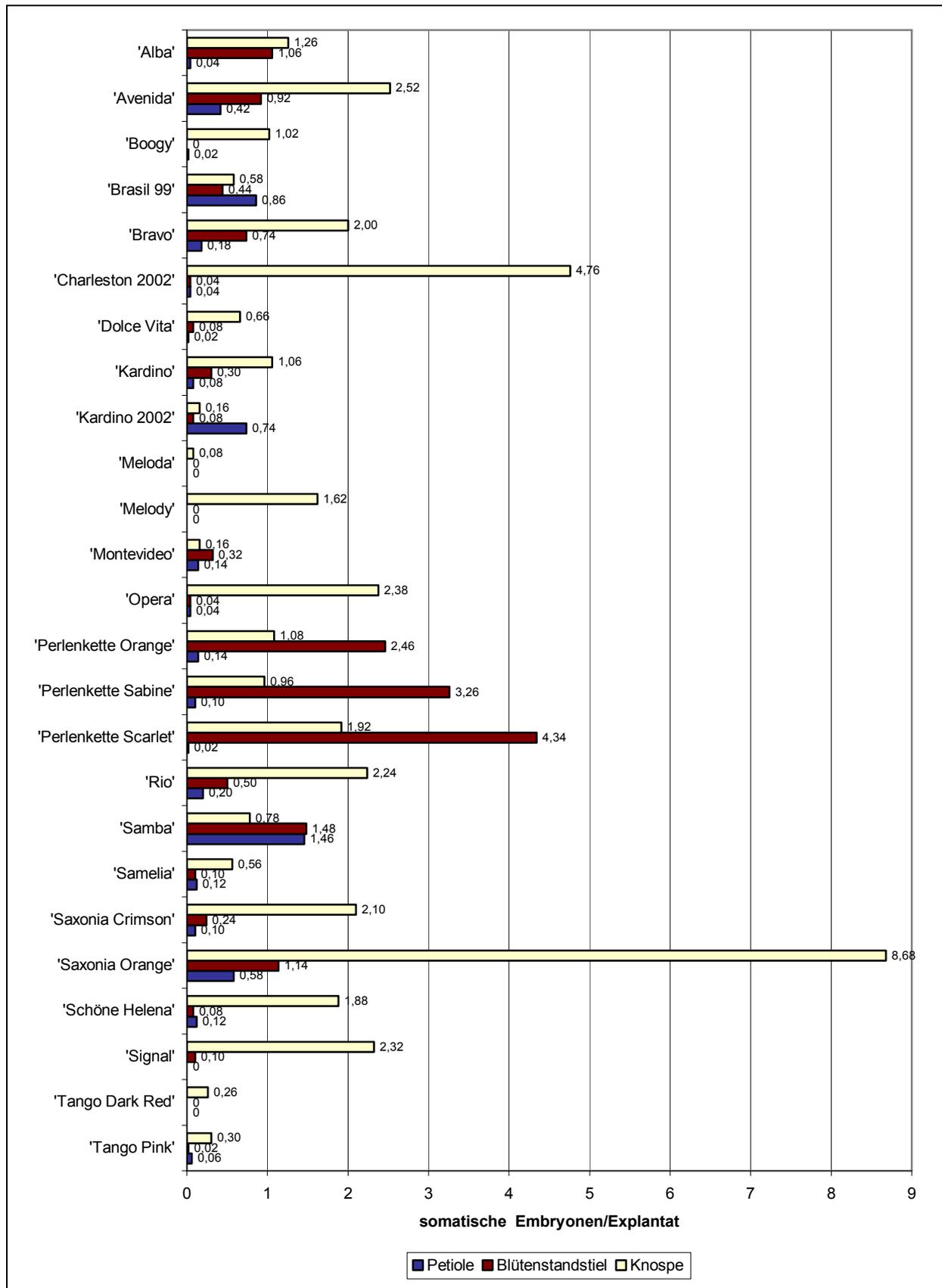


Tabelle 3: Einfluss verschiedener Genotypen und Explantat-Arten, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	394,30 ***	24
Einfluss der Explantatart bei folgenden Sorten:		
'Alba'	21,17 ***	2
'Avenida'	8,74 *	2
'Boogy'	32,06 ***	2
'Brasil 99'	6,02 *	2
'Bravo'	13,39 **	2
'Charleston'	94,12 ***	2
'Dolce Vita'	9,15 **	2
'Kardino'	5,04 n.s.	2
'Kardino 2002'	33,06 ***	2
'Meloda'	2,00 n.s.	2
'Melody'	53,49 ***	2
'Montevideo'	4,86 n.s.	2
'Opera'	28,93 ***	2
'Perlenkette Orange'	17,86 ***	2
'Perlenkette Sabine'	56,25 ***	2
'Perlenkette Scarlet'	43,92 ***	2
'Rio'	24,56 ***	2
'Samba'	13,84 ***	2
'Samelia'	2,97 n.s.	2
'Saxonia Crimson'	51,50 ***	2
'Saxonia Orange'	89,19 ***	2
'Schöne Helena'	15,34 ***	2
'Signal'	31,36 ***	2
'Tango Dark Red'	4,03 n.s.	2
'Tango Pink'	4,22 n.s.	2

Es zeigte sich bei der Auswertung, dass die verschiedenen Explantat-Arten (Petiole, Blütenstandstiel, Knospe) unterschiedliche Überlebensraten hatten, so dass diese in Tabelle 4 hinzugezogen werden. Die Werte beziehen sich auf den gesamten Versuch.

Tabelle 4: Überlebensraten der Explantate in %

Petiolen gesamt	90,00
Blütenstandstiele gesamt	99,52
Knospen gesamt	87,68

Der Chi²-Test (Tabelle 3) zeigt starke signifikante Unterschiede (auf einem 0,1%-Niveau) bezüglich der Sorten allgemein, d.h. mit allen Explantat-Arten. Innerhalb der einzelnen Sorten muss jedoch stark differenziert werden. Die einzelnen Sorten reagierten unterschiedlich stark je nach Art der Explantate (vgl. Diagramm 1). So erreichte z.B. die Sorte 'Saxonia Orange' den Höchstwert von 8,68 somatischen Embryonen/Explantat mit ihren Knospen-Explantaten, 'Perlenkette Scarlet' zeigte sich als eine Sorte, die besonders hohe Werte (4,34 somatische Embryonen/Explantat) mit Blütenstandstielen erreichte. Als Beispiel für eine Sorte, deren höchste Anzahl an somatischen Embryonen an Petiolen gebildet wurde, sei 'Brasil 99' mit 0,86 somatische Embryonen/Explantat genannt.

Insgesamt betrachtet zeigten sich bei den Knospen-Explantaten die höchsten Werte. Hinzugezogen werden muss aber deren teilweise sehr schlechte Überlebensrate (durchschnittlich 87,68%, siehe Tabelle 3). Die Überlebensrate spiegelt den Anteil an überlebten Explantaten zum Zeitpunkt der Auswertung (28 Tage nach Versuchsansatz) wieder. Blütenstandstiele zeigten sich bei einigen Sorten auch als sehr gut geeignet und zeichneten sich durch ihre wesentlich bessere Überlebensrate aus. Die Petiolen-Explantate erzielten insgesamt die wenigste Anzahl somatischer Embryonen.

In Tabelle 5 wurden die besten 6 bzw. 8 Ergebnisse innerhalb der Explantat-Arten zusammengefasst und zusätzlich die jeweilige Überlebensrate angegeben. Dies verdeutlicht nochmals die unterschiedlich starke Reaktion der Sorten mit verschiedenen Explantat-Arten. Nur 'Saxonia Orange' befindet sich bei allen Explantat-Arten in den Höchstwerten. Alle anderen Sorten haben eindeutige

Tendenzen zu speziellen Explantat-Arten bei denen sie ihre höchste Anzahl somatischer Embryonen bilden.

Tabelle 5: Höchstwerte innerhalb der Explantat-Arten

Petiolen		
Somat. Embryonen/Explantat	Sorte	Überlebensrate in %
1,46	'Samba'	98
0,86	'Brasil 99'	100
0,74	'Kardino 2002'	88
0,58	'Saxonia Orange'	100
0,42	'Avenida'	94
0,20	'Rio'	94
Blütenstandstiele		
Somat. Embryonen/Explantat	Sorte	Überlebensrate in %
4,34	'Perlenkette Scarlet'	92
3,26	'Perlenkette Sabine'	100
2,46	'Perlenkette Orange'	100
1,48	'Samba'	100
1,14	'Saxonia Orange'	100
1,06	'Alba'	100
Knospen		
Somat. Embryonen/Explantat	Sorte	Überlebensrate in %
8,68	'Saxonia Orange'	100
4,76	'Charleston 2002'	98
2,52	'Avenida'	72
2,38	'Opera'	78
2,32	'Signal'	100
2,24	'Rio'	94
2,10	'Saxonia Crimson'	98
2,00	'Bravo'	96

Die beiden Abbildungen 9 und 10 zeigen zum Vergleich zwei Explantate, die unterschiedlich reagierten. Abbildung 9 zeigt ein Petiolen-Explantat von 'Rio', bei dem sich nur weiße Kalluskugeln gebildet haben. Bei Abbildung 10 hingegen sieht man die zahlreichen somatischen Embryonen an einem Blütenstandstiel-Explantat der Sorte 'Perlenkette Scarlet'.



Abbildung 9: Petiolen-Explantat von 'Rio' mit Kalluskugeln



Abbildung 10: Blütenstandstiel-Explantat von 'Perlenkette Scarlet' mit somatischen Embryonen

3.1.2. Explantat-Art

In diesem Versuch wurde untersucht, welche verschiedenen Explantat-Arten sich zur Induktion von somatischen Embryonen eignen. Es wurde mit der Sorte 'Perlenkette Scarlet' gearbeitet. Sie reagierte bei anderen Versuchen immer sicher mit der Bildung vieler somatischen Embryonen auf die Induktion. Von den entsprechenden Gewächshauspflanzen wurden folgende Explantate entnommen:

- Petiolen: Von Blattstielen der obersten drei Nodien wurde von der jeweils blattnächsten Position ein 1 cm langes Explantat entnommen und längs auf das Nährmedium gelegt.
- Blütenstandstiele: Von Stielen noch nicht Farbe zeigender Blütenstände wurde von der jeweils blütenstandnächsten Position ein 1 cm langes Explantat entnommen und längs auf das Nährmedium gelegt.
- Blütenstände: junge Blütenstände mit noch nicht Farbe zeigenden Knospen wurden mit der Stielseite nach unten ins Medium gesteckt.
- Blütenknospen: Von jungen Blütenständen wurden einzelne, noch grüne Knospen mit Stiel entnommen und längs auf das Nährmedium gelegt.

- Blütenstiele: Von den oben beschriebenen Blütenknospen wurden die ca. 0,5 cm langen Stiele entnommen und längs auf das Nährmedium gelegt.
- Blütenhüllblättchen: Die Blättchen, die die Blütenstände umgeben wurden entnommen und auf das Nährmedium gelegt.
- Internodien: Die Internodien zwischen den ersten drei bis vier Nodien wurden in 1 cm lange Explantate geschnitten und längs auf das Nährmedium gegeben.
- Meristemspitzen: Die Meristeme mit einigen Blattanlagen wurden herausgeschnitten und mit der Stielseite nach unten in das Nährmedium gesteckt.
- Blätter: Die jungen Blätter des ersten Nodiums wurden entnommen und auf das Nährmedium gelegt.

Der Versuchsumfang je Explantat-Art betrug 40 Explantate.

Diagramm 2: Einfluss verschiedener Explantat-Arten bei 'Perlenkette Scarlet'

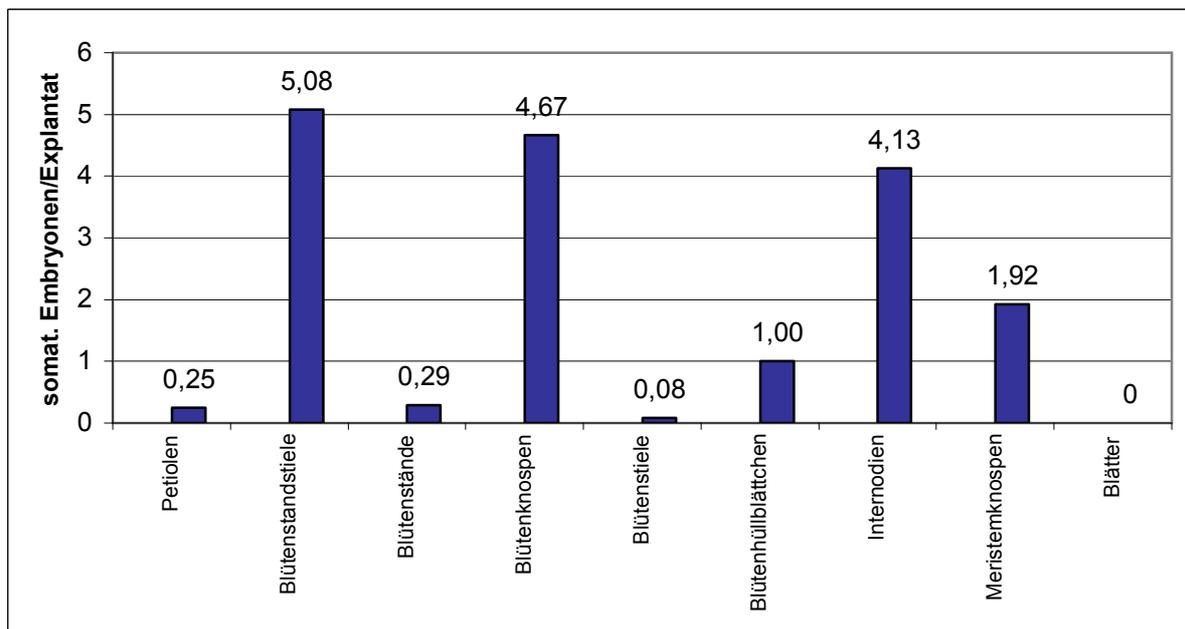


Tabelle 6: Einfluss der Explantatart, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Explantatart	88,35 ***	8

Die statistische Auswertung (Tabelle 6) zeigt einen starken Unterschied zwischen den einzelnen Explantatarten. Unterschiede zeigten sich auch hinsichtlich der Überlebensrate der einzelnen Explantatarten (Siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Überlebensrate der Explantate in %

Petiolen	79,17
Blütenstandstiele	100,00
Blütenstände	79,17
Blütenknospen	58,33
Blütenstiele	8,33
Blütenhüllblättchen	20,83
Internodien	100,00
Meristemknospen	57,14
Blätter	100,00

Bei den jungen Blättern regenerierten zwar alle Explantate, es kam jedoch zu einer sehr starken Kallusbildung. Somatischen Embryonen hingegen wurden nicht beobachtet.

Die Blütenhüllblättchen brachten einige Embryonen (durchschnittlich 1 somatischer Embryo/Explantat) hervor, es kam jedoch aufgrund der großen Schnittfläche zu einer starken Kallusbildung, so dass nicht eindeutig war, ob die Embryonen auf direktem oder auf indirektem Weg über Kallus, entstanden sind. Zudem war die Überlebensrate sehr schlecht (20,83 %).

Die Problematik der starken Kallusbildung ergab sich besonders stark bei den Meristemspitzen. Es ließen sich zwar einige somatische Embryonen induzieren (1,92 somatische Embryonen/Explantat), die Überlebensrate lag jedoch nur bei 57,14 %.

Die Blütenstände bildeten bei einer relativ guten Überlebensrate (79,17 %) eine nur geringe Anzahl an somatischen Embryonen (0,29 somatische Embryonen/Explantat).

Petiolen erwiesen sich im Vergleich zu anderen Explantatarten als schlecht induzierbar. Im Durchschnitt bildete sich in diesem Versuch nur auf jedem vierten Explantat ein somatischer Embryo. Die Überlebensrate war dabei jedoch relativ gut (79,17 %). Abbildung 11 zeigt ein solches Petiolen-Explantat.

Blütenstandstiele, Blütenknospen und Internodien zeigten die größte Anzahl an somatischen Embryonen pro Explantat. Bei den Internodien ergab sich das Problem, dass nicht ausreichend Material, bedingt durch den großen Anteil der Explantate an der Pflanze, vorhanden war. Bei den Blütenknospen bildeten sich die somatischen Embryonen fast ausschließlich an den Stielen. Wurden jedoch nur die Stiele als Explantate in Kultur genommen, verringerte sich die Überlebensrate von ohnehin nur 58,33 % auf 8,33 %. Abbildung 12 zeigt ein Knospen-Explantat, bei dem zu sehen ist, dass sich die somatischen Embryonen nur im Stielbereich (rechts im Bild) bilden. Die Knospe selbst (links im Bild) ist verbräunt und zeigte nur noch schwaches Wachstum, während der Stiel-Bereich stark angeschwollen und grün ist.

Blütenstandstiele erwiesen sich bei 'Perlenkette Scarlet' als geeignetste Explantat-Art zur Induktion von somatischen Embryonen. Sie zeigten die höchste Anzahl an gebildeten Embryonen (5,08) bei einer 100%igen Überlebensrate.



Abbildung 11: Petiolen-Explantat von 'Perlenkette Scarlet'

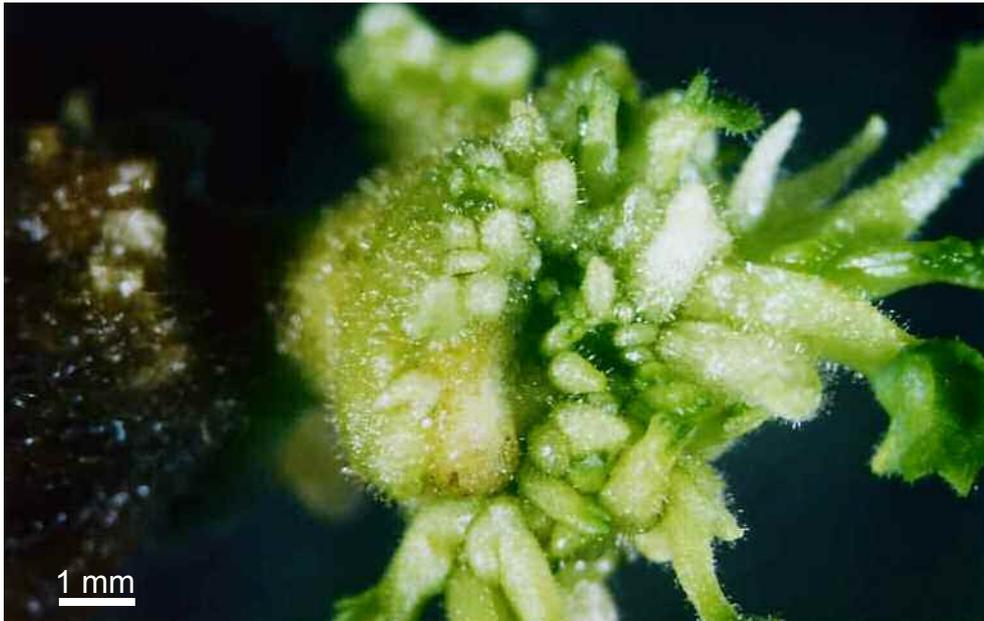


Abbildung 12: Knospen-Explantat von 'Perlenkette Scarlet'

3.1.3. Explantat-Position an der Pflanze

Nachdem sich der Einfluss der Explantatart als sehr stark erwies, wurden in weiteren Versuchsansätzen die Positionen der Explantate an der ganzen Pflanze bzw. am Pflanzenorgan selber und deren Einfluss auf die Bildung somatischer Embryonen genauer untersucht.

3.1.3.1. Explantat-Position am Blatt

In diesem Versuch wurde mit den vier PZH-Sorten 'Tango Dark Red', 'Tango Pink', 'Rio' und 'Samba' gearbeitet. Von jungen Blättern (drittes oder viertes Nodium) wurden drei verschiedene Explantat-Arten entnommen (jeweils 48 Explantate):

1. Petiole: Ein ca. 1 cm großes Stück aus der blattnächsten Region des Blattstiels.
2. Blattansatz: Ein ca. 1 cm langes quadratisches Stück mit dem Übergang der Petiole in die Blattadern.
3. Blattspreite: Ein ca. 1 cm langes quadratisches Stück aus dem Blattspreitenbereich mit 2-3 Blattadern.

Diagramm 3: Einfluss der Explantatposition am Blatt

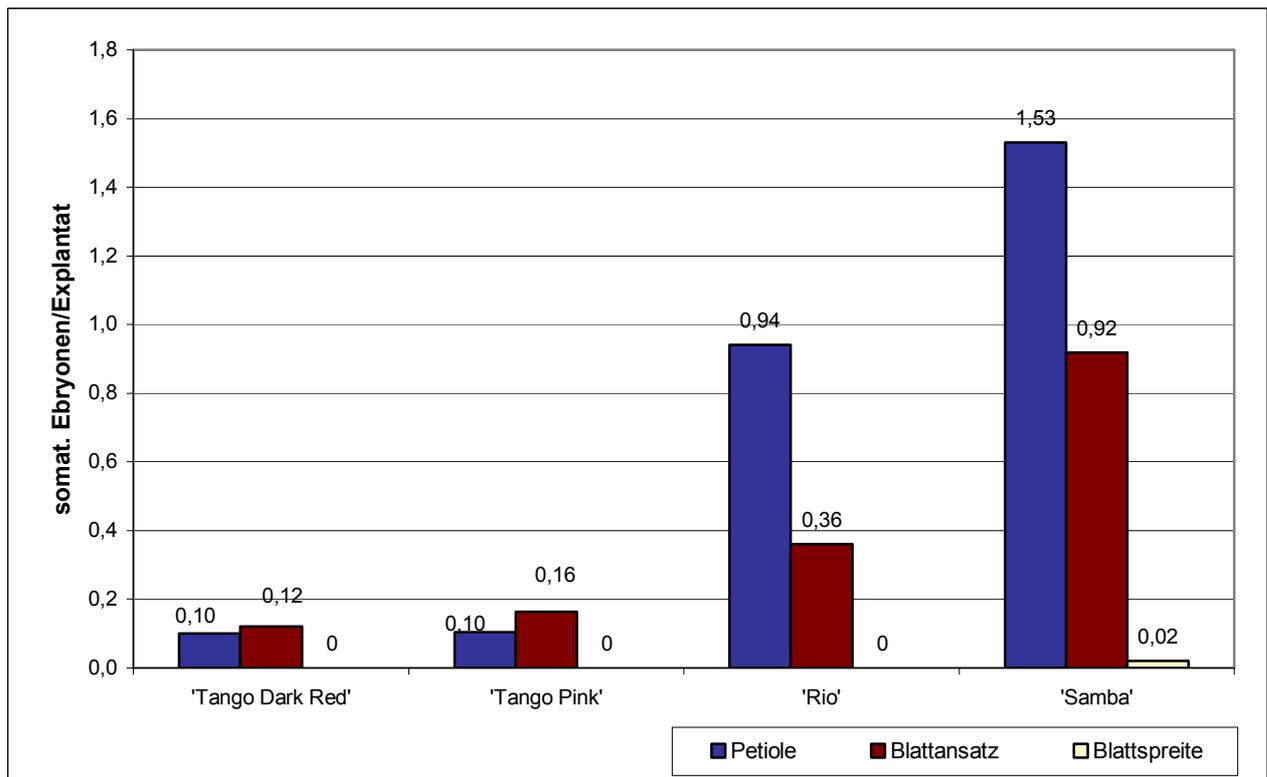


Tabelle 8: Einfluss der Explantat-Position am Blatt, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	47,44 ***	3
Einfluss der Explantatposition am Blatt	48,12 ***	2
Einfluss der Explantatposition am Blatt bei der Sorte:		
'Tango Dark Red'	4,20 n.s.	2
'Tango Pink'	5,98 n.s.	2
'Rio'	17,19 ***	2
'Samba'	27,23 ***	2

Die graphische Darstellung von Diagramm 3 veranschaulicht, dass die Blattspreiten-Explantate kaum somatische Embryonen hervorbrachten. Ausnahme hierbei bildete die Sorte 'Samba' mit einer geringen Menge (0,02 s.E./Expl.). Unter Hinzunahme der statistischen Auswertung (Tabelle 8) zeigt sich, dass die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Explantat-Arten innerhalb der beiden schwach reagierenden Sorten 'Tango Dark Red' und 'Tango Pink' nicht signifikant sind. Die beiden stärker reagierenden Sorten 'Rio' und 'Samba' zeigten jedoch stark signifikante

Unterschiede. Bei beiden Sorten wurde die größte Menge somatischer Embryonen pro Explantat bei den Petiolen-Explantaten gebildet. Je weiter die Explantate in das Blatt selber hinein gehen, umso weniger Embryonen wurden gebildet

3.1.3.2. Explantat-Position an Blatt- und Blütenstandstielen

Entlang der Stiele von Blättern und Blütenstandstielen wurde der Einfluss der Position untersucht. Es wurden drei verschiedene Positionen der Explantate gewählt, aus dem jeweils ein 1 cm langes Explantat geschnitten wurde:

1. oben: der Blatt- bzw. Blütenstand-nahe Bereich
2. Mitte: der mittlere Bereich
3. unten: der Spross- bzw. Nodien-nahe Bereich

Es wurden je Variante 80 Explantate entnommen von den Sorten 'Alba', 'Schöne Helena', 'Bruni' und 'Tango Dark Red'.

Diagramm 4: Einfluss der Explantatposition an Petiolen und Blütenstandstielen

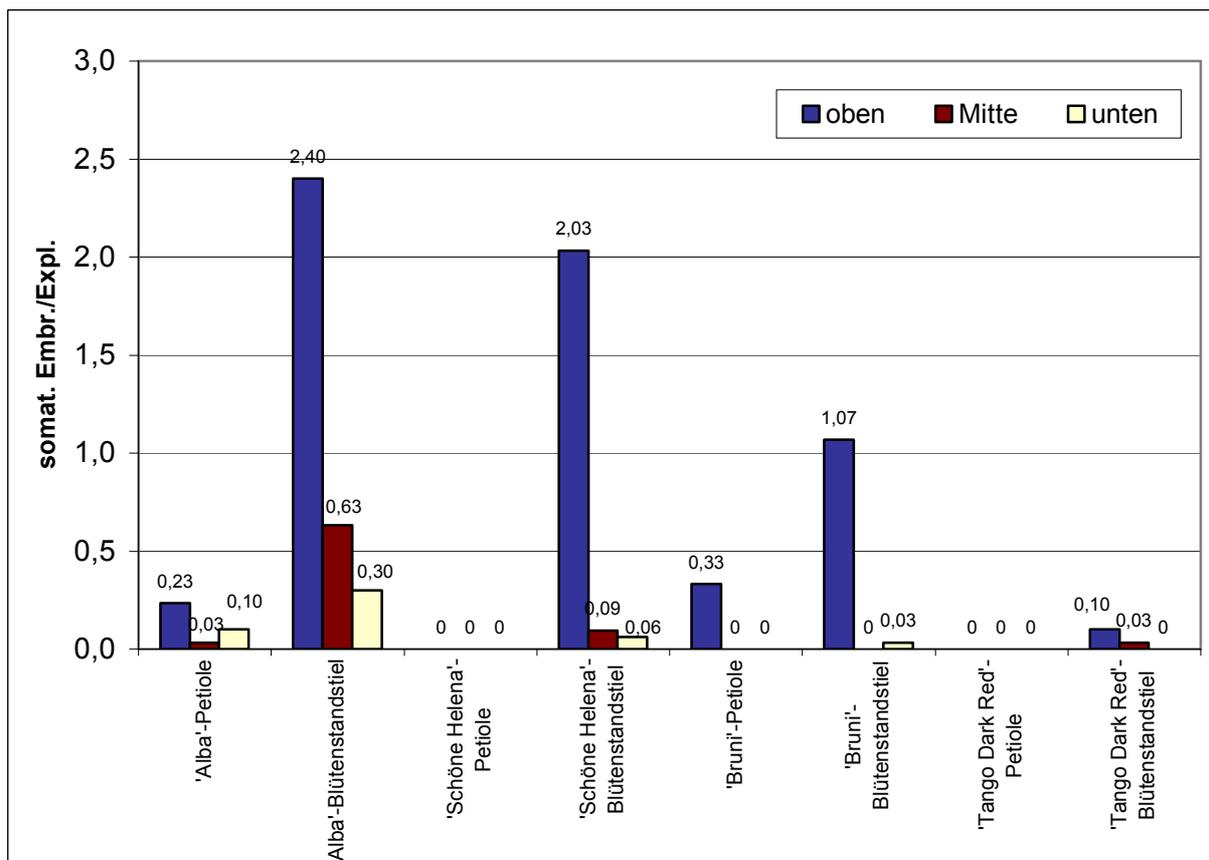


Tabelle 9: Einfluss der Explantat-Position bei Petiole und Blütenstandstiel,
Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	54,63 ***	3
Einfluss der Explantat-Art	48,63 ***	1
Einfluss der Explantatposition	65,99 ***	2
Einfluss der Explantatposition bei der Sorten-Explantatart-Kombination:		
'Alba' - Petiole	5,74 n.s.	2
'Alba' - Blütenstandstiel	22,26 ***	2
'Schöne Helena' - Petiole	0 n.s.	2
'Schöne Helena' - Blütenstandstiel	34,73 ***	2
'Bruni' - Petiole	6,14 *	2
'Bruni' - Blütenstandstiel	21,42 ***	2
'Tango Dark Red' - Petiole	0 n.s.	2
'Tango Dark Red' - Blütenstandstiel	1,01 n.s.	2

Die größte Anzahl somatischer Embryonen wurde bei den drei Sorten 'Alba', 'Schöne Helena' und 'Bruni' gebildet und da jeweils an den Blütenstandstielen (Vgl. Diagramm 4). Dies sind auch bei der statistischen Betrachtung (Tabelle 8) die drei Varianten, die sich als einzige durch einen stark signifikanten Einfluss von den übrigen Werten abzeichnen. Der obere, also Blütenstandstiel-nahe Bereich lieferte die höchste Anzahl somatischer Embryonen pro Explantat bei allen Varianten. Petiolen lieferten schwache (bei 'Alba' und 'Bruni') bis gar keine Ergebnisse ('Schöne Helena' und 'Tango Dark Red').

3.1.4. Jahreszeitlicher Verlauf

Um den Einfluss der Jahreszeiten, dem die Ausgangspflanzen im Gewächshaus ausgesetzt sind, zu testen, wurde eine Induktion an Explantaten zweier Sorten einmal monatlich innerhalb eines Jahres durchgeführt. Von den beiden Sorten 'Tango Dark Red' und 'Perlenkette Scarlet' wurden jeweils Petiolen, Blütenstandstiele und Knospen entnommen (pro Variante 80 Explantate).

Diagramm 5: Einfluss der Jahreszeit bei 'Tango Dark Red'

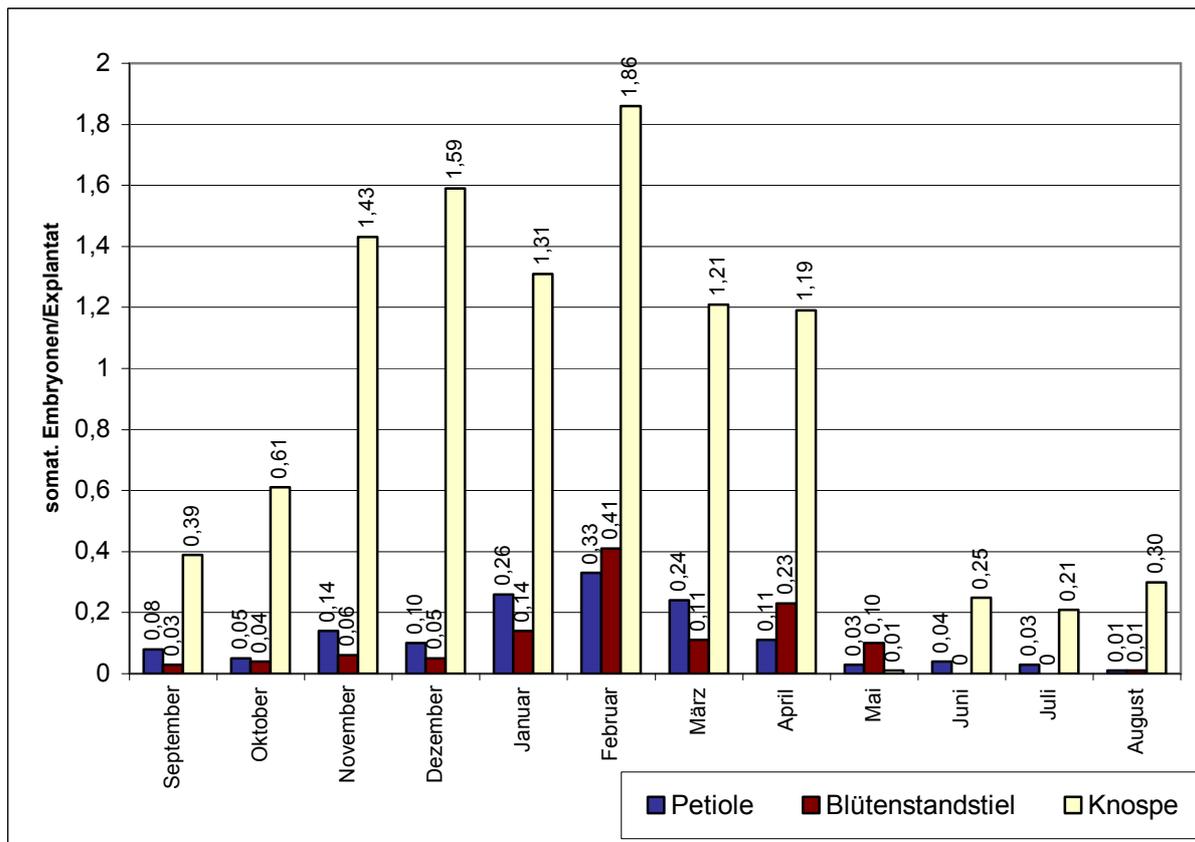


Diagramm 6: Einfluss der Jahreszeit bei 'Perlenkette Scarlet'

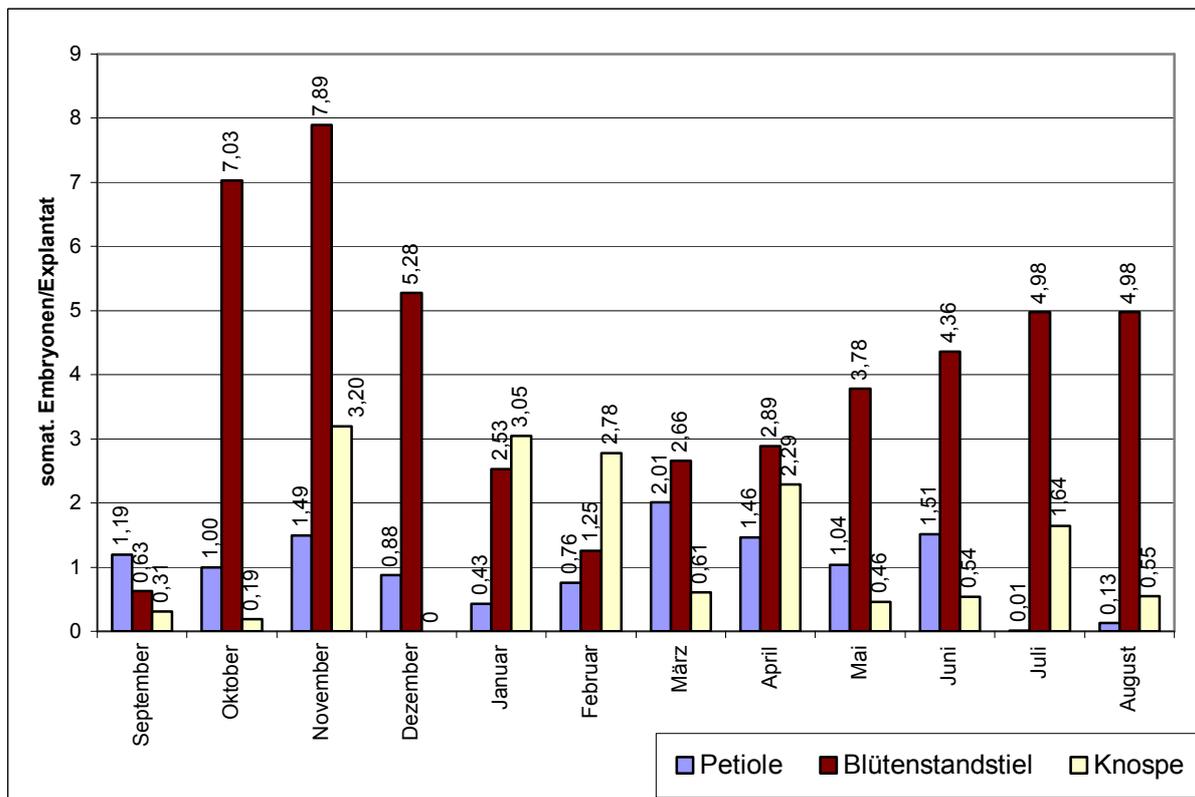


Diagramm 5 und 6 veranschaulichen die monatlichen Unterschiede innerhalb eines Jahres bei den beiden Sorten. Die statistische Betrachtung liefert Tabelle 10.

Tabelle 10: Einfluss der Jahreszeit, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	646,28 ***	1
Einfluss der Explantat-Art	210,59 ***	2
Einfluss des Monats	167,10 ***	11
Einfluss des Monats bei der Sorten-Explantat-Art-Kombination:		
'Tango Dark Red' - Petiole	43,97 ***	11
'Tango Dark Red' - Knospe	123,78 ***	11
'Tango Dark Red' - Blütenstandstiel	36,73 ***	11
'Perlenkette Scarlet' - Petiole	112,64 ***	11
'Perlenkette Scarlet' - Knospe	203,87 ***	11
'Perlenkette Scarlet' - Blütenstandstiel	222,07 ***	11

Bei Betrachtung der beiden Diagramme (5 und 6) ergeben sich große Unterschiede innerhalb der beiden Sorten. 'Tango Dark Red' ist eine Sorte, die allgemein schwächer reagiert. Ihr höchster Wert liegt bei 1,86 somat. Embryonen/Explantat bei Knospen-Explantaten im Februar. 'Perlenkette Scarlet' hingegen erreicht ihr Maximum bei 7,89 somat. Embryonen/Explantat und dies bei Blütenstandstielen im November. In diesen beiden Ergebnissen spiegeln sich auch die Grundtendenzen der beiden Sorten wieder: 'Perlenkette Scarlet' ist eine Sorte, die mit Blütenstandstielen ihre besten Ergebnisse erzielt und dies vor allem im Sommer und Spätherbst. 'Tango Dark Red' hingegen bildet vor allem an Knospen-Explantaten die höchste Anzahl somatischer Embryonen und dies bevorzugt im Winter und Frühjahr. Signifikante Unterschiede zeigen sich bei statistischer Betrachtung (Tabelle 9) bei jeder Variable, d.h. bei der Sorte, der Explantatart und dem Monat und dies auch für jede Sorten-Explantat-Art-Kombination.

Auch bei diesem Versuch war zu beobachten, dass sich die somatischen Embryonen meist in „Clustern“, also angehäuften an bestimmten Stellen ausbildeten. Abbildung 13 zeigt solch ein Cluster in einem frühen Stadium mit hauptsächlich globulären Strukturen an einem Blütenstandstiel-Explantat. Abbildung 14 hingegen zeigt ein Knospen-Explantat, bei dem sich die Embryonen schon in einem späteren (hauptsächlich Kotyledonen-) Stadium befinden.



Abbildung 13: globuläres Embryonen-Cluster an Blütenstandstiel-Explantat von 'Perlenkette Scarlet'



Abbildung 14: Embryonen-Cluster mit Kotyledonenstadien an Knospen-Explantat von 'Perlenkette Scarlet'

3.1.5. Pflanzen-Herkunft (Klimakammer und Gewächshaus)

Untersucht wurden in einem weiteren Ansatz, der Mitte August gemacht wurde, der Einfluss der Bedingungen, unter denen die Mutterpflanzen gehalten wurden. Hierzu wurden zwei unterschiedlich behandelte Ausgangspflanzen zur Explantatentnahme verwendet. Zum einen Pflanzen, die unter diesen sommerlichen Bedingungen im Gewächshaus kultiviert wurden und zum anderen Pflanzen, die nach einem leichten Rückschnitt 10 Wochen in einer Klimakammer mit einer Temperatur von 18 °C und einer Belichtung von 12 Stunden täglich gehalten wurden.

Es wurde mit drei Sorten von PZH gearbeitet ('Perlenkette Scarlet', 'Perlenkette Orange' und 'Charleston 2002') und davon jeweils zwei Explantat-Arten entnommen (Petiolen und Blütenstandstiele). Pro Variante wurden 80 Explantate angesetzt.

Diagramm 7: Einfluss von Gewächshaus- und Klimakammer-Ausgangspflanzen

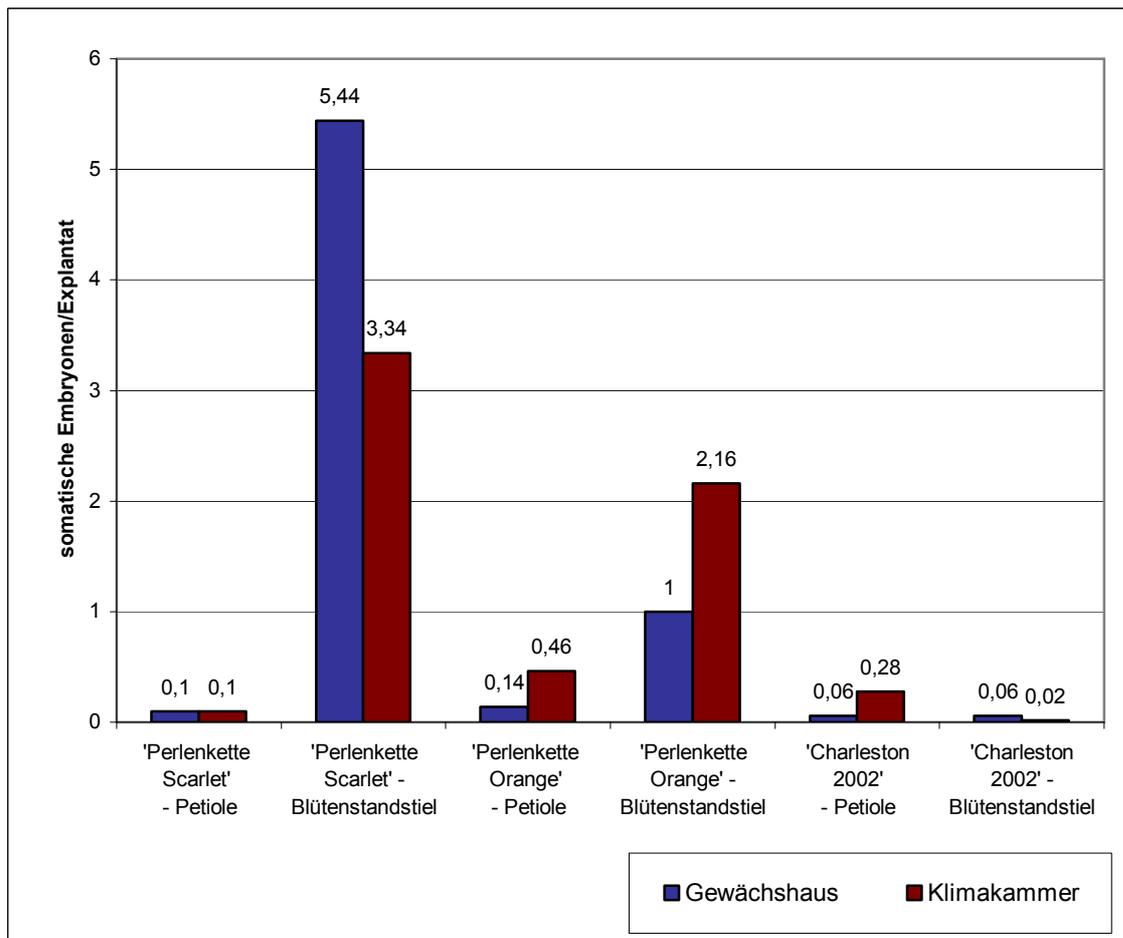


Tabelle 11: Einfluss der Pflanzen-Herkunft, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	72,50 ***	2
Einfluss der Explantatart	85,30 ***	1
Einfluss der Pflanzen-Herkunft	1,77 n.s.	1
Einfluss der Pflanzen-Herkunft bei der Sorten-Explantat-Art-Kombination:		
'Perlenkette Scarlet' - Petiole	0,19 n.s.	1
'Perlenkette Scarlet' - Blütenstandstiel	7,11 *	1
'Perlenkette Orange' - Petiole	3,81 n.s.	1
'Perlenkette Orange' - Blütenstandstiel	8,19 **	1
'Charleston 2002' - Petiole	5,41 *	1
'Charleston 2002' - Blütenstandstiel	0,35 n.s.	1

Die Ergebnisse (Diagramm 7) zeigen, dass die Petiolen-Explantate allgemein schwächer reagiert haben als die Blütenstandstiele. Auch die statistische Betrachtung (Tabelle 11) zeigt bei den Petiolen kaum Signifikanzen. Ausnahme hierbei bildet 'Charleston 2002', dies aber auch nur auf einem 5%-Niveau. 'Charleston 2002' reagierte auch mit den Blütenstandstielen sehr schwach und zeigte bei den Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede zwischen Ausgangspflanzen aus dem Gewächshaus und der Klimakammer.

'Perlenkette Scarlet' und 'Perlenkette Orange' zeigten mit ihren Blütenstandstielen ihre höchsten Ergebnisse, jedoch bei unterschiedlichen Ausgangspflanzen. Während 'Perlenkette Scarlet' an Blütenstandstiel-Explantaten der sommerlich gehaltenen Ausgangspflanzen aus dem Gewächshaus die höchste Anzahl somatischer Embryonen bildete, entstanden bei 'Perlenkette Orange' die meisten somatischen Embryonen auf Blütenstandstiel-Explantaten, die den kühler gehaltenen Klimakammer-Pflanzen entnommen wurden. Insgesamt betrachtet, zeigten sich kein signifikanter Einfluss der Ausgangspflanzen-Herkunft bei den untersuchten Sorten.



Abbildung 15: Blütenstandstiel-Explantat von 'Perlenkette Scarlet'

Abbildung 15 zeigt ein besonders gut regenerierendes Blütenstandstiel-Explantat von 'Perlenkette Scarlet', das einer im Gewächshaus gehaltenen Pflanze entnommen wurde.

3.1.6. Alter der Ausgangspflanzen

Ein anderer Aspekt der Ausgangspflanzen war deren Alter. Es wurde untersucht, inwieweit es einen Einfluss hatte, ob die Pflanzen zur Explantatentnahme jung, d.h. zum Zeitpunkt der Explantatentnahme etwa fünf Monate alt (ausgehend von den angelieferten bewurzelten Stecklingen) oder alt, d.h. ein Jahr älter (aus dem Bestand des vorigen Jahres) waren. Untersucht wurde dies an den Sorten 'Tango Dark Red', 'Schöne Helena', 'Alba' und 'Robe'. Es wurden pro Sorte 50 Petiolen-Explantate in Kultur genommen.

Diagramm 8: Einfluss des Alters der Ausgangspflanzen

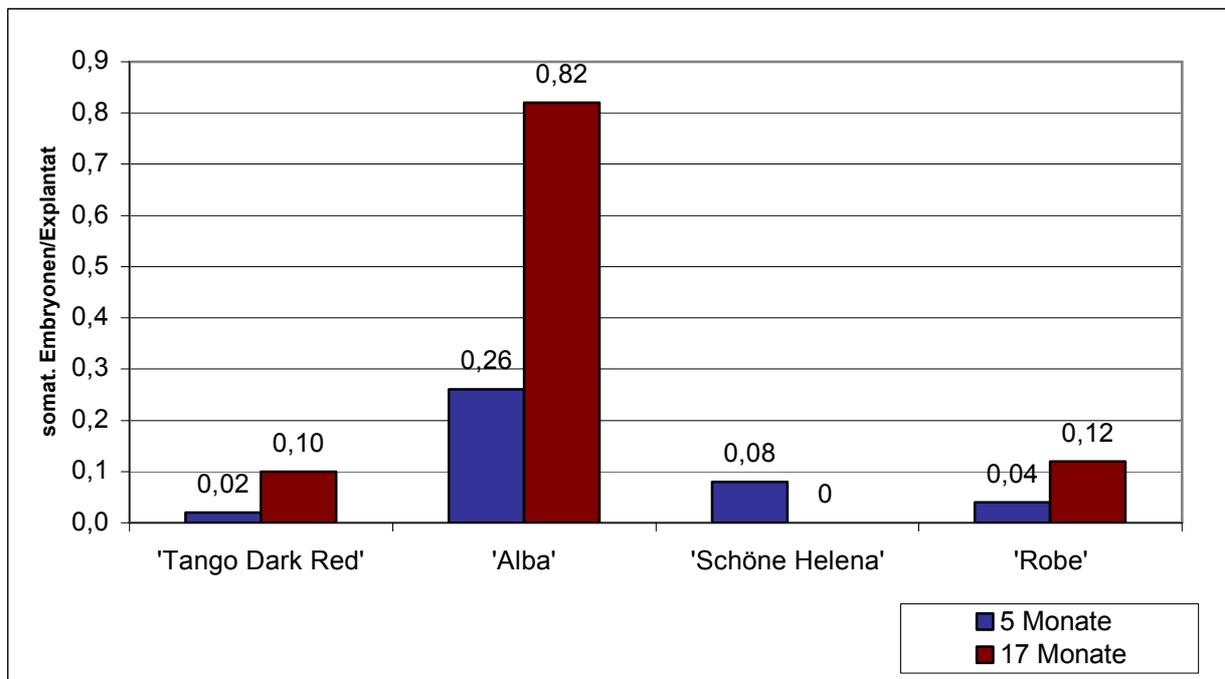


Tabelle 12: Einfluss des Alters der Ausgangspflanzen, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	38,60 ***	3
Einfluss des Alters	4,42 *	1
Einfluss des Alters bei der Sorte:		
'Tango Dark Red'	1,90 n.s.	1
'Alba'	5,03 *	1
'Schöne Helena'	3,06 n.s.	1
'Robe'	1,82 n.s.	1

Die Werte dieses Versuches fielen allgemein relativ schwach aus (Diagramm 8). Tabelle 12, die statistische Auswertung, zeigt für die Sorte stark signifikante Unterschiede an, für das Alter jedoch nur eine Signifikanz auf einem 5%-Niveau. Bei Betrachtung der einzelnen Sorten zeigt sich, dass sich die Unterschiede nur auf die Sorte 'Alba' beziehen und diese auch nur schwach signifikant. Bei allen anderen Sorten zeigten sich statistisch betrachtet keine Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlich alten Ausgangspflanzen.

3.1.7. Etiolierung der Ausgangspflanzen

Aufgrund dessen, dass bei Versuchen mit Hypokotylen zur besseren Induktion von somatischen Embryonen eine Etiolierung herbeigeführt wurde, wurde untersucht, inwieweit diese Methode bei Blattstielen eine Verbesserung hinsichtlich der Induzierbarkeit von somatischen Embryonen brachte. Hierzu wurden von den beiden PZH 'Tango Dark Red' und 'Perlenkette Scarlet' jeweils fünf Pflanzen zurückgeschnitten und in eine Klimakammer mit einer Temperatur von 18 °C und einer Luftfeuchte von 60 % gestellt. Die ersten drei Tage wurden die Pflanzen noch 12 Stunden täglich belichtet, anschließend standen sie zur Etiolierung zwei Wochen ohne Licht.

Neben den etiolierten Petiolen wurde auch Material aus dem Gewächshaus zur Kontrolle verwendet, wobei pro Variante 80 Explantate in Kultur genommen wurden.

Diagramm 9: Einfluss einer Etiolierung der Ausgangspflanzen

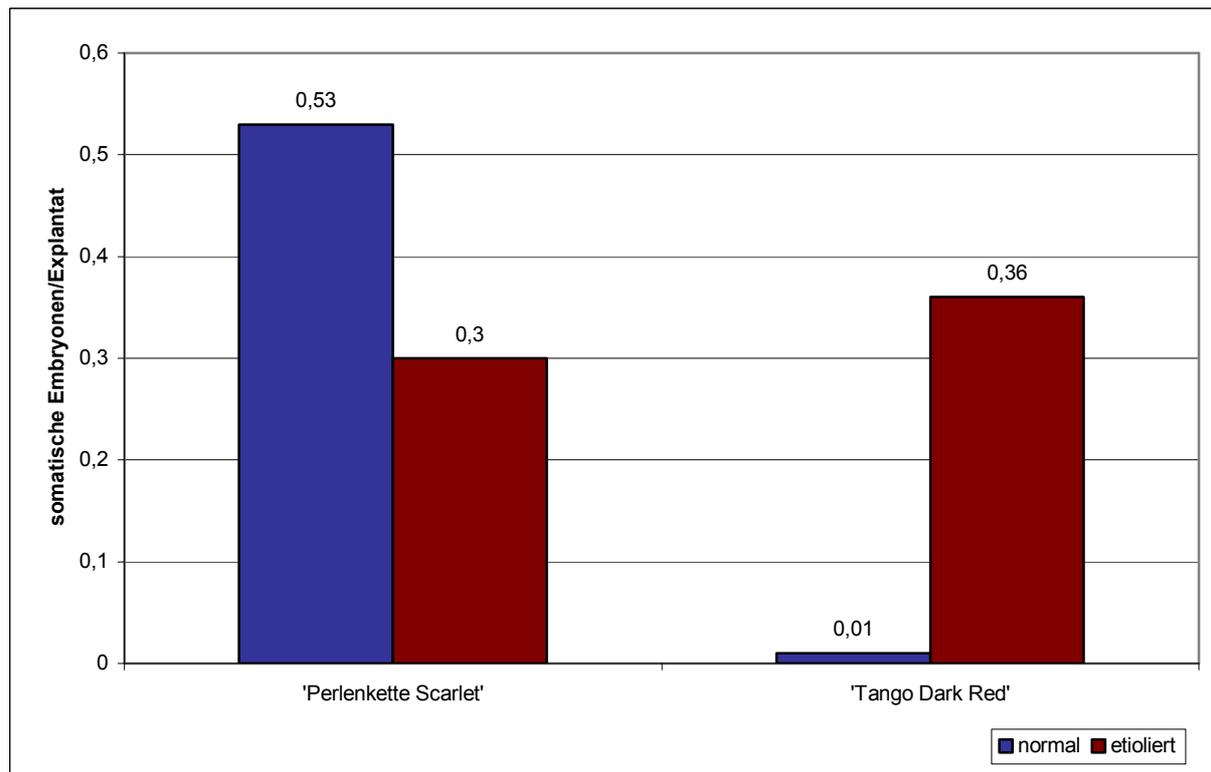


Tabelle 13: Einfluss der Vorbehandlung (Etiolierung), Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	2,51 n.s.	1
Einfluss der Vorbehandlung	2,38 n.s.	1
Einfluss der Vorbehandlung bei der Sorte:		
'Perlenkette Scarlet'	2,32 n.s.	1
'Tango Dark Red'	18,48 ***	1

Bei den etiolierten Explantaten war zu beobachten, dass es allgemein zu einer geringeren Anschwellung des Explantates kam. Die Kallusbildung hingegen war etwas stärker.

Die statistische Auswertung (Tabelle 13) zeigt einen signifikanten Unterschied nur bei der Sorte 'Tango Dark Red'. Hier kam es zu einer Verbesserung des Ergebnisses durch eine Etiolierung des Ausgangsmaterials (Vgl. Diagramm 9). Die Verschlechterung des Ergebnisses durch eine Etiolierung der Ausgangspflanzen bei 'Perlenkette Scarlet' ließ sich statistisch nicht belegen.

Die gebildeten somatischen Embryonen bei 'Tango Dark Red' waren zunächst gelblich und bildeten erst im späteren Verlauf ihrer Entwicklung (nach ca. 2 Wochen) Chlorophyll und zeigten somit eine grüne Färbung.

3.1.8. Selektion von Pflanzen mit embryogenem Potential

In vorherigen Versuchen zeigte sich, dass der Genotyp (die Sorte) einen starken Einfluss auf die Bildung somatischer Embryonen hat. Es wurde nun untersucht, inwieweit Pflanzen mit embryogenem Potential selektiert werden können, um embryogene Linien zu entwickeln, die diese Fähigkeit zur Bildung somatischer Embryonen auch an ihre Nachkommen weiter geben. Hierzu wurden zwei Arten von Ausgangspflanzen verglichen. Zum einen Pflanzen aus dem Gewächshaus (ehemals zugekaufte Stecklinge) und zum anderen Pflanzen, die aus in vitro induzierten somatischen Embryonen entstanden sind, die anschließend im Gewächshaus etabliert wurden. Es wurde mit den beiden PZH 'Perlenkette Scarlet' und 'Samba' gearbeitet, von denen jeweils 80 Petiolen und Blütenstandstiele entnommen wurden.

Diagramm 10: Einfluss von selektiertem Pflanzenmaterial

(P = Petiole, B = Blütenstandstiel,
S = Stecklingspflanze, sE = Pflanze aus somatischem Embryo)

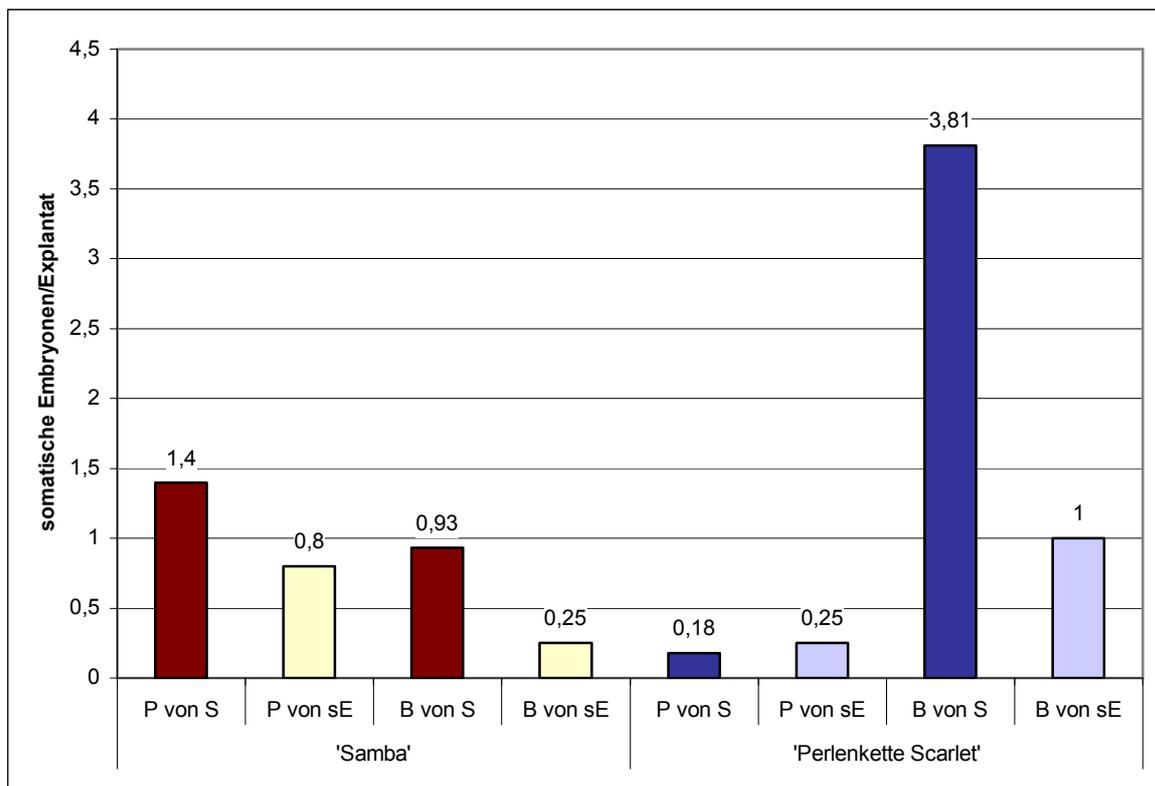


Tabelle 14: Einfluss von selektierten Genotypen, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss von selektiertem Pflanzenmaterial bei der Sorten-Explantat-Art-Kombination:		
'Samba' - Petiole	2,70 n.s.	1
'Samba' - Blütenstandstiel	7,44 **	1
'Perlenkette Scarlet' - Petiole	0,68 n.s.	1
'Perlenkette Scarlet' - Blütenstandstiel	10,22 **	1

Einen Überblick über die Ergebnisse dieses Versuchs gibt Diagramm 10. Unter zusätzlicher Betrachtung der statistischen Auswertung (Tabelle 14) zeigt sich, dass nur die Blütenstandstiele der beiden Sorten signifikante Unterschiede (auf einem 1%-Niveau) hinsichtlich der Herkunft der Ausgangspflanzen besitzen. Hier zeigten sich Stecklingspflanzen aus dem Gewächshaus als besser geeignet zur Induktion von somatischen Embryonen. Besonders bei den Blütenstandstiel-Explantaten der Sorte 'Perlenkette Scarlet' wird dies deutlich.

Bei den Petiolen-Explantaten ließ sich statistisch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Herkunft der Ausgangspflanzen erweisen, auch wenn die Ergebnisse der Sorte 'Samba' ein besseres Ergebnis der Stecklingspflanzen vermuten lassen.

Bei der Auswertung der Explantate mithilfe des Binokulars ließ sich außerdem beobachten, dass sich auf den Explantaten der Pflanzen aus somatischen Embryonen wesentlich mehr abnorme und vitrifizierte Embryonen bildeten.

3.2. Einfluss des Nährmediums

Das Nährmedium ist ein elementarer Faktor zur Induktion von somatischen Embryonen auf Explantaten. Neben dem Stamm-Medium ist vor allem die Phytohormon-Zusammensetzung und -Konzentration der ausschlaggebende Stimulus.

3.2.1. Thidiazuron und Picloram

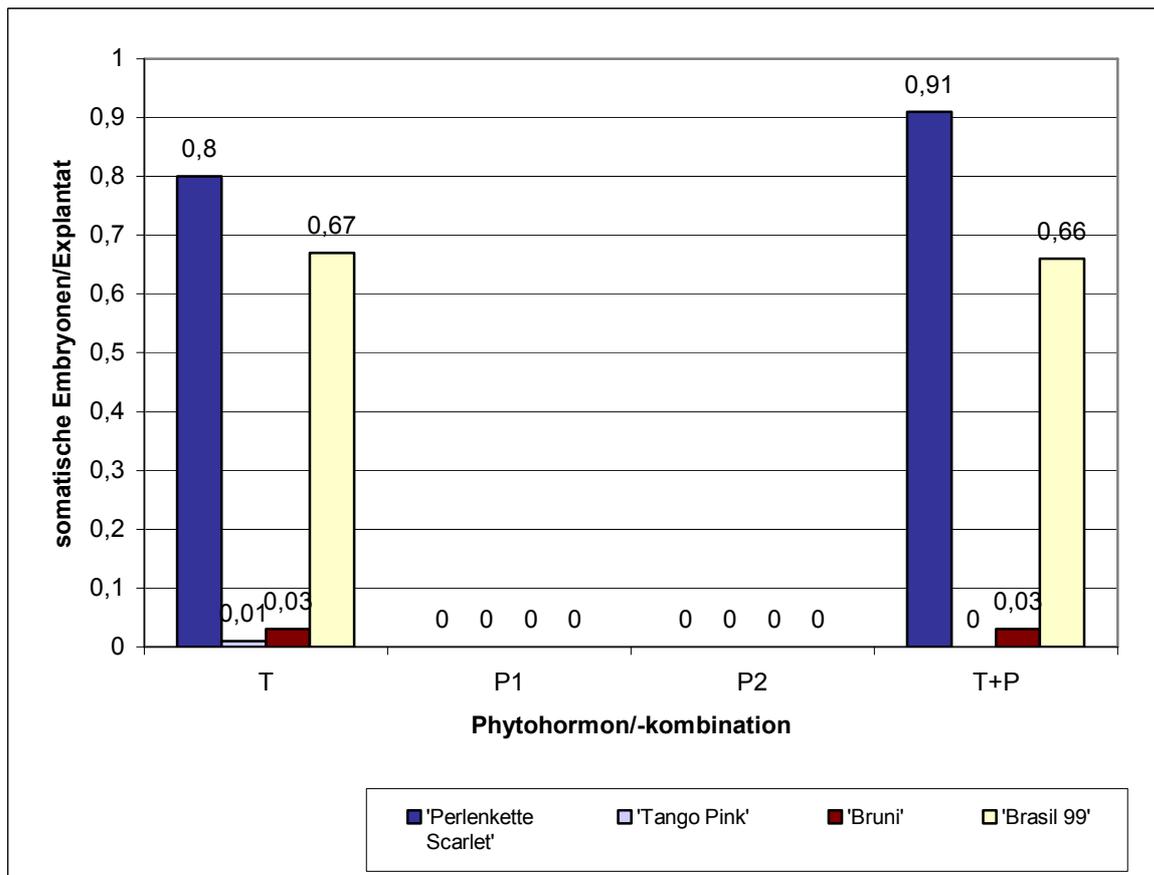
Es wurde die Wirksamkeit von Picloram (PIC) im Vergleich zu Thidiazuron (TDZ) bzw. in Kombination mit Thidiazuron auf die Bildung somatischer Embryonen getestet. Außerdem wurde mit Picloram eine längere Induktionsdauer von zwei Wochen durchgeführt.

Picloram ist ein synthetisches und in seiner Wirkung Auxin-ähnliches Phytohormon. Sein Einfluss wurde auf vier verschiedene PZH-Sorten getestet: 'Perlenkette Scarlet', 'Tango Pink', 'Bruni', und 'Brasil 99'. Der Versuchsumfang betrug 72 Petiolen-Explantate pro Variante.

Die vier verschiedenen Medien hatten folgende Phytohormon-Zusammensetzung und Induktionsdauer:

- T: 10 μ M TDZ Induktionsdauer 1 Woche
- P1: 5 μ M PIC Induktionsdauer 1 Woche
- P2: 5 μ M PIC Induktionsdauer 2 Woche
- T+P: 10 μ M TDZ+ 5 μ M PIC Induktionsdauer 1 Woche

Diagramm 11: Einfluss von Thidiazuron und Picloram



Ein Induktions-Medium, das ausschließlich Picloram als Phytohormon enthielt, war bei keiner der vier Sorten erfolgreich (Vgl. Diagramm 11), weder bei einer Induktionsdauer von einer noch von zwei Wochen.

Die statistische Analyse (Tabelle 15) dieses Versuches zeigte, dass nur 'Perlenkette Scarlet' und 'Brasil 99' hoch signifikante Unterschiede zwischen den Phytohormonen zur Induktion hatten.

Tabelle 15: Einfluss von Thidiazuron und Picloram, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	56,22 ***	3
Einfluss der Phytohormone	88,34 ***	3
Einfluss der Phytohormone bei der Sorte:		
'Perlenkette Scarlet'	35,44 ***	3
'Tango Pink'	3,00 n.s.	3
'Bruni'	4,04 n.s.	3
'Brasil 99'	53,37 ***	3

Die Beobachtungen unter dem Binokular waren derart, dass sich auf den Explantaten die auf Picloram-haltigem Medium kultiviert wurden, ein sehr starker wässriger Kallus bildete. Die Explantate selbst zeigten kaum Schwellung.

Am optimalsten ließ sich die Embryogenese an Explantaten mit reinem Thidiazuron als Phytohormon-Quelle beobachten. Hier ließen sich die einzelnen Stadien gut erkennen. Bei einer Kombination von Thidiazuron und Picloram zeigte es sich, dass die Explantate zum großen Teil leicht verbräunten und es zu einer stärkeren Bildung von weißem, wässrigen Kallus kam.

3.2.2. Thidiazuron verschiedener Hersteller mit unterschiedlichen Lösungsmitteln

Im Laufe der Untersuchungen kam es bei dem Ansetzen der Thidiazuron-Stammlösung mit dem Lösungsmittel DMSO zu Ausflockungen. Das Thidiazuron-Pulver konnte nicht vollständig gelöst werden. Da dadurch eine genaue Dosierung nicht mehr gewährleistet werden konnte, wurde der Einfluss von Thidiazuron verschiedener Hersteller (Sigma-Aldrich und Duchefa) und der beiden Lösungsmittel DMSO und KOH untersucht.

Der Ansatz erfolgte mit jeweils 56 Petiolen-Explantaten der Sorten 'Tango Pink', 'Perlenkette Scarlet' und 'Alba'.

Diagramm 12: Einfluss verschiedener Thidiazuron-Hersteller und Lösungsmittel

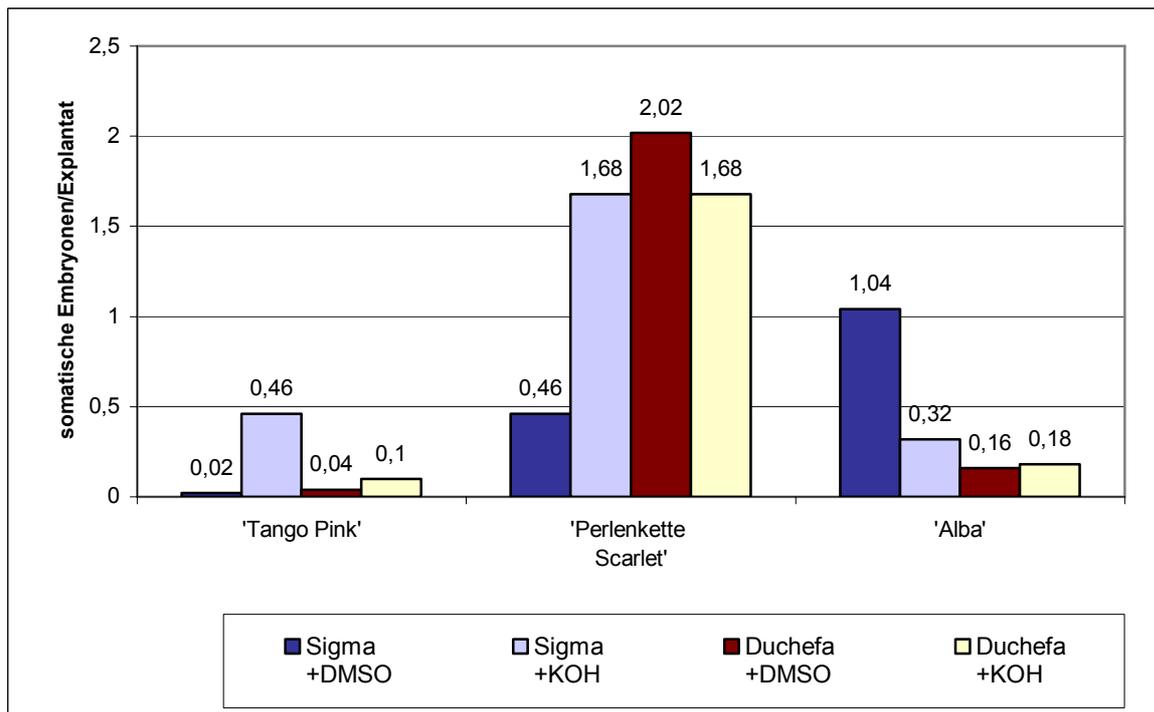


Tabelle 16: Einfluss verschiedener Thidiazuron-Hersteller und Lösungsmittel, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	36,98 ***	2
Einfluss der Kombinationen (TDZ mit Lösungsmittel)	2,41 n.s.	3
Einfluss der Kombinationen (TDZ mit Lösungsmittel) bei der Sorte:		
'Tango Pink'	3,59 n.s.	3
'Perlenkette Scarlet'	10,04 *	3
'Alba'	2,43 n.s.	3

Nach statistischer Auswertung (Tabelle 16) zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Phytohormon-Lösungsmittel-Kombinationen. Nur bei 'Perlenkette Scarlet' ließ sich ein leicht signifikanter Einfluss nachweisen.

3.2.3. Acetylsalicylsäure

Nachdem HUTCHINSON und SAXENA 1996 bei Hypokotyl-Explantaten die Beobachtung machten, dass Acetylsalicylsäure (ASA) in Verbindung mit Thidiazuron zu einer stärkeren Induktion und zu einer Synchronisation der somatischen Embryonen führte, wurde ein solcher Ansatz auch mit Petiolen-Explantaten durchgeführt. Neben einem Zusatz von 10 μM TDZ zum Nährmedium, gab es vier verschiedene Konzentrationen von ASA: 0, 5, 10 oder 20 μM . Es wurde mit den vier Sorten 'Tango Dark Red', 'Alba', 'Schöne Helena' und 'Bruni' gearbeitet. Der Versuchsumfang belief sich auf 56 Explantate je Variante.

Diagramm 13: Einfluss von Acetylsalicylsäure

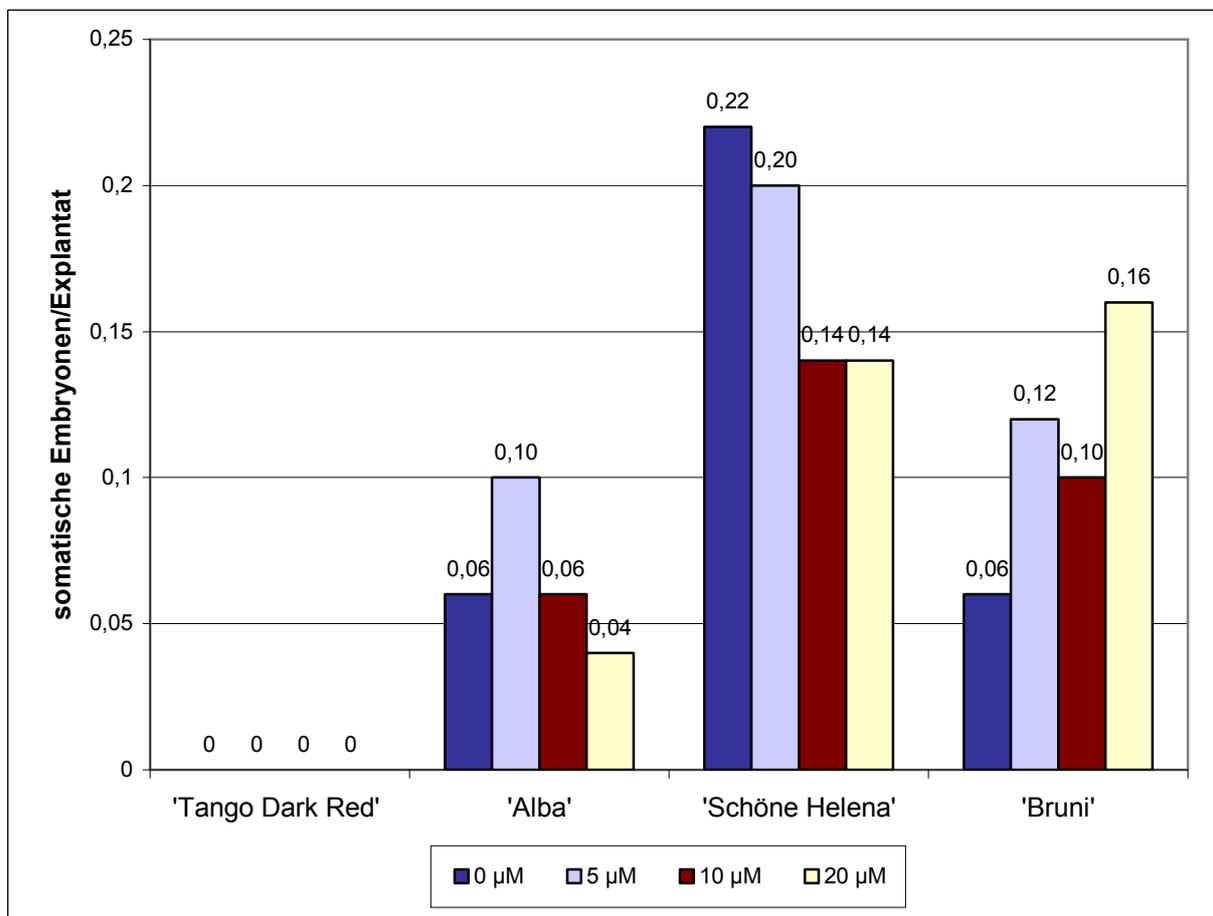


Tabelle 17: Einfluss von Acetylsalicylsäure, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	18,94 **	3
Einfluss der ASA-Konzentration	0,92 n.s.	3
Einfluss der ASA-Konzentration bei der Sorte:		
'Schöne Helena'	0,27 n.s.	3
'Alba'	3,61 n.s.	3
'Bruni'	0,64 n.s.	3
'Tango Dark Red'	0 n.s.	3

Die Anzahl der gebildeten somatischen Embryonen war beim gesamten Versuch relativ gering (vgl. Diagramm 13). Es wurde nur ein Maximum von 0,22 s.E./Expl. erreicht bei 'Schöne Helena' mit einem Medium ohne ASA. 'Tango Dark Red' bildete bei keiner Variante des Mediums somatische Embryonen.

Nur der Einfluss der Sorte wurde statistisch nachgewiesen (vgl. Tabelle 17). ASA hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung somatischer Embryonen.

3.3. Einfluss der in vitro Kultur-Bedingungen

Nach Auswahl von geeignetem Pflanzenmaterial und einem sicheren Induktions-Nährmedium, sind auch Faktoren während der Überführung in die in vitro Kultur und der in vitro Kultur-Bedingungen selbst von Bedeutung. Die Präparations-Art der Explantate, wie z.B. ein Halbieren, ein Hitzeschock zu Beginn der Kultur oder ein eventueller positiver Einfluss einer Co-Kultur mit Hypokotyl-Explantaten seien hier angeführt.

3.3.1. Präparationsart der Explantate

Nachdem zu beobachten war, dass sich die somatischen Embryonen auf der aus dem Medium ragenden Oberfläche der Explantate bildeten, war der nächste Schritt, die Explantate längs zu halbieren um somit eine größere Oberfläche zu schaffen.

Es wurden hierzu die Sorten 'Perlenkette Scarlet' und 'Avenida' verwendet und davon jeweils Petiolen- und Blütenstandstiel-Explantate. Pro Variante wurden 40 Explantate angesetzt.

Da zu erwarten war, dass die Halbierung der Explantate einen zusätzlichen Stress durch eine größere Schnittfläche bedeuten und damit zu einer verstärkten Phenolausscheidung führen würde, wurde neben den Varianten „ganze Explantate“ und „halbierte Explantate“ zusätzlich eine Variante eingeführt, bei der die Explantate erst zwei Tagen nach Beginn der Inkulturnahme halbiert und dann wieder auf das Nährmedium überführt wurden.

Diagramm 14: Einfluss der Präparationsart der Explantate

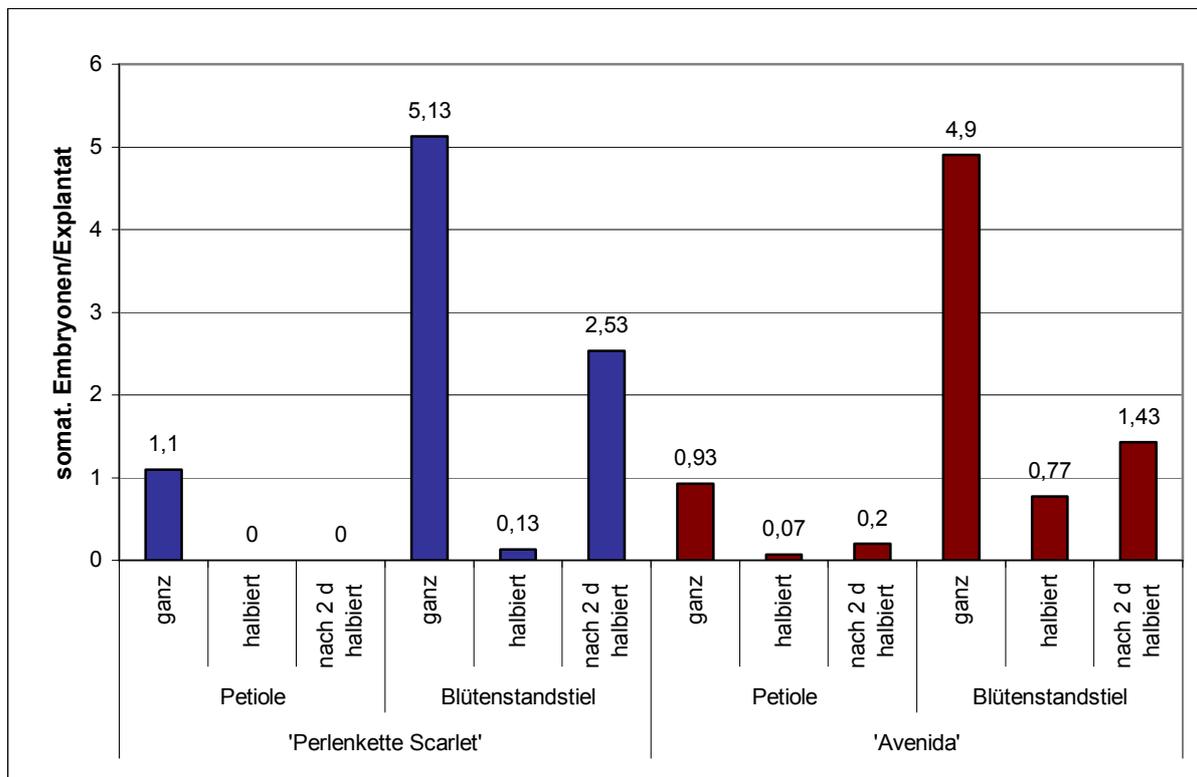


Diagramm 15: Überlebensrate in % bei verschiedenen Präparationsarten

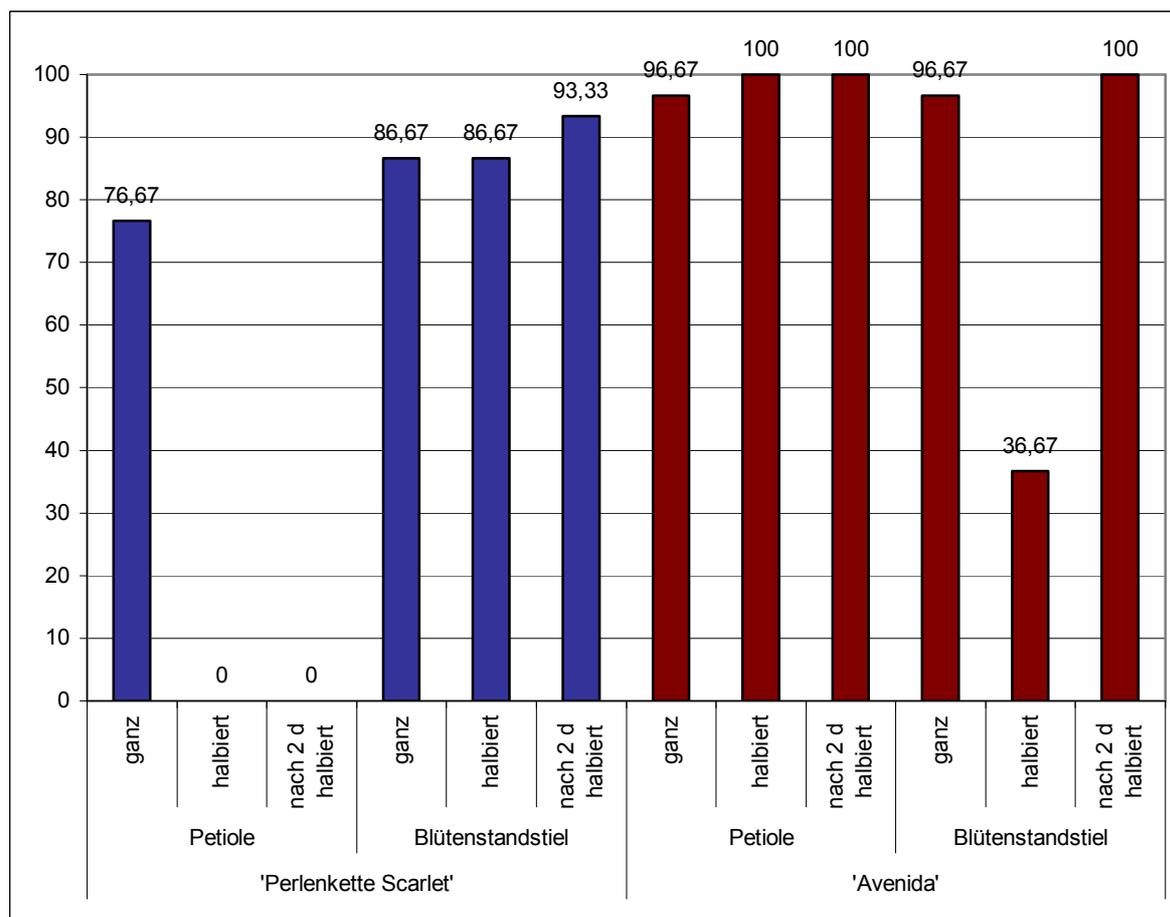


Tabelle 18: Einfluss der Präparationsart, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	1,04 n.s.	1
Einfluss der Explantat-Art	43,43 ***	1
bei der Sorte 'Perlenkette Scarlet':		
Einfluss der Explantat-Art	22,45 ***	1
Einfluss der Präparationsart	43,02 ***	2
bei der Sorte 'Avenida':		
Einfluss der Explantat-Art	21,17 ***	1
Einfluss der Präparationsart	47,28 ***	2

Bei diesem Versuch zeigte die Sorte keinen signifikanten Einfluss (Tabelle 18), da sie recht ähnlich reagierten. Einen Einfluss hatten dafür die Explantat-Art und die Präparationsart, sowohl beim gesamten Versuch, als auch für die Sorten getrennt betrachtet (vgl. Tabelle 17).

Die mit Abstand größte Anzahl somatischer Embryonen wurde bei beiden Sorten auf ganzen Blütenstandstiel-Explantaten gebildet (Vgl. Diagramm 14). Bei den Blütenstandstielen zeigte sich auch, dass ein Halbieren der Explantate nach zwei Tagen zu besseren Ergebnissen führte, als wenn die Explantate gleich zu Beginn der Kultur halbiert wurden. Die Petiolen wiesen allgemein schwächere Ergebnisse auf, es zeigte sich jedoch auch hier die Tendenz, dass ganze Explantate besser geeignet waren.

Die Hinzunahme der Überlebensraten (Diagramm 15) zeigt, dass bei 'Perlenkette Scarlet' eine Halbierung der Explantate, egal zu welchem Zeitpunkt zu einem Absterben aller Explantate geführt hat. Bei den Blütenstandstielen von 'Perlenkette Scarlet' und den Petiolen von 'Avenida' zeigen sich kaum Unterschiede bei der Überlebensrate. Bei den Blütenstandstielen von 'Avenida' führte das Halbieren der Explantate im Vergleich zum ganzen Explantat zu einer wesentlich schlechteren Überlebensrate, ein Halbieren nach zwei Tagen jedoch ließ die Überlebensrate auf 100 % steigen.

Trotz Zusatz von Ascorbin- und Zitronensäure bildeten sich auf den Medien der beiden Varianten mit halbierten Explantaten starke phenolische Ausscheidungen um die Explantate.

3.3.2. Hitzeschock

Als ein weiterer Auslöser zur Induktion von somatischen Embryonen wurde ein Hitzeschock zu Beginn der *in vitro* Kultur untersucht. Die Explantate wurden hierzu wie bei den anderen Versuchen entnommen, keimabtötenden Maßnahmen unterzogen und auf das Induktionsmedium gegeben. Anschließend wurden die Petrischalen nur zum Teil direkt in die Rubarth-Schränke bei 25 °C überführt. Bei drei anderen Varianten wurden die Petrischalen zunächst in einen Trockenschrank bei einer Temperatur von 40 °C gehalten für 2, 4 oder 6 Stunden. Nach dieser Schockbehandlung wurden auch diese Explantate im Rubarth-Schrank weiter kultiviert.

Es wurde mit den Sorten 'Tango Dark Red' und 'Alba' gearbeitet und davon jeweils 56 Petiolen- und Blütenstandstiel-Explantate entnommen.

Diagramm 16: Einfluss eines Hitzeschocks

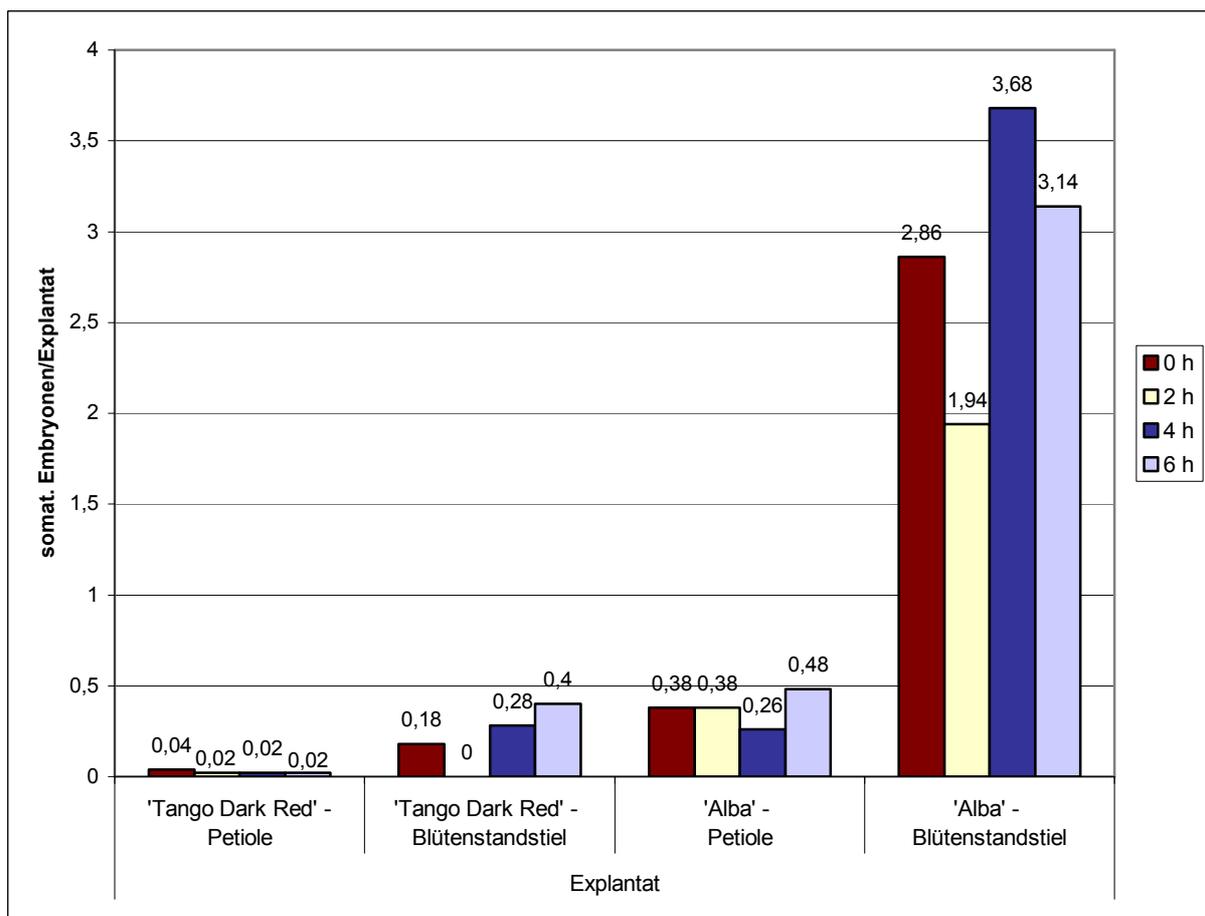


Tabelle 19: Einfluss eines Hitzeschocks, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	213,23 ***	1
Einfluss der Explantat-Art	140,19 ***	1
Einfluss der Hitzedauer	6,82 n.s.	3
Einfluss der Hitzedauer bei der Sorten-Explantatart-Kombination:		
'Tango Dark Red' - Petiole	0,61 n.s.	3
'Tango Dark Red' - Blütenstandstiel	8,08 *	3
'Alba' - Petiole	0,19 n.s.	3
'Alba' - Blütenstandstiel	15,19 **	3

Der Einfluss von Sorte und Explantat-Art war sehr stark, wobei 'Alba' mehr somatische Embryonen bildete. Bei beiden Sorten war zu beobachten, dass Blütenstandstiele höhere Ergebnisse lieferten als Petiolen. Eine Hitzedauer wirkte sich jedoch bei keiner Variante positiv aus.

3.3.3. Co-Kultur von Explantaten mit embryogenen Hypokotyl-Kulturen

Die Explantate, die sich bei einer in vitro Kultur auf dem Nährmedium befinden, nehmen nicht nur Stoffe aus diesem auf, sondern geben ihrerseits auch Verbindungen (wie z.B. die auch optisch erkennbaren Phenole) an dieses ab. Es wurde getestet, inwieweit Hypokotyl-Explantate nach erfolgreicher Einleitung von somatischer Embryogenese in der Lage sind, positiv auf eine somatische Embryogenese bei schwerer induzierbaren Petiolen-Explantate zu wirken. Ob sie also in diesem Prozess freigesetzte chemische Verbindungen an das Nährmedium abgeben und dadurch unterstützend auf die somatische Embryogenese anderer Explantate wirken. Als Beispiel für solch eine Verbindung seien Arabinogalactan-Proteine genannt, wie sie in embryogenem Kallus von *Euphorbia pulcherrima* (SAARE-SURMINSKI et al., 2000) untersucht worden sind und es sich zeigte, dass die Konzentration bei der Entwicklung somatischer Embryonen stieg.

Der Versuch wurde mit sechs PZH- Sorten durchgeführt ('Tango Pink', 'Brasil 99', 'Bruni', 'Samba', 'Alba', 'Robe'). Pro Petrischale wurden vier Hypokotyl-Explantate der Sorte 'Orbit Scharlach' im Abstand von ca. 0,5 cm neben jeweils ein Petiolen-Explantat gelegt. Andere Versuchsbedingungen entsprachen dem üblichen Schema. Insgesamt wurden pro Sorte 40 Petiolen-Explantate angesetzt.

Diagramm 17: Einfluss einer Co-Kultur von Petiolen- und Hypokotylen-Explantaten

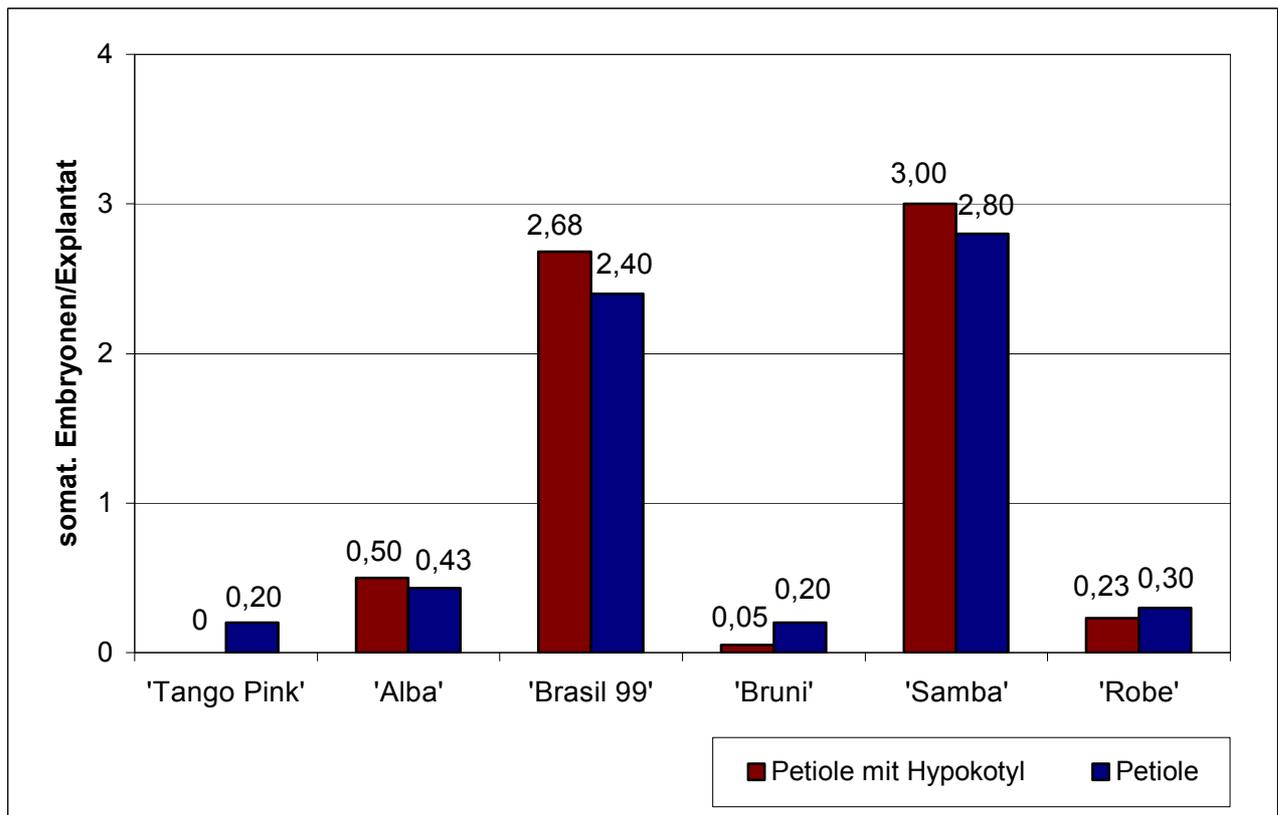


Tabelle 20: Einfluss einer Co-Kultur von Petiolen- und Hypokotylen-Explantaten, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Sorte	169,04 ***	5
Einfluss der Co-Kultur	6,81 **	1
Einfluss der Co-Kultur bei der Sorte:		
'Tango Pink'	6,40 n.s.	1
'Alba'	0 n.s.	1
'Brasil 99'	0,97 n.s.	1
'Bruni'	1,53 n.s.	1
'Samba'	3,69 n.s.	1
'Robe'	0,62 n.s.	1

Die gemeinsame Kultur von Petiolen- und Hypokotyl-Explantaten brachte keine Verbesserung durch eine stärkere Bildung von somatischen Embryonen bei den Petiolen-Explantaten.

3.4. Isolierung somatischer Embryonen und Überführung ins Gewächshaus

Nach erfolgreicher Induktion von somatischen Embryonen an Blütenstandstielen der Sorten 'Perlenkette Scarlet', 'Samba' und 'Avenida' wurde versucht, diese Embryonen vom Explantat zu isolieren und anschließend in ein Gewächshaus zu überführen.

Es wurde mit somatischen Embryonen gearbeitet, die durch 10 μM TDZ induziert wurden und anschließend auf hormonfreiem Medium regenerierten. Wie in Kapitel 2.5. beschrieben, wurden die Embryonen von den Explantaten mithilfe eines Skalpell isoliert. Entnommen wurden nur somatische Embryonen des Kotyledonen-Stadiums und des frühen Spross-Stadiums, um durch diese Größe eine Verletzung des Pflanzenmaterials zu vermeiden. Bei vorherigen Versuchen zeigte sich, dass die Handhabung von jüngeren Stadien (Herz- und Torpedo-) schwieriger war, und es bei diesen kleinen Embryonen zu sehr viel geringerer Regenerierungsrate aufgrund einer leichteren Verletzung mit Skalpell und Pinzette kam.

Tabelle 21: Regenerierungsrate von isolierten somatischen Embryonen

Sorte	Anzahl regenerierter s. E. von 30 isolierten s. E.	Prozentsatz regenerierter s. E.
'Perlenkette Scarlet'	29	96,67 %
'Samba'	27	90,00 %
'Avenida'	24	80,00 %

Die Regenerierungsrate der somatischen Embryonen war bei allen drei untersuchten Sorten sehr gut. Wenige Embryonen starben in der ersten Woche nach Überführung von der in vitro Kultur in Substrat im Gewächshaus ab. Dies geschah fast ausschließlich in der ersten Woche, als sich die jungen Pflanzen noch in den, mit einer Glasscheibe abgedeckten Multitopfplatten, befanden.

Alle anderen Embryonen zeigten einen gleichen Wachstumsverlauf wie „normale“ Sämlinge oder Stecklinge und entwickelten sich zu blühenden Pflanzen. Auch hier zeigten sich keine phänotypischen Abweichungen.

3.5. Versuche zu den Anwendungsbereichen

Aus dem breiten Einsatzgebiet für somatische Embryonen wurden hier zwei Anwendungen untersucht, die vor allem für *Pelargonium* von Bedeutung sind. Zum einen die Möglichkeit, somatische Embryonen in Flüssigkultur (hier das System RITA) zu induzieren unter dem Aspekt des Einsatzes zur Produktion künstlicher Samen. Zum anderen wurde untersucht, inwieweit sich somatische Embryonen von *Pelargonium* zur Transformation mit der Genkanone eignen. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, gezielte Züchtung betreiben zu können.

3.5.1. RITA-Gefäße bei Hypokotyl-Explantaten

Zur Einarbeitung in die Handhabung mit den RITA-Gefäßen wurden diese zunächst an Hypokotyl-Explantaten der Sorte 'Orbit Scharlach' erprobt.

Bei der *in vitro* Kultur wurde hinsichtlich der Induktion und Expression auf festen (Petrischale) oder flüssigem Medium (RITA-Gefäß) variiert, so dass drei verschiedene Varianten entstanden:

PR: Induktion in Petrischale, Expression in RITA

RR: Induktion in RITA, Expression in RITA

PP: Induktion in Petrischale, Expression in Petrischale

In die Einsätze der RITA-Gefäße wurden jeweils 20 Hypokotyl-Explantate gegeben.

Diagramm 18: Einfluss der Kulturgefäße bei Hypokotyl-Explantaten

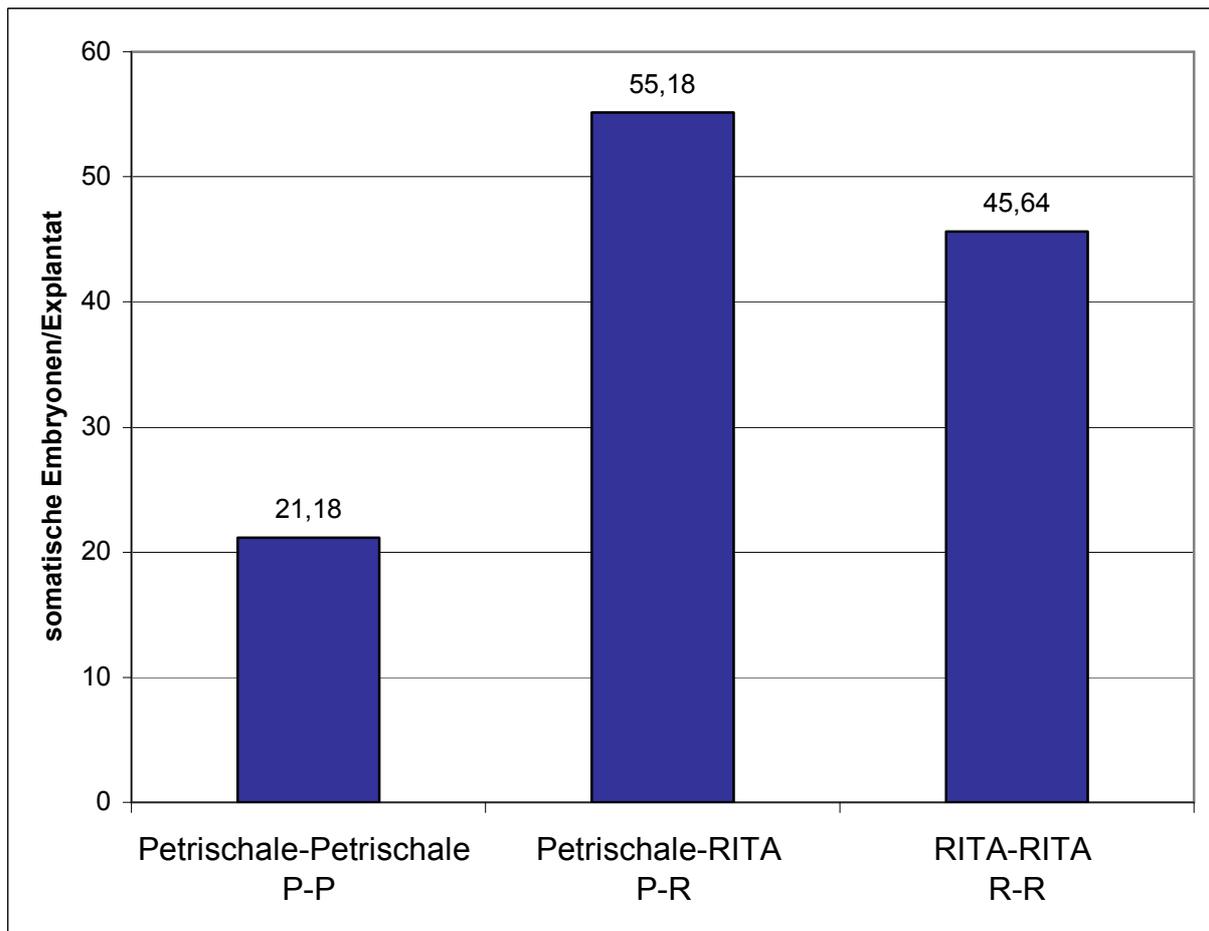


Tabelle 22: Einfluss der Kulturgefäße bei Hypokotylen, Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Kulturgefäße	58,02 ***	2

Die statistisch erwiesenen hoch signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 22) zwischen den unterschiedlichen Kulturbedingungen zeigten sich wie folgt:

Verglichen mit dem bisherigen Kulturverfahren in Petrischalen (21,18 s. E./Explantat) konnte durch eine reine RITA-Gefäß-Kultur eine Steigerung von 115 % erzielt werden (45,64 s. E./Explantat).

Ein noch besseres Ergebnis mit einer Steigerung um 161 % (55,18 s. E./ Explantat) ließ sich mit einer kombinierten Kultivierung von Petrischalen zur Induktion und RITA-Gefäßen zur Expression erzielen.

Durch eine Kultivierung in Flüssigkultur und die damit verbundenen Drehungen der Explantate bildeten sich die somatischen Embryonen auf der gesamten Oberfläche

der Explantate, was zu dieser Steigerung führte und unter dem Binokular sehr gut zu beobachten war. Diese hohen Ergebnisse waren jedoch nur mit Hypokotyl-Explantaten zu erzielen. Explantate von adulten Pflanzen liefern allgemein weniger somatische Embryonen.

Von den angesetzten Explantaten überlebten alle.



Abbildung 16: zerlegtes RITA-Gefäß

Abbildung 16 zeigt ein zerlegtes RITA-Gefäß, bestehend aus (von links nach rechts): dem Bechergesäß, in dem sich das flüssige Nährmedium befindet, dem Einsatz, auf dessen oberem Bereich sich auf einem dünnen Schaumstoff das Pflanzenmaterial befindet und der Schraubdeckel mit den beiden Schläuchen für Zu- und Abluft. An den beiden Schlauchenden befindet sich jeweils ein Sterilfilter für die Luft, an die dann noch mit einem Schlauchstück verbunden die Pumpe angeschlossen wird.



Abbildung 17: Aufsicht auf geöffnetes RITA-Gefäß neben Petrischale, beide mit Hypokotyl-Explantaten

Einen direkten Vergleich von RITA-Gefäßen und Petrischalen bietet Abbildung 17. Die Explantate, die sich in dem RITA-Gefäß befinden haben deutlich mehr somatische Embryonen ausgebildet als die in der Petrischale kultivierten. Auffallend ist auch die stärkere Chlorophyllausbildung bei den in RITA-Kultur induzierten somatischen Embryonen.

3.5.2. RITA-Gefäße bei Petiolen-, Blütenstandstiel und Knospen-Explantaten

Es wurde in diesem Versuch mit drei verschiedenen Explantat-Arten der Sorte 'Perlenkette Scarlet' gearbeitet: Petiolen, Blütenstandstielen und Knospen und den in Versuch 3.5.1. beschriebenen Kulturbedingungen mit Petrischalen und RITA-Gefäßen.

Diagramm 19: Einfluss der Kulturgefäße bei Petiolen, Blütenstandstielen und Knospen

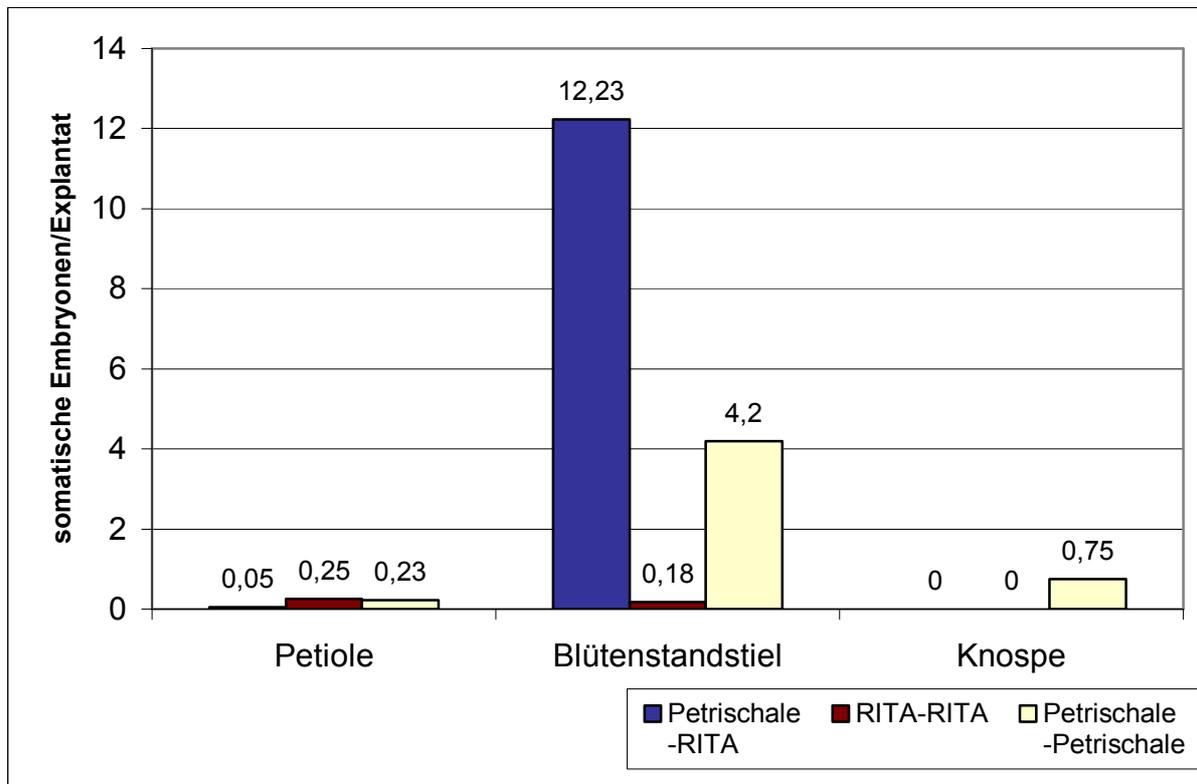


Tabelle 23: Einfluss der Kulturgefäße bei Petiolen, Blütenstandstielen und Knospen,
Statistische Auswertung

Variable	χ^2 (Kruskal-Wallis)	Freiheitsgrade
Einfluss der Explantat-Art	150,92 ***	2
Einfluss der Kulturgefäße	43,23 ***	2
Einfluss der Kulturgefäße bei den Explantat-Arten:		
Petiolen	3,58 n.s.	2
Blütenstandstiele	76,08 ***	2
Knospen	14,73 ***	2

Bei den Petiolen-Explantaten zeigte sich durch den Einsatz von RITA-Gefäßen kaum eine Erhöhung der gebildeten somatischen Embryonen pro Explantat im Vergleich zum Standardverfahren mit Petrischalen (vgl. Diagramm 19) und bei einer gemischten Kultivierung mit Petrischalen und RITA-Gefäßen kam es sogar zu einer Verschlechterung, dies alles jedoch auf einem nicht signifikanten Niveau (vgl. Tabelle 23).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei den Kulturbedingungen bei den Knospen-Explantaten dahingehend, dass sich ausschließlich bei dem klassischen Verfahren mit Petrischalen somatische Embryonen bildeten.

Die stärksten Ergebnisse lieferten die Blütenstandstiel-Explantate. Hier kam es bei einem kombinierten Verfahren (Induktion auf Petrischalen, Expression in RITA-Gefäßen) zu dem höchsten Ergebnis dieses Versuchs von 12,23 somatischen Embryonen pro Explantat. Die somatischen Embryonen bildeten sich auf der gesamten Oberfläche der Explantate und nicht nur auf einer (der Nährmedium-abgewandten) Seite, wie bei einer Petrischalen-Kultur zu beobachten. Im Vergleich zu dem bisherigen Verfahren einer Kultur ausschließlich in Petrischalen (4,2 s. E./Explantat) brachte eine ausschließliche Kultivierung in RITA-Gefäßen eine wesentlich geringere Menge an somatischen Embryonen (0,18 s. E./Explantat) hervor.

Tabelle 24: Überlebensrate der Explantate

Explantat-Art	Kulturgefäße	Überlebensrate der Explantate in %
Petiole	PR	90,00
	RR	47,50
	PP	72,50
Blütenstandstiel	PR	100,00
	RR	95,00
	PP	100,00
Knospe	PR	0
	RR	17,50
	PP	35,00

Hinzugezogen werden muss bei diesem Versuch auch die stark unterschiedlichen Überlebensraten der Explantate (Siehe Tabelle 24).

Bei den Knospen-Explantaten war neben der Fähigkeit zur Bildung somatischer Embryonen auch die Überlebensrate der Explantate selber schlecht. In RITA-Gefäßen überlebten keine oder nur 17,50 % der Explantate und auf Petrischalen ungefähr jedes dritte Explantat (35 %). Die meisten Knospen-Explantate verbräunten jedoch schon nach wenigen Tagen und starben vollkommen ab.

Bei den Petiolen-Explantaten zeigte sich die schlechteste Überlebensrate bei reiner RITA-Gefäß Kultur, dabei starb gut die Hälfte (52,5 %) der Explantate ab und zeigte die gleichen Verbräunungserscheinungen wie die Knospen-Explantate.

Blütenstandstiel-Explantate dagegen erwiesen sich auch hinsichtlich der Überlebensrate der Explantate am besten geeignet. Außer bei reiner RITA-Gefäß Kultur, bei der 5 % der Explantate abstarben, überlebten die Blütenstandstiele zu 100 % die in vitro-Kultur.

3.5.3. Transformation mit der Genkanone

In diesem Versuch wurde mit Petiolen-Explantaten von 'Perlenkette Scarlet' und Knospen-Explantaten von 'Brasil 99' gearbeitet.

Der Beschuss des Pflanzenmaterials erfolgte zu Beginn der dritten Kulturwoche.

Die Anordnung der Explantate in der Mitte der Petrischale führte zu einer hohen Anzahl von Zell-Treffern mit Goldpartikeln. Besonders gut sichtbar wurde dies nach der Expression des miteingeführten Marker-Gens (GUS-Gen-Konstrukt mit Hygromycin-Selektionsmarker). Nach der durchgeführten GUS-Färbung zeigten sich auf der gesamten Oberfläche der Explantate blaue Punkte in den Bereichen, in denen die Goldpartikel mit den GUS-Konstrukten in das Pflanzengewebe eingedrungen waren und dort auch exprimiert wurden (siehe Abbildung 18).

Zwischen den beiden verschiedenen Drücken (650 und 1350 psi) mit komprimierten Helium-Gas zeigten sich optisch keine Unterschiede an den Explantaten, die Anzahl der Zelltreffer war in etwa gleich.

Bei den insgesamt 120 Explantaten (84 Blütenstandstiele, 36 Knospen) zeigten sich nur transiente Expressionen. Das eingeführte Gen wurde nur kurzzeitig exprimiert und nicht stabil in das Genom der Pflanzenzellen integriert. Auf dem Hygromycin-haltigen Medium starben daher alle Explantate ab und zeigten keine Regeneration.

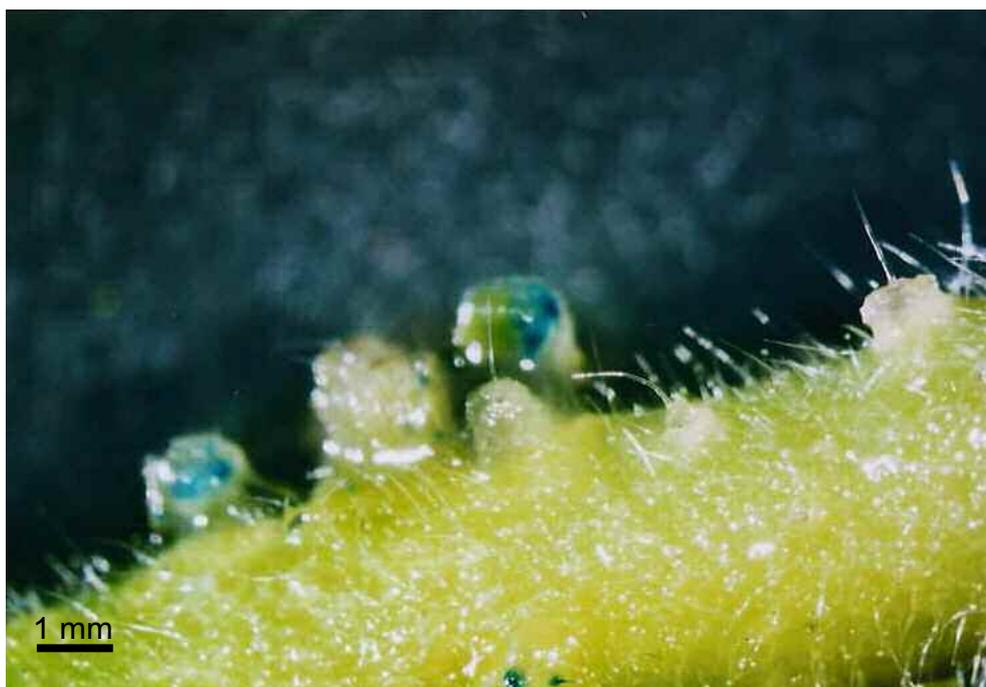


Abbildung 18: globuläre Embryonen mit blauer GUS-Färbung



Abbildung 19: Petiolen-Explantat mit exprimiertem GUS-Konstrukt nach Lagerung in Ethanol

Die Wirkung einer kurzen Lagerung eines Petiolen-Explantates in 70 %igem Ethanol ist in Abbildung 19 zu sehen. Durch den Alkohol ist das Chlorophyll zerstört worden und somit die blaue GUS-Färbung deutlicher zu erkennen. Die blauen Farbpunkte treten vor allem im Endbereich des Explantates auf, da diese ja sternförmig in der Petrischale angeordnet wurden und der Wirkungskreis der Genkanone vor allem diese Bereiche traf.

4. Diskussion

4.1. Einfluss des Pflanzenmaterials

Wie schon aus anderen Arbeiten bekannt (HÄNSCH 1999, MARSOLAIS et al. 1991, CROKE and CASSELLS 1997) scheint die Auswahl eines geeigneten Genotyps der wichtigste Faktor zur sicheren Induktion somatischer Embryonen zu sein.

Bei den hier untersuchten 25 Sorten (Versuch 3.1.1.) zeigten sich starke Unterschiede sowohl zwischen den Sorten als auch bezüglich der verwendeten Explantat-Arten (vgl. Diagramm 1). Bei erster Betrachtung zeigen sich folgende Tendenzen:

Die höchsten Ergebnisse lieferten Knospen-Explantate, gefolgt von Blütenstandstiel-Explantaten. Die jeweiligen Höchstwerte bildeten sich bei den einzelnen Sorten jedoch auf unterschiedlichen Explantat-Arten.

Tabelle 25: Ergebnisse von Versuch 3.1.1., geordnet nach Züchtergruppen mit jeweiligem Minimum- und Maximum-Wert

Serie/Typ	Explantatart (somat. Embryonen/Explantat)					
	Petiole		Blütenstandstiel		Knospe	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Kompakt	0,04	1,46	0,04	1,48	0,16	4,76
Mittel	0,02	0,12	0,08	0,08	0,66	1,88
Dunkellaubig	0	0,86	0	0,74	0,26	2,38
Quality	0	0,14	0,10	4,34	0,96	2,32
Tempo	0	0	0	0	0,08	1,62
Dark line	0,12	0,12	0,10	0,10	0,56	0,56
Saxonia	0,10	0,58	0,24	1,14	2,10	8,68

Unter Berücksichtigung der Züchter-Serien (Siehe Tabelle 24) konnte festgestellt werden, dass vor allem die Sorten der Kompakt-Serie von Fischer pelfi sehr unterschiedliche Ergebnisse lieferte. Bei der Dunkellaubigen Serie von Fischer pelfi zeigten sechs von acht Sorten die höchste Anzahl somatischer Embryonen pro Explantat an Knospen-Explantaten. Die Quality-Serie von Elsner pac hingegen

reagierte stärker mit Blütenstandstiel-Explantaten und die beiden Saxonia-Sorten lieferten mit Knospen-Explantaten bessere Ergebnisse.

Allgemein gültige Aussagen über die Explantat-Art können also nicht getroffen werden, der Einfluss der Sorte ist zu groß. So war auch die Differenz zwischen den einzelnen Sorten sehr groß. Bei den Knospen-Explantaten (die das höchste Ergebnis lieferten) variierten die Zahlen zwischen 0,08 und 8,68 somatischen Embryonen/Explantat.

Bei dieser Art der Explantate zeigten sich jedoch auch einige Nachteile. So war die Überlebensrate der Explantate nur 87,68 % im Vergleich zu Blütenstandstielen, die zu 99,52 % überlebten (vgl. Tabelle 3). Außerdem kam es bei den Knospen-Explantaten nach ca. 3 Wochen in vitro Kultur zu einer verstärkten Kallusbildung, so dass eine indirekte somatische Embryogenese mit eventueller somaklonaler Variation nicht ausgeschlossen werden konnte. In der weiteren Entwicklung der Embryonen, sowohl auf dem Explantat als auch nach Isolierung davon zeigten sich zum Teil erhebliche Entwicklungsstörungen. Ein Großteil der Embryonen zeigte ein vitrifiziertes Wachstum oder abnorme Blattbildungen.

Aufgrund dessen wurde in den folgenden Versuchen verstärkt mit Blütenstandstiel-Explantaten gearbeitet, da sich hier eine höhere Überlebensrate zeigte (99,52 %). Es kam kaum zu Kallusbildung an den Explantaten und die Embryonen zeigten einen wesentlich besseren Entwicklungsverlauf. Die besten Sorten waren hier die drei 'Perlenkette'-Sorten von Elsner pac, von denen 'Perlenkette Scarlet' aufgrund ihrer starken Bildung somatischer Embryonen pro Explantat (4,34) in den meisten folgenden Versuchen verwendet wurde.

Relativ schwache Ergebnisse lieferten hingegen die Petiolen-Explantate. Bei der Sorte 'Kardino 2002' konnten mit dieser Explantat-Art höchste Ergebnisse erzielt werden. Im Vergleich zu Blütenstandstiel-Explantaten von 'Perlenkette Scarlet' jedoch sehr viel weniger. Zum Vergleich mit der Literatur (KRISHNARAJ et al. 1997, MARSOLAIS et al. 1991, CROKE und CASSELLS 1997) wurde aber in vielen Versuchen auch mit Petiolen-Explantaten gearbeitet, da diese Explantat-Art nach den Hypokotylen, die meist verwendete ist.

Verglichen mit bereits existierenden Arbeiten konnten in vorliegender Arbeit jedoch wesentlich größere Mengen an somatischen Embryonen induziert werden. So erzielte z.B. HÄNSCH 1999 die höchste Anzahl somatischer Embryonen/regeneriertem Explantat von 0,47 mit der Sorte 'Perlenkette Orange'. In dieser Arbeit wurde ein

Maximalwert von 8,68 somatischen Embryonen/Explantat mit Knospen-Explantaten der Sorte 'Saxonia Orange' bei herkömmlicher Kultur in Petrischalen erreicht (Kapitel 3.1.1.). Wurde mit dem System in RITA-Gefäßen gearbeitet (Induktion in Petrischalen, Expression in RITA-Gefäßen), so ließen sich bei Blütenstandstiel-Explantaten von 'Perlenkette Scarlet' sogar 12,23 somatische Embryonen/Explantat erzielen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Fähigkeit zur Bildung somatischer Embryonen stark auf den Genotyp bezogen ist. Dies bestätigt sich neben der großen Variation der Ergebnisse bei den unterschiedlichen Sorten, vor allem auch bei Betrachtung der Sortengruppen, die zum Teil ähnliche Reaktionen auf die Induktion zeigten. Zur Etablierung eines Systems zur Produktion somatischer Embryonen sollte also auf eine geeignete Sortenwahl geachtet werden, die sich evtl. durch gezielte Kreuzungen züchterisch noch vergrößern lässt. Die Vermehrbarkeit über somatische Embryonen muss dabei ein Selektionskriterium sein. Bei Gerbera z.B. ist es mittlerweile so, dass die Eignung zur in vitro Vermehrung ein wichtiges züchterisches Kriterium ist.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Darstellung der Versuche in dieser Arbeit nicht chronologisch erfolgte, sondern thematisch. Ergebnisse aus zuvor erläuterten Versuchen sind also nicht unbedingt in die folgenden mit eingeflossen, da die Versuche nicht zwingend nacheinander abgelaufen sind. Daraus ergibt sich die unterschiedliche Sortenwahl bei den Versuchen. Es wurde neben der „Standortsorte“ 'Perlenkette Scarlet' jedoch versucht, ein breites Spektrum an Sorten abzudecken. Hinzu kommt, dass es aus technischen Gründen nicht immer möglich war, alle Sorten zum gleichen Zeitpunkt zur Explantatentnahme zu verwenden (z.B. Rückschnitt einiger Sorte).

Die Auswahl einer geeigneten Explantat-Art ist ebenso wichtig für eine erfolgreiche Induktion somatischer Embryonen.

Die meisten Veröffentlichungen über somatische Embryogenese bei *Pelargonium* beschäftigen sich mit der Induktion an Hypokotyl- oder Kotyledonen-Explantaten (HUTCHINSON et al. 1996 a und 1997, HUTCHINSON und SAXENA 1996 a und b, MURTHY et al. 1999), die vor allem mit Thidiazuron sehr gute Ergebnisse liefern.

Bei adulten Pflanzen wurden vor allem an Blattstielen (Petiolen) versucht, somatische Embryogenese auszulösen (MARSOLAIS et al. 1991, KRISHNARAJI et al. 1997).

Nur HÄNSCH (2001) beschäftigte sich auch mit anderen Explantat-Arten wie Blütenknospen, Blütenstandstielen, Meristemspitzen und Samenanlagen.

Entgegen der Erwartung lieferten die Petiolen relativ schlechte Ergebnisse bei der Bildung somatischer Embryonen in diesem Versuch, obwohl sie in der Literatur relativ häufig verwendet wurden. Zum Vergleich mit anderen Ergebnissen wurden Petiolen-Explantate jedoch in den weiteren Versuch fast immer mit verwendet.

Im Gegensatz zu HÄNSCH (2001) wurden hier sehr gute Ergebnisse mit Blütenstandstielen und Blütenknospen erzielt. Zu erklären ist dies bei den Knospen-Explantaten vielleicht dadurch, dass bei vorliegender Arbeit die Explantate längs auf das Medium gelegt wurden und nicht aufrecht. Dies ermöglichte dann den sich hauptsächlich am Knospenstiel entstehenden somatischen Embryonen eine bessere Entwicklung.

Auch Internodien zeigten eine hohe Bildung von somatischen Embryonen, wurden jedoch in weiteren Versuchen nicht mehr verwendet, da sie durch den großen Anteil an der Pflanze zu einer schnellen Minimierung des Ausgangsmaterials für folgende Versuche geführt hätten.

Aufgrund der schlechten Überlebensrate der Knospen-Explantate wurden Petiolen- und Blütenstandstiel-Explantate zu den Standard-Explantaten für die folgenden Versuche.

Die Wahl der Explantate ist entscheidend für eine erfolgreiche Induktion von somatischen Embryonen. Jede Pflanzenart bildet jedoch an anderen Explantaten somatischen Embryonen. Nur vereinzelt findet man Pflanzenarten, wie z.B. Karotten oder Tabak, die in der Lage sind, aus fast jedem Explantat-Gewebe somatische Embryonen hervorzubringen (BAJAJ 1995). Grundsätzlich bilden sich somatische Embryonen bevorzugt an embryogenem (Kotyledonen oder Hypokotyl) oder physiologisch jungem Pflanzengewebe. Somatische Embryogenese scheint ein Prozess zu sein, der davon abhängig ist, welchen Entwicklungsstand das Gewebe besitzt, an dem diese induziert wird. Verbunden mit dem Entwicklungsstand sind unterschiedliche Genexpressionen (LITZ, 1993). Bei den hier bearbeiteten Stecklingspelargonien steht jedoch kein embryogenes Gewebe zur Verfügung, so

dass bei den hier entnommenen Explantaten darauf geachtet wurde, zumindest physiologisch junges Gewebe zu entnehmen.

Bei Petiolen und Blütenstandstielen zeigte sich, dass es entscheidend für eine starke Bildung somatischer Embryonen war, aus welchem Bereich der Pflanze das Explantat stammte.

Die Wachstumsphase des entsprechenden Zellverbandes scheint dafür verantwortlich zu sein. Ein Bereich, der sich stärker im Wachstum befindet (z.B. der blattnahe Bereich einer Petiole), der also aus sehr jungen und teilungsaktiven Zellen besteht, scheint auch besser in der Lage zu sein, somatische Zellen in Embryonen umzuwandeln.

Bei den Petiolen wurde schon in Vorversuchen festgestellt, dass besonders diejenigen von jungen Blätter der obersten Nodien besonders hohe Mengen an somatischen Embryonen ausbilden. Eine Erkenntnis, die z.B. auch BAKER und WETZSTEIN 1998 mit Blattfiedern von Erdnüssen (*Arachis hypogaea* L.) machten. Hier sind die Blattfiedern einer Größe von 5-6 mm die bestregenerierendsten. Je größer und damit älter die Blätter werden, desto weniger somatische Embryonen bilden sie.

Der bei den Petiolen am besten regenerierende Bereich ist der blattnächste. Hier ist schon bei der Inkulturnahme zu beobachten, dass es sich um das weichste und damit jüngste Gewebe handelt.

Blattspreiten scheinen bei Pelargonium nicht zur Induktion somatischer Embryonen geeignet zu sein. Ähnliche Beobachtungen wurden z.B. auch bei *Begonia gracilis* gemacht (CASTILLO und SMITH 1997). Petiolen-Explantate reagierten im Vergleich zu Blattspreiten-Explantaten mit der Bildung wesentlich größerer Mengen somatischer Embryonen.

Der Einfluss der Jahreszeit auf die Ausgangspflanzen ist ebenfalls entscheidend für die Anzahl gebildeter somatischer Embryonen an den entnommenen Explantaten. Die Ausgangspflanzen sind im Gewächshaus diversen Umwelteinflüsse ausgesetzt (Licht, Temperatur, usw.). Diese wirken sich auf den physiologischen Zustand des Gewebes aus, auf dem dann somatische Embryonen induziert werden. Dieser Einfluss scheint jedoch auch abhängig von der Sorte zu sein und jeweils andere Verläufe zu zeigen. Unabhängig von der Anzahl gebildeter somatischer Embryonen,

die grundsätzlich bei 'Perlenkette Scarlet' sehr viel höher als bei 'Tango Dark Red' war, zeigten sich andere jahreszeitliche Verläufe.

Die bei den meisten Pflanzenarten typische Reaktion, dass im Sommer oft eine schlechtere oder schwächere Regeneration auftritt (GEORGE 1993), bestätigte sich nur bei der Sorte 'Perlenkette Scarlet'. 'Tango Dark Red' hingegen zeigte einen fast entgegengesetzten Verlauf mit einer Höchstzahl gebildeter somatischer Embryonen im Sommer.

Ein direkter Vergleich des Einflusses der unterschiedlichen Umweltbedingungen auf die Ausgangspflanzen bot sich durch die untersuchte Pflanzen-Herkunft. Im Vergleich zu den unter sommerlichen Bedingungen gehaltenen Gewächshauspflanzen wurde auch mit kühler und lichtärmer gehaltenen Klimakammerpflanzen gearbeitet. Eine eindeutige Aussage lies sich bei Versuchsende aber nicht treffen. Auch hier zeigten sich Sortenunterschiede, selbst innerhalb der „Quality“-Sortengruppe ('Perlenkette Scarlet' und 'Perlenkette Orange'). So zeigten z.B. Blütenstandstiele von 'Perlenkette Scarlet' eine größere Anzahl somatischer Embryonen an Explantaten aus dem Gewächshaus, während bei Blütenstandstiel-Explantaten von 'Perlenkette Orange' mehr somatische Embryonen an Klimakammer-Explantaten gebildet wurden. Eine allgemein gültige Aussage kann jedoch anhand dieser Ergebnisse nicht getroffen werden. Der Einfluss der Umweltbedingungen scheint nicht signifikant zu sein und vor allem einem Sorteneinfluss zu unterliegen. Auch wenn eine, abhängig von der Jahreszeit, unterschiedliche Reaktion nachgewiesen wurde (Kapitel 3.1.4.), so lässt sich diese durch Simulation von Umweltbedingungen in einer Klimakammer nicht hervor rufen. Möglich ist auch, dass solch komplexe Umweltbedingungen, wie sie während einer Jahreszeit auf die Ausgangspflanzen einwirken, nicht in einer Klimakammer nachzuvollziehen sind. Hier müssten technisch besser ausgestattete Systeme zur Simulation des Klimas genutzt werden, um eventuell eine bessere Reaktion der Explantate auf die Induktion von somatischen Embryonen hervorzurufen.

Beim Testen des Einflusses vom Alter der Ausgangspflanzen zur Explantatentnahme auf die Bildung somatischer Embryonen konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Bei alleiniger Betrachtung von Diagramm 8 brachten die Explantate, die älteren Pflanzen entnommen wurden jedoch eine leicht höhere Anzahl somatischer Embryonen hervor. Eine Beobachtung, die so nicht zu erwarten

gewesen wäre, da die Pflanzenorgane selbst (z.B. Petiolen und Blütenstandstiele) an jeder Pflanze, egal welchen Alters, die gleiche Entwicklungsdauer und damit gleiches physiologisches Alter besitzen. Die Unterschiede sind jedoch relativ gering und statistisch nicht belegbar.

Die Überlegung, dass eine Etiolierung der Ausgangspflanzen zu einer höheren Anzahl somatischer Embryonen führen würde, wie es bei Hypokotylen der Fall ist, bestätigte sich nur bedingt. Die signifikante Verbesserung an Petiolen-Explantaten erwies sich nur an einer der beiden Sorten, bei 'Tango Dark Red'. Bei 'Perlenkette Scarlet', die ansonsten eine gut reagierende Sorte ist, konnte jedoch keine Steigerung der Anzahl somatischer Embryonen beobachtet werden. Die Behandlung (Etiolierung), die bei Hypokotyl-Explantaten zu einer gesteigerten Bildung von somatischen Embryonen führt, ließ sich auf Explantate von adulten Pflanzen nicht ohne weiteres übertragen. Eine erfolgsbringende Etiolierung ist abhängig von der Sorte und muss bei geeigneten Genotypen getestet werden. Je nach Sorte kann dies dann in das Induktions-Verfahren zur somatischen Embryogenese aufgenommen werden.

Entgegen der Erwartung zeigten sich bei Petiolen-Explantaten keine Unterschiede zwischen Gewächshausmaterial und Explantaten, die von Pflanzen aus somatischen Embryonen entnommen wurden. Bei Blütenstandstiel-Explantaten war es sogar so, dass Stecklingspflanzen signifikant mehr somatische Embryonen auf ihren Explantaten bildeten als Explantate von Pflanzen, die bereits aus somatischen Embryonen entstanden sind. Die Fähigkeit zur Bildung somatischer Embryonen scheint zwar entschieden vom Genotyp abhängig zu sein, sich aber nicht auf einzelne Pflanzen zu konzentrieren. Durch eine Selektion von embryogen aktivem Pflanzenmaterial lässt sich die Anzahl gebildeter somatischer Embryonen nicht steigern, sie scheint sich sogar zu verringern.

4.2. Einfluss des Nährmediums

Die Zusammensetzung des Nährmediums bietet neben der Auswahl von geeignetem Pflanzenmaterial die größte Möglichkeit an Variationen.

In einigen Vorversuchen erwies sich Thidiazuron als gut geeigneter Stimulus zur Bildung somatischer Embryonen an Pflanzenmaterial von adulten Pflanzen. Da auch bei PZH-Hypokotylen vor allem mit Thidiazuron zur Induktion von somatischen

Embryonen gearbeitet wird (GILL et al. 1992, MURTHY et al. 1999, HUTCHINSON et al. 1996 b, HUTCHINSON und SAXENA 1996a, HUTCHINSON et al. 1996 a und 1997), wurde in vorliegender Arbeit hauptsächlich mit Thidiazuron gearbeitet.

Auch bei einigen anderen Pflanzenarten zeigte sich Thidiazuron als erfolgreiches Phytohormon zur Induktion somatischer Embryonen. GAIRI und RASHID, 2003 induzierten mit Thidiazuron somatische Embryonen an Karyopsen von Reis (*Oryza sativa*).

Bei Usambara-Veilchen (*Saintpaulia ionantha*) wurden 2003 von MITHILA et al. somatische Embryonen an Blatt- und Petiolen-Explantaten induziert, auch mit Thidiazuron.

Thidiazuron zählt zu den synthetischen Phenylharnstoff-Derivaten mit einer Cytokin-ähnlichen Wirkung als Phytohormon. Die Wirkungsweise ist jedoch noch unklar. Es wird vermutet, dass der hauptsächlichste Effekt in der Auslösung von Stress liegt. Zur Überwindung dieses Stress werden regenerative Entwicklungsprozesse ausgelöst, wie z.B. die somatische Embryogenese (MURCH et al. 1997). HUTCHINSON et al. 1996 b vermuten, dass Thidiazuron eine Veränderung der endogenen Auxine auslöst. Auxine sind ein wichtiger Bestandteil der Induktion von somatischer Embryogenese und oft der alleinige Auslöser für eine solche Entwicklung.

Picloram zur Induktion von somatischen Embryonen, wie es z.B. GOH et al. 1999 erfolgreich bei Wurzel-Explantaten von *Calamus manan*, einer Palmen-Art einsetzten, wurde auch bei *Pelargónium* untersucht. Ein Induktionsmedium, das nur Picloram als Phytohormon enthielt, brachte keine somatischen Embryonen hervor, sowohl bei einer Induktionsdauer von einer Woche als auch bei zwei Wochen. Auch eine Kombination von Picloram und Thidiazuron brachte keine gesteigerte Anzahl somatischer Embryonen, so dass dieses Auxin-ähnliche Phytohormon für *Pelargónium* nicht geeignet zu sein scheint, eine somatische Embryogenese einzuleiten.

Das Problem der Ausflockung beim Ansetzen der Thidiazuron-Lösung konnte nach der Durchführung eines Tests beseitigt werden. Die vier Kombinationen aus Thidiazuron-Pulver zweier verschiedener Hersteller mit zwei verschiedenen Lösungsmitteln zeigte keine signifikante Auswirkung auf die Anzahl gebildeter Embryonen. Somit konnte die Wahl von Thidiazuron und Lösungsmittel

ausschließlich aufgrund der besseren Verarbeitung getroffen werden. So wurde aus Kostengründen mit Thidiazuron der Firma Duchefa gearbeitet und dieses in KOH gelöst. Hierbei zeigten sich keine Ausflockungen, wie sie hingegen bei dem vom Hersteller empfohlenen DMSO zu beobachten waren.

Acetylsalicylsäure (ASA), wie sie als Zusatz zum Nährmedium bei Hypokotylen zur Unterstützung der somatischen Embryogenese eingesetzt wird, brachte bei Petiolen keinen signifikanten Erfolg. Je nach Sorte zeigten sich leichte Tendenzen, wie z.B. bei 'Bruni' eine leichte Steigerung der gebildeten Embryonen und bei 'Alba' und 'Schöne Helena' eine etwas geringere Anzahl gebildeter somatischer Embryonen mit steigender ASA-Konzentration. Der Einfluss war jedoch bei allen Sorten nicht signifikant. Die Ergebnisse, die HUTCHINSON und SAXENA 1996 bei Hypokotyl-Explantaten erzielten (eine Steigerung der Anzahl und eine Synchronisation gebildeter somatischer Embryonen), ließen sich mit Petiolen von *Pelargonium* nicht nachvollziehen. ASA scheint hier keinen Einfluss auf den Entwicklungsverlauf somatischer Embryonen zu nehmen, auch wenn bei beiden mit Thidiazuron induziert wurde.

4.3. Einflüsse der in vitro Kultur-Bedingungen

Die Entnahme der Explantate von den Ausgangspflanzen und die Arbeitsschritte zur oberflächlichen Keimabtötung mit anschließender Inkulturnahme stellen einen großen Stress für die Explantate dar. Eine möglichst schonende Präparationsart der Explantate wirkt sich positiv auf die Bildung somatischer Embryonen aus. Hinzugezogen werden hier noch die Erkenntnisse aus Vorversuchen, die zeigten, dass eine möglichst geringe Einwirkdauer von Alkohol und Bleichlauge mit möglichst geringer Konzentration zu einer wesentlich besseren Regeneration führt. Die Lösungen sollten aber auch stark genug sein, um alle Keime abzutöten.

Das sofortige Halbieren der Explantate war ein zu großer zusätzlicher Stress für die Explantate und führte zu einer so starken Verletzung des Gewebes, dass die Überlebensrate der Explantate zum Teil rapide sank (bei 'Perlenkette Scarlet' Petiolen sogar auf 0 %). Bei dieser Variante war bei allen Explantaten auch eine starke Phenolausscheidung zu beobachten.

Wurden die Explantate jedoch erst nach zwei Tagen halbiert, waren die Ergebnisse bei fast allen Explantaten (außer bei 'Perlenkette Scarlet' Petiolen) besser. Es

bildeten sich mehr somatische Embryonen und die Überlebensrate war optimal (nahe 100% oder 100%). Nach wie vor bildeten sich aber die meisten somatischen Embryonen auf nicht halbierten Explantaten. Die Anzahl überlebender Explantate war auch hier optimal. Das Halbieren der Explantate, auch zu einem späteren Zeitpunkt scheint ein zu großer Stress-Faktor zu sein und die Einleitung der somatischen Embryogenese zu stören. Die durch das Halbieren vergrößerte Oberfläche der Explantate, die sich außerhalb des Mediums befindet, ließ sich nicht ausreichend nutzen, so dass auf das Halbieren verzichtet werden sollte.

Stress löst allgemein Genexpressionen zur Neuorganisation von Pflanzenzellen aus, um dadurch flexibel auf die Stress-Situation reagieren zu können.

Eine andere Art von Stress wird durch Hitze ausgelöst. Der Einfluss eines Hitzeschocks zu Beginn der Kultur wurde hier untersucht. Es wurden keine signifikanten Einflüsse auf die Bildung somatischer Embryonen gefunden. Die Explantate entwickelten sich normal weiter, wie die ohne Hitzeschock-Behandlung. Es kam jedoch entgegen der Erwartungen zu keiner höheren Anzahl somatischer Embryonen. Es bieten sich aber noch zahlreiche weitere Variationsmöglichkeiten durch Temperatur oder Hitzedauer an und dies alles auch wieder sortenspezifisch.

Bei der Induktion von somatischer Embryogenese können Signal-Moleküle eine stimulierende Wirkung ausüben. Hier seien Endochitinase, Arabinogalactan-Proteine oder Lipochitooligosaccharide genannt (VON ARNOLD 2002). Stoffe wie diese, die von embryogenen Kulturen ans Nährmedium abgegeben werden, können wiederum die embryogene Entwicklung anderer Kulturen, die sich auch auf diesem Medium befinden, auslösen.

Zu diesem Zweck wurden Hypokotyl-Explantate, die eine sichere somatische Embryogenese zeigen, gemeinsam mit Petiolen-Explantaten kultiviert. Es kam jedoch zu keinem förderlichen Effekt durch die embryogenen Hypokotyl-Explantate. Verbesserungsmöglichkeiten ergeben sich in der Art der Co-Kultur: Denkbar wäre eine zeitlich verschobene Kultur, so dass die Petiolen-Explantate auf die gleichen Positionen des Nährmediums gegeben werden könnten, auf denen zuvor die Hypokotyl-Explantate gelegen haben. Eine weitere Möglichkeit würde sich in der Co-Kultur im Flüssig-Medium ergeben, so dass für eine bessere Verteilung der Signal-Moleküle gesorgt werden könnte.

4.4. Isolierung und Überführung ins GWH

Die Überführung der somatischen Embryonen verlief erfolgreich. Von den insgesamt 90 isolierten somatischen Embryonen entwickelten sich 80 zu vollständigen Pflanzen, was 88,89 % entspricht. Sie zeigten im Vergleich zu „normalen“ Sämlingen einen identischen Entwicklungsverlauf.

Auch die Blühphase wurde zeitgleich mit Sämlingen erreicht. Bei der Blüte selbst zeigten sich keine Abweichungen hinsichtlich sortenspezifischer Blütenfarbe und Pflanzenhabitus.

Sind somatische Embryonen also erst einmal erfolgreich induziert worden, scheint eine Isolierung vom Ausgangsmaterial und eine Überführung in das Gewächshaus kein großes Problem mehr darzustellen. Es muss allerdings bei der Isolierung selbst darauf geachtet werden, ein, wie oben beschrieben ausreichend weites Stadium abzuwarten, so dass sich das Problem der Verletzung bei der Entnahme auf ein Minimum reduziert.

4.5. Anwendungsbereiche

4.5.1. Flüssigkultur (RITA-Gefäße)

Die Eignung von RITA-Gefäßen Bildung somatischer Embryogenese in Flüssigkultur erwies sich in den durchgeführten Versuchen.

Sowohl Hypokotyle als auch Petiolen, Blütenstandstiele und Knospen zeigten die höchste Anzahl gebildeter somatischer Embryonen bei einer kombinierten Kultur von Induktionsphase auf festem Medium (Petrischale) und Expression in Flüssigkultur (RITA-Gefäße). Während Hypokotyl-Explantate jedoch am schlechtesten auf reine Petrischalen-Kultur reagierten, bildeten sich bei Explantaten von adulten Pflanzen (Petiolen, Blütenstandstiele und Knospen) die wenigsten somatischen Embryonen bei einer reinen Flüssigkultur in RITA-Gefäßen.

Somatische Embryogenese in RITA-Gefäßen wurde unter anderem bei *Coffea arabica* (ETIENNE-BARRY et al. 1999) und *Citrus deliciosa* (CABASSON et al. 1997) beschrieben.

Allgemein wurde bei sogenannten „temporary immersion systems“ beobachtet, dass sich eine Kultur in diesen durch eine höhere Qualität des Pflanzenmaterials, einer höheren Anzahl morphologisch normaler somatischer Embryonen und einer besseren Akklimatisierung der Pflanzen nach der in vitro Kultur auszeichnet. Hinzu

kommen stark reduzierte Produktionskosten durch Reduktion von Arbeitszeit und Platz (ETIENNE und BERTHOULY 2002).

Bei *Coffea arabica* (ETIENNE-BARRY et al. 1999) wurde eine Verdopplung der gebildeten somatischen Embryonen aus embryogenem Kallus in einer Kultur mit RITA-Gefäßen im Vergleich zur Kultur in Agar-haltigem Medium beschrieben. In vorliegender Arbeit wurde bei Hypokotyl-Explantaten und Blütenstandstiel-Explantaten von *Pelargonium* ca. die dreifache Menge somatischer Embryonen erzeugt bei einer gemischten Kultur (Induktion in Petrischalen, Expression in RITA-Gefäßen) im Vergleich zu einer Kultur in Petrischalen.

Die Embryonen bildeten sich auf der gesamten Oberfläche der Explantate und lösten sich nach einiger Zeit auch von den Explantaten ab. Das Anstauen des Nährmediums führte dazu, dass sich die Explantate immer wieder drehten und diese Bewegungen führten zum Ablösen der Embryonen. An diesen abgelösten Embryonen ließen sich teilweise auch Wurzeln beobachten.

Der Ansatz, der beim Versuch zur Präparationsart zugrunde lag war, durch das Halbieren der Explantate die Oberfläche zu vergrößern und damit mehr somatische Embryonen zu erzeugen. Sie erwies sich dort als nicht realisierbar, da zu wenig Embryonen gebildet wurden und die Explantate eine zu geringe Überlebensrate zeigten. In der Flüssigkultur bot sich der Vorteil, die Explantate nicht zusätzlich verletzen zu müssen und trotzdem die gesamte Oberfläche zur Induktion somatischer Embryonen nutzen zu können.

Das oft beschriebene Problem der Flüssigkultur, dass es zu einer Vitrifikation des Pflanzenmaterials durch zu geringe Sauerstoff-Zufuhr kommt, ließ sich bei dem untersuchten System der RITA-Gefäße nicht beobachten. Die Explantate werden hier ja nur kurzzeitig mit Medium umspült und dies auch unter zusätzlicher Luft-Zufuhr.

Das untersuchte System bietet großes Potential zur Produktion somatischer Embryonen. Nach Auswahl aller anderen optimalen Bedingungen (Genotyp, Pflanzenmaterial, Nährmedium) bietet sich durch Optimierung der Anstaubedingungen (Dauer, zeitliche Abstände) eine Möglichkeit, die Anzahl gebildeter somatischer Embryonen um ein vielfaches zu steigern.

4.5.2. Transformation mit der Genkanone

Ansätze zum direkten Gentransfer mit der Genkanone wurden in vorliegender Arbeit durchgeführt. Der breite Bereich der Transformation wurde hier nur angerissen, um anhand der Genkanone ein Beispiel für einen Einsatzbereich somatischer Embryogenese bei *Pelargónium* aufzuzeigen. Die Genkanone bot sich hier an, da am Lehrstuhl zeitgleich einige Versuche damit durchgeführt wurden und dadurch Erfahrung mit der Handhabung vorhanden waren.

Zur erfolgreichen Transformation ist vor allem die Regenerierbarkeit des pflanzlichen Gewebes wichtig. Aus diesem Grund bieten sich vor allem somatische Embryonen sehr gut an, weil sie, einmal induziert, zu vollständigen Pflanzen regenerieren.

Im durchgeführten Versuch ließ sich nach Beschuss der zur somatischen Embryogenese induzierten Explantate keine Pflanze regenerieren. Die GUS-Färbung zeigte jedoch, dass sich das entsprechende Konstrukt zumindest transient, also kurzzeitig exprimiert. Durch die nicht vorhandene Regeneration des Pflanzenmaterials zeigte sich jedoch, dass es zu keiner stabilen Transformation mit dem Hygromycin-Selektionsmarker gekommen war.

Transformation bei *Pelargónium* wird zum größten Teil mit *Agrobacterium tumefaciens* als Vektor durchgeführt. Dieses Bodenbakterium ist in der Lage, Gene, die sich auf seinem Plasmid befinden, in das Genom der Pflanzenzelle einzuschleusen.

So beschrieben z.B. KRISHNARAJ et al. 1997 die erfolgreiche stabile Transformation von somatischen Embryonen bei der Duft-Geranium Sorte 'Frensham'. Diese an Petiolen-Explantaten induzierten somatischen Embryonen wurden mit einem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm co-kultiviert und zu Pflanzen regeneriert.

Literatur über erfolgreiche Transformation mit der Genkanone bei *Pelargónium* existiert nicht. In diesem System bieten sich jedoch einige Vorzüge. So kann bei einer Regeneration über somatische Embryogenese, das häufig beschriebene Problem der Chimärenbildung ausgeschlossen werden, da sich somatische Embryonen ja nur aus einer somatischen Zelle bilden. Chimäre Pflanzen, die z.B. über Sprosse regeneriert wurden, entstehen aus einem Zellverband und dieser enthält nur zum Teil transformierte Zellen. Die Transformation muss bei somatischen Embryonen dann aber in einem sehr frühen Stadium (vor dem globulären) erfolgen, so dass wirklich die einzelnen somatischen Zellen getroffen werden, was in vorliegendem Versuch durchgeführt wurde.

Die Problematik der großen Explantat-Mengen, die zu bearbeiten sind, zeigte sich in diesem Versuch sehr deutlich. Die insgesamt 120 beschossenen Explantate reichten nicht aus, um eine stabile Transformation bei einem somatischen Embryo zu erzielen.

Trotzdem bietet sich hier eine alternative Methode zur Transformation mit *Agrobacterium*, um direkten Gentransfer bei *Pelargonium* durchzuführen. Zu beachten ist jedoch die ausreichend große Menge an Explantaten und einen frühen Entwicklungszeitpunkt der somatischen Embryonen um Chimären auszuschließen.

5. Zusammenfassung

Die somatische Embryogenese bei *Pelargonium* ist ein interessantes Vermehrungsverfahren. Es bieten sich viele Einsatzbereiche für diese wirtschaftlich sehr bedeutende Zierpflanze, wie z.B. die Produktion künstlicher Samen, die Bereitstellung von Zielobjekten für Transformationen, die Kryokonservierung oder ein Modellsystem zur Untersuchung der embryonalen Entwicklung.

In dieser Arbeit wurden diverse Einfluss-Faktoren zur sicheren Induktion der somatischen Embryogenese untersucht. Die drei großen Bereiche der Einfluss-Faktoren waren: Pflanzenmaterial, Nährmedium und in vitro Kultur-Bedingungen.

Bei dem Pflanzenmaterial zeigte sich, dass der größte Einflussfaktor der Genotyp (Sorte) ist. Wichtig ist dann, von einem geeigneten Genotyp gut regenerierende Explantate zu entnehmen. Dies können jedoch je nach Sorte unterschiedliche Explantate sein. Allgemein eignen sich Blütenstandstiele bei vielen Sorten sehr gut. Bei den Explantaten ist darauf zu achten, physiologisch junges Gewebe zu entnehmen. Es zeigte sich außerdem, dass die Fähigkeit zur Bildung somatischer Embryogenese jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen ist, die jedoch je nach Sorte anders ausfallen kann. Zu keiner Erhöhung der Anzahl gebildeter Embryonen führte eine Etiolierung des Ausgangsmaterials und eine Simulation der Klimabedingungen für die Ausgangspflanzen in der Klimakammer. Ebenso war es nicht möglich, geeignete Genotypen zu selektieren zum Aufbau einer Linie, die besonders viele somatische Embryonen bildet.

Beim verwendeten Nährmedium zur Induktion somatischer Embryonen erwies sich das Cytokinin-ähnliche Phytohormon Thidiazuron als geeigneter Stimulus bei adultem Ausgangsgewebe in einer Konzentration von 10 μM . Acetylsalicylsäure, wie sie bei Hypokotylen-Explantaten zur Synchronisation und Steigerung der Anzahl gebildeter somatischer Embryonen verwendet wird, zeigte sich bei Explantaten von adulten Pflanzen als nicht wirkungsvoll.

Die untersuchten Einfluss-Faktoren bei der in vitro Kultur brachten keine positiven Effekte. Weder ein Hitzeschock zu Beginn der Kultur noch eine Co-Kultur mit embryogenen Hypokotyl-Explantaten konnte die Anzahl somatischer Embryonen steigern. Ein Halbieren der Explantate zur Oberflächenvergrößerung brachte sogar einen negativen Effekt durch starkes Absterben der Explantate.

Eine Isolierung somatischer Embryonen und die anschließende Überführung in Gewächshaus-Bedingungen war jedoch erfolgreich.

Es wurden zwei Anwendungsbereiche für somatische Embryonen behandelt. Eine Transformation mit der Genkanone brachte transiente (kurzfristige) Expressionen des miteingeführten Marker-Gens (GUS-Gen-Konstrukt mit Hygromycin-Selektionsmarker). Eine Regeneration auf Hygromycin-haltigem Nährmedium und damit eine stabile Transformation lies sich bei den bearbeiteten Explantaten nicht nachweisen. Als erfolgreich zeigte sich dagegen die Verwendung von Flüssigkulturen in sogenannten RITA-Gefäßen. Bei diesem kurzzeitigen Anstauverfahren konnte eine Steigerung der gebildeten somatischen Embryonen erzielt werden.

Die somatische Embryogenese bietet ein großes Potential als modernes biotechnologisches Vermehrungsverfahren bei *Pelargonium*. Nach Auswahl geeigneter Genotypen (der stärkste Einfluss-Faktor) und der dabei geeignetsten Explantat-Art, lassen sich mit Thidiazuron somatische Embryonen erzielen. Zu beachten ist dabei noch das physiologische Alter der Explantate und die für diesen Genotypen geeignetste Jahreszeit. Wenn dieses System dann noch in Bioreaktoren, wie z.B. den RITA-Gefäßen abläuft, kann ein praxistaugliches System zur Induktion somatischer Embryonen erstellt werden.

6. Summary

Somatic embryogenesis with *Pelargonium* is an interesting propagation system. There are a lot of applications of somatic embryos for this economically important ornamental crop. For example the production of artificial seeds, target material for transformation or a model system for embryogenic development.

Different influences on the induction of somatic embryogenesis were tested. There are three main fields: plant material, culture medium and in vitro culture conditions. Concerning the plant material, the genotype (cultivar) has the highest influence. Furthermore it is important to take explants with a good regeneration rate of a suitable genotype. Depending on the cultivar, it could be a different explant type. In general, a lot of cultivars showed the highest number of somatic embryos with peduncle explants. While taking the explants, it is important to look for physiological young tissue. The ability to produce somatic embryos depends on the season but this influence could be different for each cultivar. Neither the etiolation of the source plants, nor the simulation of their climate in a climate chamber increased the number of somatic embryos. The selection of regenerating genotypes to build up a culture line that produces a lot of somatic embryos wasn't successful.

The cytokinin-like plant hormone Thidiazuron was used in the induction medium. With a concentration of 10 μM it induced somatic embryogenesis on explants from vegetatively propagated plants. Acetylsalicylic acid, which enhances and synchronizes somatic embryogenesis in hypocotyl cultures, wasn't effective on explants of adult plants.

The examined influences of the in vitro culture conditions had no effect. Neither a heat shock at the beginning of the culture, nor a co-culture with embryogenic hypocotyl explants could increase the number of somatic embryos. To enlarge the surface of the explants by halving them had a negative effect, because a lot of the explants died.

An isolation of the somatic embryos and subsequent acclimatisation under greenhouse conditions was successful.

Two applications for somatic embryos were tested. A transformation with the "gene gun" resulted in transient gene expression of the GUS gene with the Hygromycin marker. A regeneration on a culture medium with Hygromycin, showing a stable transformation, was not possible.

But using a liquid medium in RITA-vessels was successful. The effect of this temporary immersion system was an increase of the somatic embryo formation.

There is a high potential in somatic embryogenesis of *Pelargonium* as a modern biotechnological propagation system. With suitable genotypes and explants an induction with thidiazuron is successful. Also the physiological age of the explant and a suited season for this genotype has to be considered. A temporary immersion system like RITA can successfully be used to induce somatic embryos.

7. Literaturverzeichnis

- AMMIRATO P.V., EVANS D.A., SHARP W.R. und BAJAJ Y.P.S.** (1990) Handbook of plant cell culture, Volume 5, Ornamental Species. McGraw-Hill Publishing Company, New York
- BAJAJ Y.P.S** (1995) Biotechnology in Agriculture and Forestry 31: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed, Band I und II. Springer-Verlag, Berlin
- BAKER C.M. und WETZSTEIN H.Y.** (1998) Leaflet development, induction time and medium influence somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Reports 17: 925-929
- BHOJWANI S.S. und RAZDAN M.K.** (1983) Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier Amsterdam
- BROCKHAUS ENZYKLOPÄDIE** (1988) Bd. 6 und 20, 19. Auflage
- CABASSON C., ALVARD D., DAMBIER D., OLLITRAULT P. und TEISSON C.** (1997) Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 33-37
- CARIMI F., DE PASCALE F. und CRESCIMANNO F.G.** (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. Plant Cell Reports 18: 935-940
- CASTILLO B. und SMITH M.A.L.** (1997) Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. Plant Cell Reports 16: 385-388
- CASSELLS A.C.** (1979) The effect of 2,3,5-Triiodobenzoic Acid on caulogenesis in callus cultures of tomato and *Pelargonium*. Physiologia Plantarum 46: 159-164
- CHANG C., MOLL B.A., EVERSON K.B. und GULTINAN M.J.** (1996) In vitro plantlet regeneration from cotyledon, hypocotyls and root explants of hybrid seed geranium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 61-66
- CHEN H.R. und GALSTON A.W.** (1967) Growth and development of *Pelargonium* pith cells in vitro. II. Initiation of organized development. Physiologia Plantarum 20: 533-539
- CROKE J.T. und CASSELLS A.C.** (1997) Dark induktion and genetic stability of somatic embryos of Zonal geraniums (*Pelargonium x hortorum* Bailey). Angewandte Botanik 71: 119-124

-
- DEBERGH P. und MAENE L.** (1977) Rapid clonal propagation of pathogen-free *Pelargonium* plants starting from shoot tips and apical meristems. *Acta Horticulturae* 78: 449-454
- DESILETS H., DESJARDINS Y. und BELANGER R.R.** (1993) Clonal propagation of *Pelargonium x hortorum* through tissue culture: Effects of salt dilution and growth regulator concentration. *Canadian Journal of Plant Science* 73: 871-878
- ETIENNE H. und BERTHOULY M.** (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215-231
- ETIENNE-BARRY D., BERTRAND B., VASQUEZ N. und ETIENNE H.** (1999) Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19: 111-117
- GAIRI A. und RASHID A.** (2004) TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 29-33
- GEORGE F.** (1993) *Plant propagation by tissue culture*, Vol. 1. Exegetis, GB
- GILL R., GERRATH J.M. und SAXENA P.K.** (1993) High-frequency direct somatic embryogenesis in thin layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*). *Canadian Journal of Botany* 71:408-413
- GILL R., SENARATNA T und SAXENA P.K.** (1994) Thidiazuron-induced somatic embryogenesis enhances viability of hydrogel-encapsulated somatic embryos of geranium. *Journal of Plant Physiology* 143: 726-729
- GOH D.K.S., MICHAUX-FERRIÈRE N. MONTEUUIS O. und BON M.-C.** (1999) Evidence of somatic embryogenesis from root tip explants of the rattan *Calamus manan*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 35: 424-427
- GUHA S. und MEHESHWARI S.C.** (1964) In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497
- HAENSCH K.-T.** (1999): Somatic embryogenesis in vitro from adult plants of *Pelargonium*: Influence of genotype and basal medium. *Gartenbauwissenschaft* 64 (5): 193-200
- HEß D.** (1992) *Biotechnologie der Pflanzen*. Ulmer, Stuttgart
- HILDEBRANDT V. und HARNEY P.M.** (1988) Factors affecting the release of phenolic exudates from explants of *Pelargonium x hortorum* Bailey Springer Scarlet. *Journal of Horticultural Science* 63: 651-657

-
- HORN W.** (1996) Zierpflanzenbau. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
- HUTCHINSON M.J., KRISHNARAJ S. und SAXENA P.K.** (1996 a) Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. International Journal of Plant Science 157 (4). 440-446
- HUTCHINSON M.J., KRISHNARAJ S. und SAXENA P.K.** (1997) Inhibitory effect of GA₃ on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. Plant Cell Reports 16: 435-438
- HUTCHINSON M.J., MURCH S.J. und SAXENA P.K.** (1996 b) Morphoregulatory role of Thidiazuron: Evidence of the involvement of endogenous auxin in Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey). Journal of Plant Physiology 149: 573-579
- HUTCHINSON M.J. und SAXENA P.K.** (1996 a) Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. Plant Cell Reports 15: 512-515
- HUTCHINSON M.J. und SAXENA P.K.** (1996 b) Role of purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum*) hypocotyl cultures. Physiologia Plantarum 98: 517-522
- KRISHNARAJ S., BI Y.-M. und SAXENA P.K.** (1997) Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp. 'Frensham'). Planta 201: 434-440
- LITZ R.E.** (1993) Organogenesis and somatic embryogenesis. Acta Horticulturae 336: 199-205
- MARSOLAIS A.A., WILSON D.P.M., TSUJITA M.J. und SENARATNA T.** (1991) Somatic embryogenesis and artificial seed production in Zonal (*Pelargonium x hortorum*) and Regal (*Pelargonium x domesticum*) geranium. Canadian Journal of Botany 69: 1188-1193
- MAYER L.** (1956) Growth and organ formation of in vitro cultivated segments of *Pelargonium zonale* and *Cyclamen persicum*. Planta 47: 401-446
- MITHILA J., HALL J.C., VICTOR J.M.R. und SAXENA P.K.** (2003) Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at

- high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Plant Cell Report 21: 408-414
- MITHILA J., MURCH S.J., KRISHNARAJ S. und SAXENA P.K.** (2001) Recent advantages in *Pelargonium* in vitro regeneration systems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 1-9
- MURASHIGE T. und SKOOG F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- MURCH S. J., KRISHNARAJ S. und SAXENA P.K.** (1997) Thidiazuron-induced morphogenesis of Regal geranium (*Pelargonium domesticum*): A potential stress response. Physiologia Plantarum 101:183-191
- MURTHY B.N.S., SINGH R.P. und SAXENA P.K.** (1996) Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv Ringo Rose) cotyledonary cultures. Plant Cell Reports 15: 423-426
- MURTHY B.N.S., VETTAKKORUMAKANKAV N.N., KRISHNARAJ S., ODUMERU J. und SAXENA P.K.** (1999) Characterization of somatic embryogenesis in *Pelargonium x hortorum* mediated by a bacterium. Plant Cell Reports 18: 607-613
- NEUMANN K.H.** (1995) Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen. Stuttgart Ulmer
- ODENBACH W.** (1997) Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung. Parey Buchverlag, Berlin
- PIERIK R.L.M.** (1997) In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- PILLAI S.K. und HILDEBRANDT A.C.** (1968) Geranium plants differentiated in vitro from stem tip and callus cultures. Plant Dis. Rep. 52: 600-601
- PILLAI S.K. und HILDEBRANDT A.C.** (1969) Induced differentiation of geranium plants from undifferentiated callus in vitro. American Journal of Botany 56: 52-58
- QURESHI J.A. und SAXENA P.K.** (1992) Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) varieties. Plant Cell Reports 11: 443-448
- REDENBAUGH K., FUJII J.A. und SLADE D.** (1991) Synthetic seed technology. In: Vasil I.K. (ed.) Scale-up and automation in plant propagation. Academic Press, San Diego, 36-75
- REINERT J.** (1958) Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. Naturwissenschaften 45: 344-345

-
- ROBICHON M.-P., RENOU J.-P. und JALOUZOT R.** (1997) Plant regeneration of ivy leaved geranium through shoot organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 209-212
- SACHS L.** (1984) *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Berlin
- STANDARDI A. und PICCIONI E.** (1998) Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic in vitro-derived explants. *International Journal of Plant Science* 159 (6): 968-978
- STEWART F.C., MAPES M.O. und MEARS K.** (1958) Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *American Journal of Botany* 45: 709-713
- STRASBURGER E.** (1991) *Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- SENARATNA T., DIXON K., BUNN E. und TOUCHELL D.** (1999) Smoke-saturated water promotes somatic embryogenesis in geranium. *Plant Growth Regulation* 28: 95-99
- THORPE T.A.** (1988) in vitro somatic embryogenesis. *ISI atlas of science*: 81-88
- THORPE T.A.** (1993) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: Physiological and biochemical aspects. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.A. und TRAN THANH VAN K. (eds) *Morphogenesis in Plants* (19-38). Plenum Press New York
- VISSER C., QURESHI J.A., GILL R. und SAXENA P.K.** (1992) Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin-cytokinin requirement of somatic embryogenesis in hypocotyl cultures of geranium. *Plant Physiology* 99: 1704-1707
- VON ARNOLD S., SABALA I., BOZHOKOV P., DYACHOK J. und FILONOVA L.** (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249
- WILSON D.P.M., SULLIVAN J.A. MARSOLAIS A.A., TSUJITA M.J. und SENARATNA T.** (1996) Improvement of somatic embryogenesis in zonal geraniums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 27-32

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen danken:

Herrn Prof. Dr. Gert Forkmann für die Überlassung des Themas, seine Förderung und Begleitung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dieter Treutter für die Übernahme des Prüfungsausschuss-Vorsitzes und Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenzel für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Bernhard Hauser für die große Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und die Hilfe bei der Erstellung der statistischen Auswertungen.

Herrn Laszlo Janvari für die Hilfe bei der Durchführung des Versuches mit der Genkanone.

Den Gärtnern und Gärtnerinnen um Herrn Richard Dinkel für die sorgsame Pflege meiner Pflanzen im Gewächshaus und dem ganzen Team der Versuchsstation Dürnast für vielfältige Hilfestellungen, Unterstützung und das sehr angenehme Betriebsklima.

Meinem Vater Franz Thamer dafür, dass er mich meinen Weg hat gehen lassen und mich dabei immer unterstützt hat.

Meinem Mann Florian Klein für den starken Rückhalt und die ständige Motivation, für das Korrekturlesen und den Beistand im Kampf gegen den Computer.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Daniela Klein, geb. Thamer
 Geburtsdatum: 01.10.1973
 Geburtsort: Köln
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1980-1984 Städt. Kath. Grundschule in Köln-Nippes
 1984-1985 Städt. Gymnasium Blücherstraße, in Köln-Nippes
 1985-1988 Königin-Luise-Gymnasium in Köln
 1988-1994 Holbein-Gymnasium in Augsburg
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Berufsausbildung:

WS 1994 – SS 1999 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan
 1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Fachbereich Gärtnerische Pflanzenzüchtung:
 „Untersuchungen zur somatischen Embryogenese bei der Gattung Pelargonium“
 Abschluss: Dipl.-Ing. agr. Univ.
 05/1999 – 09/2002 Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau