

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

**Charakterisierung der Flavonoidbiosynthese und
Etablierung eines Transformationssystems bei
Rhododendron Simsii-Hybriden (Azalee)**

Wiebke Rathje

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 Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 23. 05. 2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24. 08. 2007 angenommen.

*In Gedenken an meinen Vater
Uwe Rathje*

Inhaltsangabe

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
A Einleitung	1
A.1 Blütenpigmente	1
A.2 Die Flavonoidbiosynthese	3
A.2.1 Enzyme der Flavonoidbiosynthese	6
A.2.1.1 Die Chalkonsynthase (CHS)	6
A.2.1.2 Die Chalkonisomerase (CHI)	7
A.2.1.3 Die Flavanon 3-Hydroxylase (FHT).....	7
A.2.1.4 Die Flavonoid 3'- bzw. 3'5'-Hydroxylase (F3'H / F3'5'H)	7
A.2.1.5 Die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR).....	8
A.2.1.6 Die Anthocyanidinsynthase (ANS)	8
A.2.1.7 Die Anthocyanidinreduktase (ANR)	9
A.2.1.8 Die Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (FGT).....	9
A.2.2 Transport der Flavonoide in die Zellvakuole	10
A.2.3 Multienzymkomplexe der Flavonoidbiosynthese	10
A.3 Pflanzentransformation mittels Agrobakterium.....	11
A.3.1 Das Agrobakterium	11
A.3.2 Das Ti-Plasmid.....	12
A.3.3 Der <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Gentransfer	13
A.3.4 Regeneration und Selektion transgener Pflanzenzellen.....	16
A.4 <i>Rhododendron simsii</i> Planch.....	19
A.5 Zielsetzung	20
B Material und Methoden.....	23
B.1 Material	23
B.1.1 Pflanzenmaterial	23
B.1.2 Blütenstadien	25
B.1.3 Geräte	26
B.1.4 Hersteller.....	27
B.1.5 Chemikalien, Naturstoffe und Verbrauchsmaterialien	27
B.1.6 Substrate und Radiochemikalien.....	29

B.1.7	Reaktionssysteme und Kits	29
B.1.8	Puffer und sonstige Lösungen.....	29
B.1.9	Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie	29
B.1.10	Nährmedien.....	30
B.1.10.1	Bakterien- und Hefemedien	30
B.1.10.2	Pflanzenmedien	31
B.1.11	Bakterien und Hefestämme.....	32
B.1.12	Vektoren.....	33
B.2	Methoden	34
B.2.1	Blüteninhaltsstoffanalysen	34
B.2.1.1	Extraktion und Aufbereitung der Flavonoide	34
B.2.1.2	Herstellung von Standards.....	35
B.2.1.3	Dünnschichtchromatographie und Detektion der Flavonoide.....	35
B.2.1.4	pH-Wert Messung des Blütenzellsafts	36
B.2.2	Histologische Untersuchungen der Blütenblätter	36
B.2.3	Enzymologische Untersuchungen.....	36
B.2.3.1	Enzympräparation aus Blütenmaterial	36
B.2.3.2	Heterologe Genexpression in Hefe	37
B.2.3.3	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	37
B.2.3.4	Herstellung radioaktiv markierter Substrate	37
B.2.3.5	Standardenzymtests mit radioaktiv markierten Substraten	38
B.2.3.6	Nachweis der radioaktiv markierten Flavonoide und Auswertung der Enzymtests	40
B.2.3.7	Enzymtest mit nicht radioaktiv markierten Substraten	40
B.2.3.8	Optimierung der Standardbedingungen für Enzymtests	42
B.2.3.9	Charakterisierung der Enzyme.....	43
B.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	43
B.2.4.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	43
B.2.4.2	Extraktion von genomischer DNA	44
B.2.4.3	Extraktion von Plasmid-DNA.....	44
B.2.4.4	Extraktion von Gesamt-RNA	44
B.2.4.5	Reverse Transkription.....	44
B.2.4.6	Methoden der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	45
B.2.4.7	DNA-Sequenzanalysen.....	46

B.2.5	Methoden der pflanzlichen Gewebekultur	46
B.2.5.1	Überführung der Azaleen in die Gewebekultur	47
B.2.5.2	<i>In vitro</i> -Vermehrung der Azaleen	47
B.2.5.3	Adventivsprossregeneration.....	47
B.2.5.4	Bonitur der Adventivsprossregeneration	48
B.2.5.5	Statistische Analysen	48
B.2.6	Methoden des pflanzlichen Gentransfers	49
B.2.6.1	Transformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
B.2.6.2	Nachweis des putativ transgenen Pflanzenmaterial.....	49
B.2.6.2.1	Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität	49
B.2.6.2.2	PCR-gestützter Nachweis der Transgenität	50
C	Ergebnisse	51
C.1	Flavonoidbiosynthese bei <i>Rhododendron simsii</i>	51
C.1.1	Analytische Untersuchungen der Blütenblätter	51
C.1.2	Histologische Untersuchungen der Blütenblätter	53
C.1.3	Enzymologie der Blütenblätter	55
C.1.3.1	Charakterisierung und quantitativer Vergleich der CHS.....	58
C.1.3.2	Charakterisierung und quantitativer Vergleich der CHI	60
C.1.3.3	Charakterisierung und quantitativer Vergleich der FHT	62
C.1.3.4	Charakterisierung und quantitativer Vergleich der DFR.....	63
C.1.3.5	Charakterisierung und quantitativer Vergleich der ANR.....	65
C.1.4	Expressionsanalysen von Flavonoidgenen	66
C.1.4.1	Klonierung von Flavonoidgenen.....	66
C.1.4.1.1	Klonierung eines putativen <i>full-length</i> ANS cDNA-Klons.....	67
C.1.4.1.2	Klonierung eines putativen FHT cDNA-Fragments	69
C.1.4.2	Halbquantitative Expressionsstudien	69
C.2	Transformation von <i>Rhododendron simsii</i>	71
C.2.1	Etablierung von <i>Rhododendron simsii</i> in die Gewebekultur	72
C.2.2	Bewurzelung <i>in vitro</i>	74
C.2.3	Etablierung eines Regenerationssystems	74
C.2.3.1	Optimierung des Regenerationssystems	79
C.2.4	Etablierung eines Transformationssystems	80
C.2.4.1	Transformationsmethode	82
C.2.4.2	Eliminierung der Agrobakterien.....	84

C.2.4.3	Ermittlung des auf Antibiotika basierenden Selektionsdruck.....	86
C.2.5	Etablierung eines Mannose-Selektionssystems.....	89
C.2.5.1	Klonierung einer GUS-Expressionskassette in pNOV2819.....	89
C.2.5.2	Ermittlung der Mannosekonzentration	90
D	Diskussion.....	92
D.1	Die Flavonoidbiosynthese der Azaleen	92
D.1.1	Flavonoidenzyme der Azalee	94
D.1.2	Bildung der Blütenfarbe Weiß bei Azaleen.....	96
D.1.2.1	Fehlende Aktivität von Enzymen der Flavonoidbiosynthese	97
D.1.2.2	Einfluss von Regulatorgenen auf die Flavonoidbiosynthese	98
D.1.2.3	Konkurrenz zwischen Enzymen der Flavonoidbiosynthese	99
D.1.2.4	Blütenmutationen bei Azaleen	100
D.1.3	Möglichkeiten des Eingreifens in die Flavonoidbiosynthese bei Azaleen	104
D.2	Transformation von Azaleen	107
D.2.1	Überführung der Azaleen in die Gewebekultur, Mikrovermehrung und <i>in vitro</i> -Bewurzelung.....	107
D.2.2	Etablierung eines Regenerationssystems von Blattexplantaten.....	109
D.2.3	Etablierung eines Transformationssystems	110
D.2.4	Selektion der transgenen Zellen.....	114
D.2.5	Zeitlicher Umfang bei der Gewinnung putativ transgener Azaleen und Überprüfung des Materials.....	115
D.3	Ausblick.....	119
E	Zusammenfassung.....	121
E.1	Summary.....	122
F	Literaturverzeichnis	124
G	Anhang.....	148
G.1	Übersicht der Ergebnisse der analytischen Blütenuntersuchungen	148
G.2	Nukleotidsequenzen und offener Leserahmen der <i>full length</i> cDNA-Klone und cDNA-Fragmente	151
G.3	Übersicht der verwendeten Primer	153
G.4	Übersicht der Versuche zur Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur 154	
G.5	Übersicht der Versuche zur <i>in vitro</i> -Bewurzelung.....	156

G.6	Übersicht der Versuche zur Etablierung eines <i>in vitro</i> - <i>Regenerationssystems</i>	157
G.7	Übersicht der Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems .	163
G.8	Übersicht der Versuche zur Etablierung eines Mannose-Selektionssystems 166	
	Danksagung	168
	Lebenslauf	169

Abbildungsverzeichnis

Abb. A.1:	Das Flavonoidgrundgerüst	3
Abb. A.2:	Die Flavonoidbiosynthese	4
Abb. A.3:	Das Ti-Plasmid	13
Abb. A.4:	Schematische Darstellung der <i>Agrobacterium</i> -vermittelten genetischen Transformation	14
Abb. A.5:	Blütenfarben bei Azaleen.....	20
Abb. B.1:	Topfazaleen	23
Abb. B.2:	Blütenstadien (BS1-5)	26
Abb. B.3:	Plasmide für die Pflanzentransformation.....	34
Abb. B.4:	Boniturschlüssel der Adventivsprossregeneration.....	48
Abb. C.1:	Dünnschichtchromatographische Auftrennung.....	53
Abb. C.2:	Anthocyanverteilung in Blütenblätter der Sorte 'Nordlicht'	54
Abb. C.3:	DMAZA-Färbung in Blütenzelle.....	55
Abb. C.4:	Aktivität der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in Blütenpetalen der Sorten 'Nordlicht' und Mevrouw Edmond Troch	56
Abb. C.5:	Nachweis der ANR- und FGT-Aktivität in Blütenpetalen der Sorten 'Nordlicht' und 'Mevrouw Edmond Troch'	57
Abb. C.6:	Tecyclacisbehandlung der Azaleensorte 'Friedhelm Scherrer'.....	57
Abb. C.7:	Charakterisierung der CHS	59
Abb. C.8:	Quantitativer Vergleich der CHS-Aktivität	60
Abb. C.9:	Proteinmengenlinearität der CHI	61
Abb. C.10:	Quantitativer Vergleich der CHI-Aktivität.....	61
Abb. C.11:	Charakterisierung der FHT	62
Abb. C.12:	Quantitativer Vergleich der FHT	63
Abb. C.13:	Charakterisierung der DFR	64
Abb. C.14:	Quantitativer Vergleich der DFR	65
Abb. C.15:	Quantitativer Vergleich der ANR	66
Abb. C.16:	Darstellung der Klonierung eines ANS cDNA-Klons	67
Abb. C.17:	Alignment der Aminosäuresequenz der putativen ANS (Ausschnitt). 68	
Abb. C.18:	Nachweis der Aktivität der in Hefe exprimierten ANS aus 'Mevrouw Edmond Troch';	69
Abb. C.19:	Expressionsstudien der <i>gapdh</i> , <i>chs</i> , <i>chi</i> , <i>fht</i> , <i>dfr</i> und <i>ans</i>	71

Abb. C.20:	Vorgehensweise bei der Etablierung eines Transformationssystems für Azaleen	72
Abb. C.21:	Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur	74
Abb. C.22:	Blattexplantatkultur der Sorte 'Ballerina' nach dem Protokoll nach Mertens et al. (1996)	75
Abb. C.23:	Adventivsprossregeneration an <i>in vitro</i> -Blattexplantaten	77
Abb. C.24:	Blattexplantate mit GUS-Färbung am Kallussum	81
Abb. C.25:	GUS-Färbung	82
Abb. C.26:	GUS-Aktivität bei unterschiedlicher Präkulturdauer	84
Abb. C.27:	Azaleenexplantate 2 Wochen nach Transformation.....	85
Abb. C.28:	Schematische Darstellung der T-DNA des pNOVGUS-Konstrukts	90
Abb. D.1:	Zeitlicher Umfang der Gewinnung putativ transgener Azaleen und der Überprüfung des Materials	116

Tabellenverzeichnis

Tab. B1:	Untersuchte Sorten aus dem zur Verfügung gestellten Sortiment	24
Tab. B2:	Untersuchte Sorten aus dem Sortiment des Azaleenmuseums in Bremen	25
Tab. B3:	Verwendete Geräte.....	26
Tab. B4:	Liste der Hersteller.....	27
Tab. B5:	Verwendete Chemikalien, Naturstoffe und Verbrauchsmaterialien.....	28
Tab. B6:	Substrate und Radiochemikalien	29
Tab. B7:	Reaktionssysteme und Kits	29
Tab. B8:	Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie.....	30
Tab. B9:	Zusammensetzung des Nährmediums modifiziert nach Anderson (1984).	31
Tab. B10:	Zusammensetzung des MS-Mediums nach Murashige und Skoog (1962).....	32
Tab. B11:	Für die Synthese radioaktiv markierter Flavonoide verwendete Substrate, Proteine, Kofaktoren und Puffer.....	38
Tab. B12:	Verwendete Puffer, [¹⁴ C]-markierte Substrate und Kofaktoren für den Standardenzymtest.....	39
Tab. C2:	Optimale Annealingtemperatur und Zyklenzahl der verwendeten Primerkombinationen.....	70
Tab. C3:	Vergleich der Regenerationsprotokolle für Azaleen nach Mertens et al. (1996) und Samyn et al. (2002).....	75
Tab. C4:	Regenerationsraten der Versuchsvarianten R17-1 bis R17-4 nach 10 Wochen	78
Tab. C5:	Größe der regenerierten Adventivsprosse in Abhängigkeit der Sorte und Methode.....	78
Tab. C6:	Regenerationsraten der Versuchsvarianten R17-1 bis R17-4 nach 20 Wochen	79
Tab. C7:	Regenerationsrate von Blattexplantaten unter den Einfluss zweier Auxine und unterschiedlicher Dauer der Kallusinduktionsphase	79
Tab. C8:	Regenerationsrate und Größe der Adventivsprosse in Abhängigkeit des verwendeten Cytokinins im Sprossinduktionsmedium	80

Tab. C9:	GUS-Aktivität bei Verwendung zweier <i>Agrobacterium</i> -Stämme und zweier Infektionsmethoden	83
Tab. C10:	Eignung verschiedener Antibiotika zur Eliminierung der Agrobakterien und deren Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit.....	86
Tab. C11:	Selektion transformierter Azaleenexplantate bei 0 mg/l bzw. 5 mg/l Kanamycin.....	87
Tab. C12:	Ermittlung des auf Kanamycin basierenden Selektionsdruck.....	88
Tab. C13:	Azaleen-Transformation auf selektionsfreiem Medium	89
Tab. C14:	Steigende Mannosekonzentration zur Selektion PMI-transgener Azaleen	91
Tab. G1:	Ergebnisse der Blüteninhaltsstoffanalysen des zur Verfügung gestellten Sortiments	148
Tab. G2:	Ergebnisse der Blüteninhaltsstoffanalysen des Sortiments des Azaleenmuseums I	149
Tab. G3:	Ergebnisse der Blüteninhaltsstoffanalysen des Sortiments des Azaleenmuseums II	150
Tab. G4:	Übersicht der verwendeten Primer	153
Tab. G5:	Versuche zur Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur I.....	154
Tab. G6:	Versuche zur Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur II.....	155
Tab. G7:	Versuche zur <i>in vitro</i> -Bewurzelung	156
Tab. G8:	Versuche zur Etablierung eines <i>in vitro</i> -Regenerationsversuch I	157
Tab. G9:	Versuche zur Etablierung eines <i>in vitro</i> -Regenerationssystems II.....	158
Tab. G10:	Versuche zur Etablierung eines <i>in vitro</i> -Regenerationssystems III ...	159
Tab. G11:	Versuche zur Etablierung eines <i>in vitro</i> -Regenerationssystems IV ..	160
Tab. G12:	Versuche zur Etablierung eines <i>in vitro</i> -Regenerationssystems V ...	161
Tab. G13:	Versuche zur Etablierung eines <i>in vitro</i> -Regenerationssystems VI ...	162
Tab. G14:	Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems I	163
Tab. G15:	Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems II.....	164
Tab. G16:	Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems III.....	165
Tab. G17:	Versuche zur Etablierung eines Mannose-Selektionssystems I.....	166
Tab. G18:	Versuche zur Etablierung eines Mannose-Selektionssystems II.....	167

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2iP	2-Isopentenyladenin
A oder a	Adenin
Abb.	Abbildung
AN	Medium nach Anderson (1984)
ANR	Anthocyanidinreduktase
ANS	Anthocyanidinsynthase
BA	Benzylaminopurin
<i>ban</i>	BANYULS-Gen
BAW	Laufmittel mit n-Butanol, Eisessig, Wasser
bp	Basenpaare
BS	Blütenstadium
C oder c	Cytosin
Caff-CoA	Kaffeoyl-CoA
Cat	Catechin
CAW	Laufmittel mit Chloroform, Eisessig, Wasser
cDNA	complementary DNA
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
Cum-CoA	Coumaroyl-CoA
Cy	Cyanidin
Cy-3-Gluc	Cyanidin-3-Glukosid
dATP	Desoxyadenosin 5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytosin 5'-triphosphat
dest.	destilliert
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
dGTP	Desoxyguanin 5'-triphosphat
DHK	Dihydrokämpferol
DHM	Dihydromyricetin
DHQ	Dihydroquercetin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMAZA	4-Dimethylaminozimtaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
Dp	Delphinidin
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dTTP	Desoxythymidin 5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Epicatechin
EDTA	Ethylendiamintetraessig
EGC	Epigallocatechin
EGME	Ethylenglykol-monomethylether
ER	Medium nach Econoumo und Read (1984)

ERI	Eriodictyol
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FGT	Flavonoid3-O-Glukosyltransferase
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FNS	Flavonsynthase
FNR	Flavanon 4-Reduktase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid 3'5'-Hydroxylase
G oder g	Guanidin
GT	Laufmittel mit Wasser, Eisessig, Salzsäure
GUS	β -Glucuronidase
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
IAA	Indolessigsäure
IBA	Indolbuttersäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thioglakto-pyranosid
Km	Kämpferol
Konz.	Konzentration
KPi-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LAR	Leukoanthocyanidin 4-Reduktase
LB-Medium	Luri-Bertani-Medium
LCy	Leukocyanidin
LPg	Leukopelargonidin
MeOH	Methanol
MS-Medium	Medium nach Murashige und Skoog
Mv	Malvidin
My	Myricetin
NAA	Naphtylelessigsäure
Na-Ascorbat	Natrium-Ascorbat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid
NAR	Naringenin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pg	Pelargonidin
PHC	2'4'6'3,4-Pentahydroxychalkon
Pn	Päonidin
PVP	Polyvinylpyrrolidin
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
Qu	Quercetin
R. simsii	Rhododendron simsii
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	rounds per minutes
SOC Std.	Antibiotikafreies, nicht selektives Bakterien-Medium Stunden
T oder t	Thymin
TDZ	Thidiazuron
THC	2',4',6',4-Tetrahydroxychalkon
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultra Violett
WPM	<i>Woody Plant Medium</i> nach McCown und Lloyd (1983)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- β -galktopyranosid

A Einleitung

Die Selektion von Wildtypen im Zusammenspiel mit klassischen Züchtungsmethoden sind die bisher wichtigsten Verfahren für die Schaffung von Neuheiten auf dem weltweit wachsenden Markt für Zierpflanzen, auf dem jährlich schätzungsweise 27 Milliarden USDollar umgesetzt werden (Chandler, 2003). In den letzten 20 Jahren kommt aber dem *genetic engineering*, also der Modifikation von Pflanzen mittels gentechnologischen Methoden, mehr Bedeutung zu, die der Züchtung eine Erweiterung des Genpools bietet und so die Erzeugung neuer kommerzieller Sorten unterstützt. So sind z.B. seit Mitte der 1990er Jahre in ihrer Blütenfarbe modifizierte Nelken der Serie 'MoonTM' auf dem amerikanischen, asiatischen und australischen Markt und in Teilen Europas erhältlich. Seit der ersten Veröffentlichung über die erfolgreiche Transformation von Petunien zur Veränderung der Blütenfarbe (Meyer et al., 1987) wurden in zahlreichen Publikationen Transformationsexperimente an verschiedensten Zierpflanzenarten beschrieben. Neben der Verbesserung der Haltbarkeit bei Schnittblumen, der Einführung von Resistenzgenen, sowie der Modifikation von morphologischen Merkmalen ist hierbei vor allem das auffälligste Merkmal der Zierpflanzen von Interesse: die Blüte und ihre Farbausprägung.

A.1 Blütenpigmente

Blütenfarben sind aufgrund ihrer Eigenschaft Bestäuber anzulocken von überaus hoher ökologischer Bedeutung, daneben besitzen sie aber auch einen ästhetischen Wert für den Menschen. Drei Pigmentgruppen, die Flavonoide, die Carotinoide und die Betalaine, sind verantwortlich für die reiche Farbvielfalt primär von Blüten, aber auch von Früchten, Wurzeln oder Blättern beispielsweise in ihrer Herbstfärbung.

Betalaine sind wasserlösliche, stickstoffhaltige Alkaloide, zu denen das rot-violette Betacyanin und das gelbe Betaxanthin zählen. Sie werden durch Kondensation der Aminosäure Tyrosin mit Betalaminsäure und einem weiteren DOPA-Derivat wie Cyclo-Dopa zu Betacyan, bzw. durch die Kondensation von Betalaminsäure mit einer Aminosäure, zu Betaxanthin gebildet (Strack, 2003). Betalaine kommen in Familien der Ordnung der Caryophyllales, aber auch in einigen Pilzarten wie *Amanita muscaria* vor. Zu den wichtigsten Zierpflanzenarten, denen Betalaine ihre Blütenfarben verdanken, zählen *Amaranthus*, *Bougainvillea*, *Mirabilis* und *Portulaca*. Da nach bisherigen Kenntnissen Betalain produzierende Pflanzen nicht in der Lage

sind Flavan-3,4-diole zu Anthocyanidinen umzusetzen, schließt sich das gemeinsame Vorkommen mit Anthocyanen aus. Sie können jedoch durchaus mit anderen Flavonoiden einschließlich Proanthocyanidinen auftreten (Stafford, 1994).

Carotinoide gehen aus dem Isoprenoidstoffwechsel hervor. Die Synthese findet in den Plastiden statt. Unterschieden werden generell Carotine, die aus ungesättigten Kohlenwasserstoffketten bestehen, und die Sauerstoff enthaltenden Xanthophylle. Wegen ihrer chemischen Eigenschaften sind Carotinoide essentielle Bestandteile aller photosynthetischen Organismen. Eine wichtige Funktion besitzen Carotinoide für die menschliche Ernährung, z.B. als Vorstufe des Vitamin A und als Antioxidantien (Grotewold, 2006). Am augenscheinlichsten erfüllen Carotinoide ihre Aufgabe als Pigmente in einer Vielzahl von gelben und orangefarbenen Blüten wie z.B. *Freesia*, *Gerbera*, *Lillium*, *Rosa* und *Tagetes*. Häufig kommen sie auch zusammen mit roten oder violetten Anthocyanen vor, was zu orangen, aber auch zu bronzene Blütenfarben, wie z.B. bei Chrysanthemen, führt (Griesbach, 1984; Forkmann, 1991). Die meisten der an der Biosynthese beteiligten Enzyme sind heute identifiziert. Aufgrund der hohen Bedeutung der Carotinoide für Pflanzen und Menschen besteht ein weltweit großes Interesse in den Biosyntheseweg mit biotechnologischen Methoden einzugreifen. Von kommerzieller Bedeutung ist hierbei insbesondere die industrielle Anwendung für Ernährung und Nahrungszusatzmittel, Kosmetika und pharmazeutische Produkte, aber auch die Veränderung der Blütenfarbe bei Zierpflanzen (Cunningham und Gantt, 1998; Hirschberg, 2001; Fraser und Bramley, 2004).

Flavonoide sind wasserlösliche Pigmente, die wie die Betalaine in der Vakuole lokalisiert sind. Als eine Klasse der Phenylpropanoide zählen sie mit über 9.000 Flavonoiden zu der am ausführlichsten charakterisierten Stoffklasse des sekundären Stoffwechsels (Williams und Grayer, 2004). Das Flavonoidgrundgerüst besteht aus einem sauerstoffhaltigen Heterozyklus (Pyranring) und zwei aromatischen C₆-Ringen (Abb. A.1). Aufgrund des Oxidierungsgrades am zentralen Pyranring wurden die Flavonoide in 12 Klassen eingeordnet. Zu den Blütenfarben bildenden Flavonoidklassen zählen die Anthocyane, Flavonole und Flavone, sowie die biosynthetisch nah zu Flavonoiden verwandten Chalkone und Aurone. Glykosylierungen, Hydroxylierungen, Methylierungen und Acylierungen des A- oder B-Ringes innerhalb der Klassen führen zu der hohen Diversität der Flavonoide und deren unterschiedlichen biologischen Funktionen als Pigmente, als Phytoalexine

oder als Signalstoffe (Forkmann, 1991). Chalkone, Aurone, Flavone und Flavonole tragen zu gelben Blütenpigmentierungen bei wie beispielsweise bei *Callistephus* (Chalkone), *Antirrhinum* (Aurone), *Heywoodiella* (Flavone) und *Papaver* (Flavonole) (Kuhn et al., 1978; Harborne, 1967, 1976 und 1978). Hinsichtlich der Blütenfärbung aber bilden Anthocyane wahrscheinlich die wichtigste Gruppe unter den Flavonoiden. Sie sind verantwortlich für die meisten orange, rosa, roten, violetten, blauen und schwarzen Blütenfarben. Die drei Hauptgruppen der Anthocyanidine, Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin, unterscheiden sich hinsichtlich des Hydroxylierungsgrades ihres B-Ringes. Neben der Anzahl von OH-Gruppen am B-Ring führen weitere Substituierungen wie Methylierungen und aromatische und aliphatische Acylierungen zu einer Veränderung der Farbausprägung. Das farbliche Erscheinungsbild anthocyanhaltiger Gewebe wird aber nicht nur alleine von der Art oder Mischung der Anthocyangruppen verursacht. Auch Kopigmentierungen mit Carotinoiden, Flavonen oder Flavonolen, der pH-Wert in der Vakuole und Komplexbildungen mit Metallionen tragen zur Farbausprägung bei (Harborne, 1967; Goto und Kondo, 1991, Forkmann und Heller, 1999).

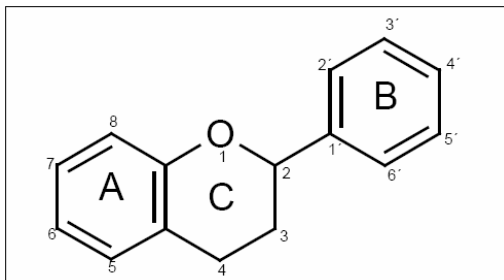


Abb. A.1: Das Flavonoidgrundgerüst

A.2 Die Flavonoidbiosynthese

Bis auf wenige Ausnahmen und individuelle Unterschiede zwischen den Pflanzenarten sind die einzelnen Schritte der Flavonoidbiosynthese heute überwiegend aufgeklärt. Die beteiligten Enzyme konnten durch Zellsuspensionskulturen von chemogenetisch definiertem Pflanzenmaterial eingehend untersucht und charakterisiert werden. Alle Gene, die für Enzyme des Hauptbiosyntheseweges codieren, sowie einige Regulatorgene und Gene, die für die Modifikation einzelner Flavonoidklassen verantwortlich sind, wurden als cDNA-Klone gewonnen und auf molekularer Ebene charakterisiert (Mol et al., 1998; Forkmann und Heller, 1999). Die Abb. A.2 auf Seite 4 zeigt den Hauptbiosyntheseweg der Flavonoide.

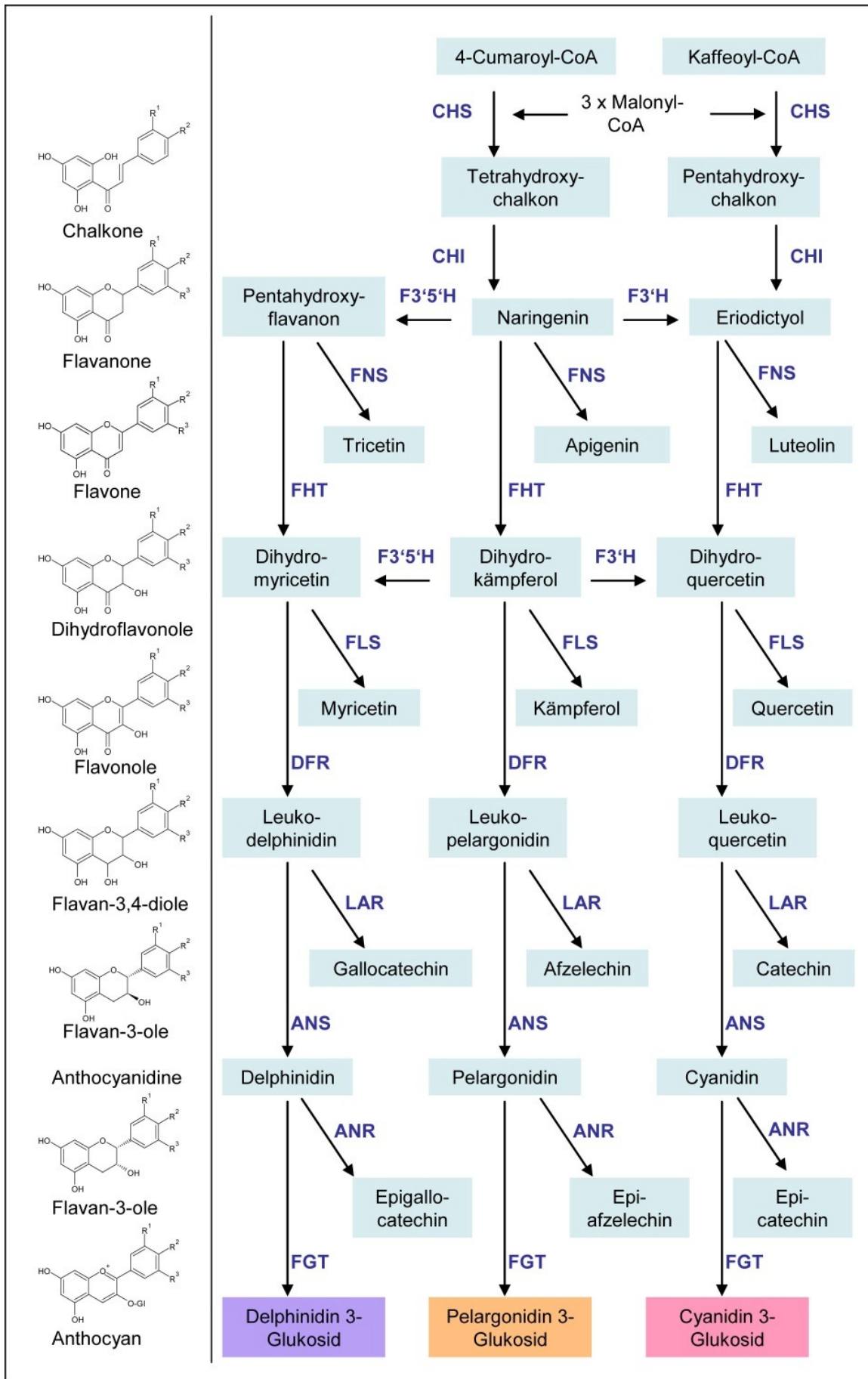


Abb. A.2: Die Flavonoidbiosynthese

Die Grundstruktur der Flavonoide, bestehend aus zwei aromatischen Ringen und einem Pyranring, wird ausgehend vom L-Phenylalanin über dem Phenylpropanoidweg gebildet. Durch die enzymatische Reaktion der Phenylalaninammoniumlyase (PAL; E.C. 4.3.1.5), Zimtsäure 4-hydroxylase (C4H; E.C. 1.14.13.11) und 4-Cumarsäure-CoA-Ligase (4CL; E.C. 6.2.1.12) entsteht 4-Cumaroyl-CoA, welches als Substrat für die Eingangsreaktion der Flavonoidbiosynthese dient. Durch die Kondensation mit 3 Molekülen Malonyl-CoA wird, unter Abspaltung von CoA und CO₂, mit der Hilfe der Chalkonsynthase (CHS; E.C. 2.3.1.74) das 2'4'6'4-Tetrahydroxychalkon (THC) gebildet. Die CHS akzeptiert zudem weitere Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester wie Kaffeoyl-CoA, aus dem das 2'4'6'3,4-Pentahydroxychalkon (PHC) entsteht.

Die Zyklisierung des C-Rings des 2'4'6'4-Tetrahydroxychalkons führt zur Bildung des 2S-Flavanons Naringenin und wird durch die Chalkonisomerase (CHI; E.C. 5.5.1.6) katalysiert. Durch Isomerisierung des 2'4'6'3,4-Pentahydroxychalkons wird Eriodictyol gebildet, welches zwei OH-Gruppen am B-Ring besitzt. In der Regel entsteht Eriodictyol jedoch durch eine Hydroxylierung von Naringenin an der 3'-Position durch die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H). Das Pentahydroxyflavanon (PHF) besitzt zusätzlich an der 5'Position eine weitere OH-Gruppe, welche durch die Flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H), entweder in einem Schritt ausgehend vom Naringenin oder durch 5'-Hydroxylierung ausgehend vom Eriodictyol, substituiert wird. Die Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktionen der Cytochrom P450 Enzyme F3'H und F3'5'H (E.C. 1.14.13.21) können ebenso auf Dihydroflavonolebene stattfinden und somit ausgehend von Dihydrokämpferol als Substrat zu Dihydroquercetin bzw. Dihydromyricetin führen.

Durch Modifikationen des C-Rings der Flavanone entstehen die Flavonoidklassen Flavone und Dihydroflavonole. Letztere werden durch Hydroxylierung an der C3-Position durch die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase (2ODD) Flavanon 3-Hydroxylase (FHT; E.C. 1.14.11.9) katalysiert. Aus den Substraten Naringenin bzw. Eriodictyol werden Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin gebildet. Flavone können durch zwei unterschiedliche Reaktionssysteme entstehen. In der Regel wird durch das Cytochrom P450 Enzym Flavonsynthase II (FNS II) eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 eingeführt, in Apiaceen dagegen erfolgt die Reaktion über die Flavonsynthase I (FNS I), eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase. Ebenfalls durch die Einführung einer Doppelbindung zwischen C2 und C3 entstehen aus

Dihydroflavonole die Flavonole, katalysiert durch die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase Flavonolsynthase (FLS).

Durch Reduktion der Ketogruppe am C4-Atom werden durch die NADPH-abhängige Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR; E.C. 1.1.1.219) Dihydroflavonole zu Flavan-3,4-diole gebildet. Diese Leukoanthocyanidine sind Vorstufen für die Synthese der 2,3-*trans*-Flavan-3-ole, zu denen das Afzelechin, Catechin und Gallocatechin zählen, durch die NADPH-abhängige Leukoanthocyanidinreduktase (LAR). Über die Anthocyanidinsynthase (ANS) werden Leukoanthocyanidine zudem zu den Anthocyanidinen umgebildet. Anthocyanidine wiederum dienen als Substrat für die Anthocyanidinreduktase (ANR), die die Reaktion zu den 2,3-*cis*-Flavan-3-olen Epiafzelechin, Epicatechin und Epigallocatechin katalysiert, sowie für die Flavonoid-3-O-Glykotsyltransferase (UFGT; E.C. 2.4.1.91), die ein Glukosemolekül an die freie OH-Gruppe des C-Rings der Anthocyanidine anfügt. Durch Glykosylierung werden die Anthocyanidine stabilisiert und deren Wasserlöslichkeit erhöht.

A.2.1 Enzyme der Flavonoidbiosynthese

Die hohe Diversität der in der Natur vorkommenden Flavonoide beruht auf zahlreichen Hydroxylierungs-, Methylierungs-, Glykosylierungs- und Acylierungsreaktionen. Viele der an diesen Modifizierungsreaktionen beteiligten Enzyme sind hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer Reaktionseigenschaften charakterisiert. Im Folgenden soll auf die für die Anthocyan- und Proanthocyanidinbiosynthese entscheidenden und in dieser Arbeit untersuchten Enzyme eingegangen werden.

A.2.1.1 Die Chalkonsynthase (CHS)

Die Chalkonsynthase stellt das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese dar. Ausgehend vom Chalkon werden alle Klassen der Flavonoide, aber auch die Aurone und 6'-Deoxychalkone gebildet. Die CHS gehört zu den Polyketidsynthasen und benötigt für die Reaktion keine Kofaktoren. Erstmals wurde sie in *Petroselinum crispum* nachgewiesen (Kreuzaler und Hahlbrock, 1972). Neben 4-Cumaroyl-CoA akzeptiert sie auch weitere Hydroxyzimtsäuren wie das Kaffeoyl-CoA aus dem 2',4',6',3',4'-Pentahydroxychalkon entsteht. Da bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Substrate *in vitro* ein höherer Umsatz von Cumaroyl-CoA zu THC erfolgt, ereignet sich in der Regel die Hydroxylierung der 3'-Position des B-Rings *in vivo* in einem späteren Biosyntheseschritt (Spribille und Forkmann, 1982). Die Chalkonsynthase

wurde als erstes Flavonoidgen als cDNA-Klon aus Petersilie isoliert (Kreuzaler et al., 1982). Seitdem wurde aus mehr als einhundert Pflanzenarten die CHS kloniert und charakterisiert, so auch aus *Rhododendron simsii* (De Schepper, 2001).

A.2.1.2 Die Chalkonisomerase (CHI)

Die Chalkonisomerase wurde als erstes Enzym der Flavonoidbiosynthese nachgewiesen (Moustafa und Wong, 1967). Es katalysiert die Zyklisierung der Chalkone zu den (2S)-Flavanonen, welche als Substrat für die Bildung der weiteren Flavonoidklassen dienen. Die Zyklisierungsreaktion kann zudem chemisch erfolgen (spontane Isomerisierung), was allerdings zu einem Reaktionsgemisch aus 2S- und 2R-Flavanonen führt. Letztere können von nachfolgenden Enzymen der Flavonoidbiosynthese nicht verwendet werden. Aufgrund der fehlenden Ähnlichkeiten in der Struktur der CHI und in der Sequenz des codierenden Gens zu nicht pflanzlichen Proteinen wurde davon ausgegangen, dass sich das Vorkommen der CHI auf das Pflanzenreich beschränkt (Jez et al., 2000). In Untersuchungen der letzten Jahre wurde die CHI-Aktivität aber auch in Pilzen und Prokaryonten nachgewiesen (Gensheimer und Mushegian, 2004; Herles et al., 2004).

Bis heute wurden über einhundert genomische oder cDNA-Klone der CHI isoliert und charakterisiert.

A.2.1.3 Die Flavanon 3-Hydroxylase (FHT)

Die FHT katalysiert die Hydroxylierung der Flavanone an der C3-Position in Abhängigkeit von 2-Oxoglutarat und Fe^{2+} , wobei Ascorbat die Reaktion zusätzlich stimulieren kann. Die FHT zählt demnach zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODD). Sie wurde erstmals in *Matthiola incana* nachgewiesen (Forkmann et al., 1980) und im Anschluss insbesondere an *Antirrhinum* und *Petunia* eingehend charakterisiert (Forkmann und Strotz, 1981; Froemel et al., 1985; Britsch und Grisebach, 1986). Der erste FHT cDNA-Klon wurde 1992 von Britsch et al. aus *Petunia* isoliert.

A.2.1.4 Die Flavonoid 3'- bzw. 3'5'-Hydroxylase (F3'H / F3'5'H)

Die F3'H und F3'5'H zählen zu den Cytochrom P450 Monoxygenasen. Sie besitzen als solche am prosthetischen Teil eine Hämgruppe, deren reduzierte Form einen Komplex mit Kohlenmonoxid bildet, der durch Absorption von Licht der Wellenlänge 450 nm zerstört wird (Omura und Sato, 1964). Eingehende Studien der mikrosomal

gebundenen F3'H aus *Petroselinum crispum* zeigten, dass die durch F3'H vermittelte Hydroxylierung am B-Ring von Flavanonen, Dihydroflavonolen, Flavonen und Flavonolen stattfinden kann (Hagmann et al., 1983). F3'5'H hydroxyliert sowohl Naringenin und Dihydrokämpferol an der 3'- und 5'-Position, kann aber auch die 3',4'-hydroxylierten Flavanone bzw. Dihydroflavonole zumindest *in vitro* als Substrat verwenden (Stotz, 1983). Eine Sonderstellung nimmt die F3'5'H aus Asteraceae ein, die ihrer Sequenz nach eine F3'H ist. Diese Ähnlichkeit konnte genutzt werden um die Funktionsunterschiede auf Aminosäureebene zwischen beiden Enzymen zu identifizieren (Seitz, 2004). Die F3'H- und F3'5'H-Reaktionen sind Sauerstoff- und NADPH-abhängig und können durch typische Cytochrom P450 Inhibitoren, wie Tetracyclacin, gehemmt werden.

A.2.1.5 Die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR)

Mit NADPH als Kofaktor katalysiert die DFR die stereospezifische Reduktion der Dihydroflavonole zu den entsprechenden Flavan-2,3-*trans*-2,4-*cis*-Diolen. Die DFR wurde zunächst in Zusammenhang mit der Bildung von Catechinen und Proanthocyanidinen bei *Pseudotsuga menziesii* beschrieben (Stafford und Lester, 1982) und später erst die Reaktion von Dihydroflavonol zu Flavan-3,4-diol aus Blütenextrakten von *Matthiola incana* in Verbindung mit der Bildung von Anthocyanen (Heller et al., 1985a). Aufgrund ihrer Substratspezifität kommt der DFR eine besondere Bedeutung für die Entstehung des Anthocyanmusters zu, wobei Dihydroflavonole mit einem höheren Hydroxylierungsgrad des B-Rings präferiert werden, was in vielen Pflanzenarten die Akkumulation der über FLS gebildeten Kämpferolderivate erklärt, da DHK nicht als Substrat verwendet wird (Forkmann und Heller, 1999). In vielen Pflanzenarten wurden genomische und cDNA-Klone isoliert und charakterisiert. Auch aus *Rhododendron simsii* wurde von De Schepper (2001) ein *dfr* cDNA-Klon isoliert.

A.2.1.6 Die Anthocyanidinsynthase (ANS)

Die Reaktion ausgehend von Leukocyanidin zu Anthocyanidin wurde mit Hilfe von Supplementationsexperimenten an weißen genetisch definierten Blüten von *Matthiola incana* nachgewiesen (Heller et al., 1985b). Obwohl eine Reihe von putativen cDNA-ANS-Klonen isoliert wurden, konnte lange Zeit deren Reaktion *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Saito et al. (1999) zeigte die ANS-Reaktion erstmalig an vier rekombinanten Enzymen aus *Perilla frutescens*, wobei als primäres

Produkt der ANS das farblose 2-Flaven-3,4-Diol (Pseudobase) gebildet wird, worauf eine Isomerisation der 2,3-Doppelbindung zu der 3,4-Position einher gehend mit einer Verschiebung der Hydroxylgruppe von C-4 zu C-2 und der Entfernung des Hydroxylanions folgt, was zum farbigen Flavylumion führt. Die Reaktion der 2-ODD ist Sauerstoff und Fe^{2+} abhängig.

A.2.1.7 Die Anthocyanidinreduktase (ANR)

Die ANR katalysiert die Reaktion von Anthocyanidin zu den 2,3-*cis*-Flavan-3-olen. Die Flavan-3-ole bilden die Bausteine der Proanthocyanidine, kondensierte Tannine, deren Synthese aus dem gleichen Biosyntheseweg der Anthocyane hervorgeht. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Abzweigung zu den Proanthocyanidinen auf Ebene der Leukoanthocyanidine über die Bildung von 2,3-*trans*-Flavan-olen durch die LAR stattfindet, wobei dieses Modell nicht die Bildung der 2,3-*cis* Stereomere, die ein Baustein vieler kondensierter Tannine bilden, erklären konnte. Erst Untersuchungen des in *Escherichia coli* exprimierten *BANYULS* Gen, von dem angenommen wurde, dass es für die LAR codiert, zeigten die NADPH-abhängige Synthese von Anthocyanidin zu dem entsprechenden Flavan-3-ol (Xie et al., 2003). Durch chemische Charakterisierung der ANR-Reaktionsprodukte wurden die zwei Isomere 2R, 3R-2,3-*cis*- und 2S, 3R-2-*trans*-Flavan-3-ole identifiziert. Ausgehend z.B. von Cyanidin als Substrat bilden sich entsprechend die Produkte (-)-Epicatechin und (-)-Catechin. Zwar ist die Synthese der Flavan-3-ole über die LAR und ANR bekannt, jedoch bleibt die *in vivo* Polymerisierungsreaktion dieser Bausteine zu den kondensierten Tanninen noch unklar (Dixon et al., 2005; Xie und Dixon, 2005).

A.2.1.8 Die Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (FGT)

Die FGT katalysiert die 3-O-Glykosylierung der 2-Flaven-3,4-Diol (Pseudobase) unter pH-neutralen Bedingungen des Cytosols. Diese Pseudobasenform des Anthocyanidin 3-Glukosids wird im Anschluss in die Vakuole transportiert, wo es unter sauren Bedingungen der Vakuole zu dem farbigen Flavylumion unter Abspaltung des Hydroxylanions gebildet wird (Nakajima et al., 2001). Die FGT-Reaktion erhöht die Löslichkeit der gebildeten Anthocyane und ist Voraussetzung für weitere Acylierungsreaktionen. Die Aktivität der FGT wurde erstmals in Proteinextrakten von Maispollen nachgewiesen (Larson und Coe, 1968) und seit dem an einer Vielzahl von weiteren Pflanzenarten untersucht und als genomische und

cDNA-Klone isoliert, wobei diese eine relativ geringe Homologie zueinander aufweisen (Forkmann und Heller, 1999).

A.2.2 Transport der Flavonoide in die Zellvakuole

Anthocyane werden in den pflanzlichen Zellen zur Stabilisation und Detoxifizierung in die Vakuole transportiert. Dies geschieht durch einen Mechanismus der in allen Organismen vorkommt: die Glutathionierung von bioreaktiven Molekülen und deren aktiver Transport über die Membran durch eine GSH-Pumpe (GSH: γ -Glutamylcysteinylglycin) in Abhängigkeit von Mg-ATP. Hierzu werden die Anthocyane durch die Glutathion S-Transferase (GST; EC 2.5.1.18) kovalent an das Glutathion gebunden (Marrs, 1996, und darin enthaltene Referenzen). Die pflanzlichen GSTs werden in drei Typen unterschieden, basierend auf einer Kombination aus konservierten Sequenzbereichen, immunologischer Aktivität und der Intron/Exon Struktur der Gene (Droog et al., 1995). Bisher wurde das *Bronze2* (*Bz2*) Gen, ein Typ III GST aus Mais (Marrs et al., 1995), und aus Petunie das *Anthocyanin9* (*An9*) Gen, ein Typ I GST, isoliert (Alfenito et al., 1998).

A.2.3 Multienzymkomplexe der Flavonoidbiosynthese

Multienzymkomplexe, auch Metabolons genannt, sind für viele Biosynthesen des primären Stoffwechsels beschrieben. Sie bieten für die Zelle Vorteile hinsichtlich der metabolischen Effizienz, z.B. durch lokale Substratkonzentration, durch Partizipation verschiedener bzw. verzweigter Synthesewege für gemeinsam genutzte Metaboliten und für die Koordination von Synthesewegen mit gemeinsamen Enzymen und Zwischenprodukten. Die Bildung von Enzymkomplexen und die Kanalisierung ihrer Reaktionen bietet daher Potential für eine schnelle Regulierung des metabolischen Prozesses (Winkel-Shirley, 1999, und darin enthaltene Referenzen). Solche Komplexe könnten auch für den sekundären Stoffwechsel, und im speziellen für die Flavonoidbiosynthese, existieren. Durch Zellfraktionsexperimente wurden erste Belege für eine Komplexbildung der Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs demonstriert. So findet z.B. die Hydroxylierungsreaktion der F3'H in der mikrosomalen Fraktion *Haplopappus gracilis* Zellsuspensionen statt (Fritsch und Grisebach, 1975). Später konnte gezeigt werden, dass das als ursprünglich löslich angenommene Enzym CHS ebenfalls in der mikrosomalen Fraktion nachgewiesen werden kann (Hrazdina et al., 1978). Auch die Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase in Rotkohlkeimlingen sind an der Membran des Endoplasmatischen Reticulums

gebunden. Zudem wurde schon früh die koordinierte Induktion von Enzymaktivitäten gemessen, so z.B. bei PAL und C4H in Buchweizensämlingen, die durch Licht induziert werden (Amrhein und Zenk, 1971). Später erfolgte der Nachweis verschiedener regulatorischer Loci für die koordinierte Expression von Flavonoidgenen in Mais, Petunie, Löwenmaul und Ackerschmalwand (Koes et al., 1994; Holton und Cornish, 1995; Mol et al., 1998). Insbesondere durch mRNA-Expressionsanalysen wurden die Flavonoidgene in „früh“ exprimiert klassifiziert, notwendig für die Bildung aller Flavonoide, und in „späte“ Gene eingeteilt, die speziell für die Synthese der Proanthocyanidine, Anthocyane und in einigen Fällen für Flavonole verantwortlich sind (Pelletier et al., 1997, und darin enthaltene Referenzen). Zudem spricht für die Komplexbildung von Flavonoidenzymen das Auftreten mehrerer Kopien von Genen der frühen Flavonoidbiosynthese. So konnten beispielsweise in *Medicago sativa* sieben oder mehr Genkopien der CHS nachgewiesen werden (Junghans et al., 1993; Dixon et al., 2002). Ein direkter Beweis für die Bildung von Komplexen der Enzyme der Flavonoidbiosynthese existiert jedoch aufgrund der wenig stabilen Protein-Assoziation bisher noch nicht (Winkel-Shirley, 1999).

A.3 Pflanzentransformation mittels Agrobakterium

Grundsätzlich wird bei der Genübertragung in die Pflanze zwischen direkten und indirekten Methoden unterschieden. Zur ersteren gehören elektrische, physikalische und chemische Methoden, bei denen isolierte DNA in die Pflanzenzelle übertragen wird, wie z.B. bei der Elektroporation, Mikroinjektion, Partikelbeschuss und Ultraschallbehandlung. Für die indirekte Genübertragung werden modifizierte Viren oder Bakterien als natürliche „Genfähren“ genutzt. Die Wahl der Methode hängt insbesondere von den Eigenschaften der Empfängerpflanze ab und ist unabhängig von der zu übertragenden DNA. Zu der am häufigsten verwendeten Methode zählt der indirekte Gentransfer mittels Agrobakterium.

A.3.1 Das Agrobakterium

Das bodenbürtige Phytopathogen *Agrobacterium tumefaciens* wurde bereits 1907 von Smith und Townsend als Verursacher der Wurzelhalsgallenkrankheit an dicotyledonen Pflanze beschrieben. Das Krankheitsbild ist durch ein tumoröses Wachstum am Wurzelhals charakterisiert und tritt insbesondere bei Wein und Steinfrüchten auf. *Agrobacterium* ist gram-negativ. Neben *A. tumefaciens* kommen

auch *A. rhizogenes*, verantwortlich für das *hairy root disease*, *A. vitis* und *A. rubis*, verursachen Gallen bei Wein und Zuckerrohr, sowie das avirulente *A. radiobacter* vor. In der Mitte des letzten Jahrhunderts wurde bewiesen, dass nach Entfernung des Bakteriums ohne Zugabe von Auxinen und Cytokininen ein Wachstum der Tumorzellen stattfindet (Braun, 1958). Bereits damals postulierte Braun das Transformationsprinzip, also die Übertragung eines Teils der bakteriellen Erbinformation in das Wirtsgenom. Aber erst mit fortschreitender Entwicklung der molekularen Techniken konnte in den Gallentumoren bakterielle DNA nachgewiesen werden (Schilperpoort et al., 1967). Unter anderem durch Entdeckung des tumorinduzierenden (Ti) Plasmids (Van Larebeke et al., 1974) und Identifizierung der T-DNA (Transfer DNA) (Chilton et al., 1977; Chilton et al., 1978; Depicker et al., 1978) wurden die Mechanismen des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers aufgeklärt. Für Transkription und Transport der T-DNA in die Wirtszelle benötigt das Agrobakterium Proteine, die zum einen von chromosomalen Genen (*chv*), und zum anderen von virulenz (*vir*) Genen, die auf dem Ti-Plasmid außerhalb der T-DNA lokalisiert sind, codiert werden. Daneben beeinflussen zahlreiche Wirtsproteine den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer. Auf der T-DNA des Wildtyps befinden sich die Gene, die für die Wachstumshormone kodieren, also verantwortlich sind für die Störung des Auxin-Cytokinin-Verhältnisses in der Pflanze, wodurch die Tumorbildung entsteht, sowie auch für die Opininproduktion, welche dem Bakterium als Stickstoffquelle dienen. Die Einteilung der verschiedenen *Agrobacterium*-Stämme erfolgt nach der Art des Opins. Zu den in der Gentechnik am häufigsten verwendeten Stämmen zählen zum Beispiel LBA4404, ein Octopin-Typ, GV3101, ein Nopalin-Typ, und EHA101 oder EHA105, beides Succinamopin-Typen. 1983 wurden die tumorinduzierenden (*onc*) Gene aus der T-DNA eines Wildtyp-Stammes entfernt, wodurch ein „entwaffnetes“ Plasmid entstand, welches nun als „Genfahre“ für biotechnologische Anwendungen bereit stand (Zambryski et al., 1983).

A.3.2 Das Ti-Plasmid

Vier wesentliche Bereiche können auf dem Ti-Plasmid unterschieden werden: die T-DNA, die *vir*-Region, der Replikationsstart und die Konjugationsregion. Die T-DNA wird flankiert von dem *left* und *right border*. Die *vir*-Region steuert die Übertragung der T-DNA in das pflanzliche Genom. Der Replikationsstart dient der Plasmidduplikation im *Agrobacterium* und die Konjugationsregion der Plasmidübertragung in andere Bakterien. Daneben besitzt das Plasmid u.a. Gene die

für den Opine-Abbau kodieren, wie z.B. die *noc* Gene für den Nopaline-Abbau. Das in Abb. A.3 dargestellte Plasmid repräsentiert einen cointegrativen Vektor. In der Regel sind heute aufgrund der einfacheren Handhabung für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer Systeme mit einem Ti-Helferplasmid, auf dem die *vir*-Gene lokalisiert sind, und einem binären Vektor auf dem sich die T-DNA befindet, im Gebrauch.

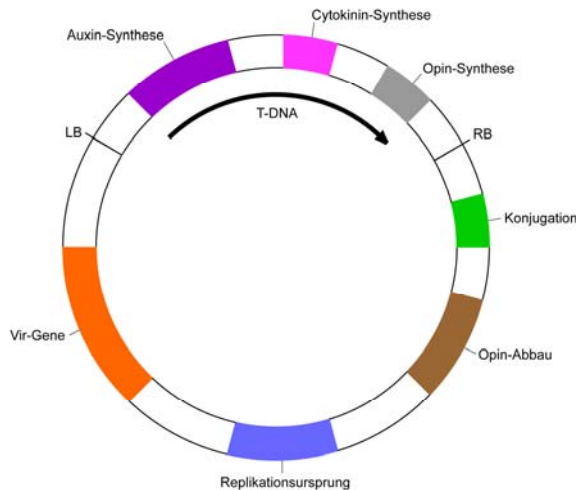


Abb. A.3: Das Ti-Plasmid

A.3.3 Der *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer

Der Übertragungsprozeß der T-DNA vom *Agrobacterium* (Abb. A.4, S. 14) in die pflanzliche Zelle kann in fünf wesentliche Schritte unterteilt werden:

Die bakterielle Kolonisation

Die erste Voraussetzung für die erfolgreiche Genübertragung ist die bakterielle Kolonisation des pflanzlichen Gewebes. Hiefür wurde ein direkter Zusammenhang mit dem Vorkommen kapsulärer Polysaccharide an der Zellaußenwand der Bakterien, die das Anheften an die pflanzliche Zellwand erleichtern, beobachtet. Die entsprechenden Gene (*chv*) sind auf dem bakteriellen Chromosom lokalisiert (Bradley et al., 1997).

Induktion des Virulenzsystems

Der T-DNA Transfer wird durch die Produkte der 30-40 kb großen *vir*-Region des Ti-Plasmides vermittelt. Diese Region setzt sich aus sechs essentiellen (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*) und zwei nicht essentiellen Operons (*virF*, *virH*) zusammen. Die Genanzahl für jedes Operon schwankt wiederum zwischen zwei und sieben. Die zwei konstitutiven Operons *virA* und *virG* kodieren für ein zwei-komponenten System, welches die Transkription der weiteren *vir* Gene aktiviert. Das *virA* Gen produziert ein

membrangebundenes Sensorprotein, das Signalmoleküle, hauptsächlich phenolische Substanzen von verwundeten Pflanzen, detektiert. Durch Phosphorylierung aktiviert es das Protein VirG, welches wiederum als transkriptionaler Faktor die Expression der *vir* Gene steuert. Die Aktivierung des *vir*-Systems wird auch durch externe Faktoren, wie pH-Wert und Temperatur, gesteuert (Gelvin, 2000).

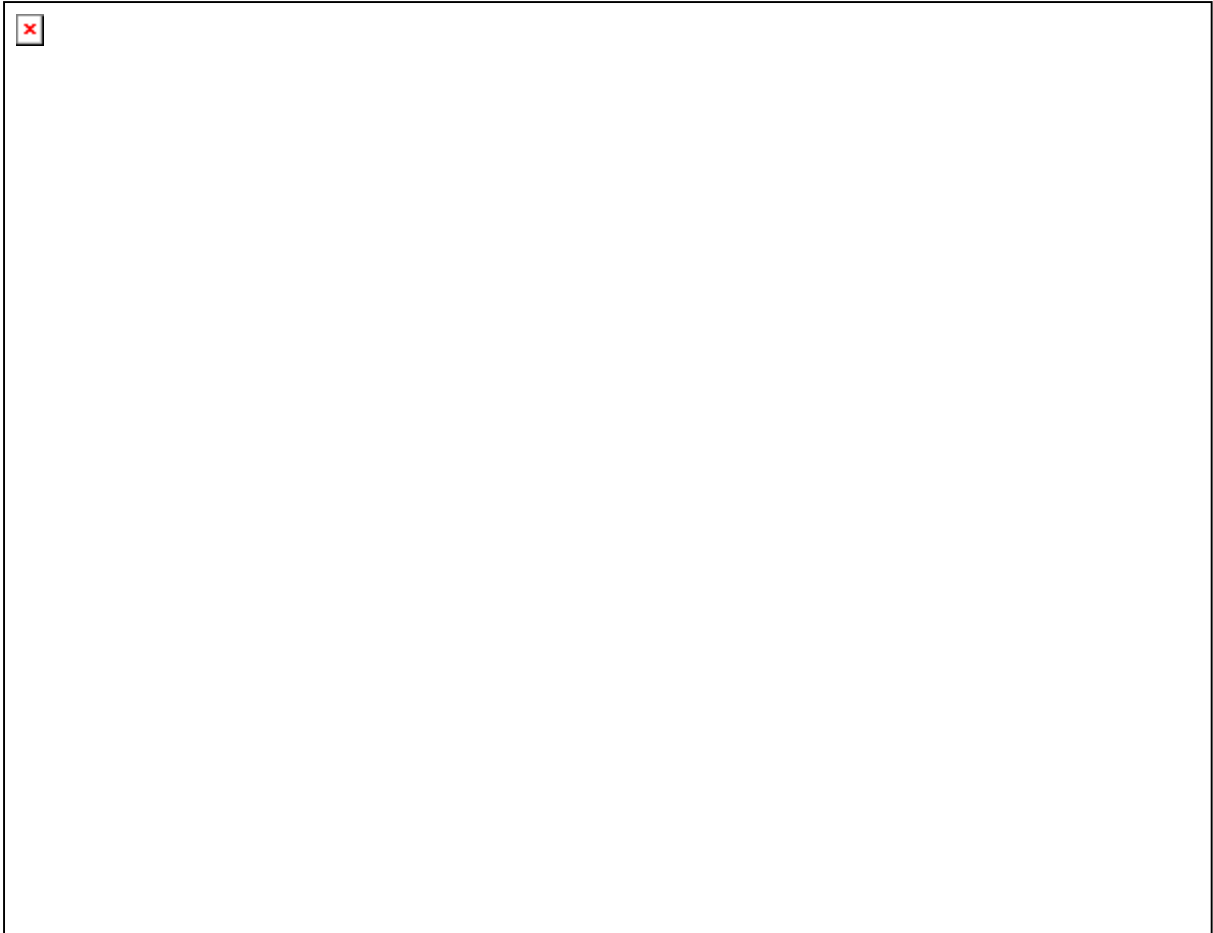


Abb. A.4: Schematische Darstellung der *Agrobacterium*-vermittelten genetischen Transformation; Quelle: Tzfira und Citovsky (2006); 1: Erkennung und „Andocken“ des Bakterium an die Pflanzenzelle; 2: Erkennung der pflanzlichen Signale durch VirA /VirG; 3: Aktivierung der *vir* Genregion; 4: Generierung einer mobilen T-DNA durch das VirD1/D2-Komplex; 5: Transport des T-Komplexes zum Cytoplasma der Wirtszelle; 6: Assoziation des T-Komplexes mit VirE2; 7: Transport zum Nukleus der Wirtszelle; 8: Rekrutierung der T-DNA zum Punkt der Integration; 9: Abstreifen der eskortierenden Proteine; 10: Integration in das Wirtsgenom

Bildung des T-DNA Transferkomplexes

Die VirD1 und VirD2 Proteine erkennen die beiden Bordersequenzen und trennen eine einsträngige T-DNA-Kopie aufgrund ihrer Endonukleasenaktivität aus dem Plasmid heraus. Im Anschluss bleibt das VirD2 Protein kovalent am 5'Ende gebunden

um den Abbau der einsträngigen T-DNA durch Exonukleasen zu verhindern (Dürrenberger et al., 1989).

Der T-DNA-Transfer

Der T-DNA-Protein-Komplex muss über seinen Weg zum pflanzlichen Nucleus drei Membranen, die Zellwand und den zellularen Raum passieren. Der genaue Mechanismus ist noch nicht in einzelnen Details geklärt, es ist jedoch unwahrscheinlich, dass aufgrund der Struktur des Cytoplasmas, welches eine Vielzahl an Microtubulis, Actin und ein filamentöses Netzwerk enthält, der Transport durch Brownsche Diffusion erfolgt. Eher wird angenommen, dass, ähnlich wie bei Virus DNA, ein aktiver interzellulärer Transportmechanismus der Wirtszelle genutzt wird.

Als gesichert gilt, dass der Komplex von dem VirE2 Protein umhüllt wird, was zum einem wiederum den Angriff von Nucleasen verhindert und zum anderen das Passieren der Membranen erleichtert. Sowohl VirD2 als auch VirE2 interagieren mit Proteinen der Wirtszelle, so dass vermutlich eine kombinierte Aktion von bakteriellen und pflanzlichen Proteinen (AtKap α und VIP1), sowie ein aktiver Transportmechanismus für die Translokation des T-DNA-Komplexes benötigt wird (Tzfira und Citovski, 2006).

Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom

Innerhalb des Nucleus muss der T-DNA-Komplex zu seinem Integrationspunkt gelangen und seine begleitenden Proteine abstreifen. Der Komplex interagiert hierbei mit den Wirtsproteinen VIP1, CAK2M und einem TATA-Box bindenden Protein (TBP), die dem Transkriptionsmechanismus angehören. Vermutlich führen diese Proteine den T-DNA-Komplex zu der Integrationsstelle, wobei auch hier der genaue Mechanismus, wie auch die Integration der T-DNA in das Wirtsgenom, nicht geklärt ist. Vermutlich benötigt dieser Schritt die Paarung von wenigen Basen (Mikrohomologien) als eine Art *pre-annealing* Schritt zwischen T-DNA und Pflanzen-DNA. Diese Homologien sind sehr gering und benötigen keine hohe Spezifität. Zwei Theorien werden zur Zeit über den Einbau der T-DNA in die Pflanzen-DNA diskutiert: das *double-strand-break repair* Modell und das *single-strand-gap repair* Modell. Bei letzterem Modell findet das 3'-Ende der T-DNA Homologien mit der Pflanzen-DNA und bildet eine Lücke am 3'-5'-Strang der Pflanzen-DNA. Die verdrängte DNA wird sofort von Endonucleasen an der 3'-Position der Lücke entfernt, wodurch das 5'-Ende

mit VirD2 mit einem Nukleotid des 5'-3'-Pflanzen-DNA-Strang bindet. Der 3' überhängende Teil der T-DNA und die verdrängte Pflanzen-DNA werden verdaut. Ist die T-DNA im 3'-5'-Strang eingebaut und der gegenüberliegende Pflanzen-DNA-Strang entfernt, wird durch Reparaturmechanismen der Pflanze der gegenläufige Strang gebildet. Bei der *double-strand-break repair* Theorie wird davon ausgegangen, dass die Integration mit einem Doppelstrangbruch der Pflanzen-DNA beginnt und die T-DNA zwischen die Bruchstellen ligiert wird. Grundsätzlich ist die erfolgreiche Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom stark abhängig von DNA-Reparaturmechanismen des Wirtes (Tzfira et al., 2004).

A.3.4 Regeneration und Selektion transgener Pflanzenzellen

Bei gentechnologischen Züchtungsexperimenten muss nach erfolgreicher Transformation der Pflanzenzelle aus dieser eine neue transgene Pflanze generiert werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation erfolgt in der Regel unter sterilen Laborbedingungen an präparierten Gewebestücken der zu transformierenden Pflanzen, aus denen sich unter Hormoneinfluss neue Pflanzen regenerieren lassen. Häufig werden bei dicotyledonen Pflanzenarten *in vitro* Blattexplantate verwendet, aber auch andere Gewebearten wie z.B. Blütenblätter, Stängel oder Wurzelabschnitte können mit Hilfe des *Agrobacterium* transformiert werden. Die Entwicklung von Regenerationsprotokollen ist für die Umsetzung von gentechnischen Züchtungsprogrammen eine unerlässliche Voraussetzung.

Die Selektion transgener Pflanzenzellen von nicht transgenen Zellen erfolgt über einem auf der T-DNA lokalisierten Markergen. Hierbei hat sich über lange Zeit der Einsatz von Antibiotika- und Herbizidresistenzmarkergenen bewährt, wie z.B. das *nptII* Gen für die Neomycinphosphotransferase, das eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin bewirkt. Die geringe Akzeptanz der Öffentlichkeit gegenüber gentechnisch veränderten Organismen (GVO) liegt unter anderem in der Verwendung solcher Antibiotikaresistenzmarker begründet, so dass neue Selektionssysteme entwickelt wurden und teils auch erfolgreich eingesetzt werden. So wurden z.B. Vektoren mit dem Cre-*lox*-System konstruiert, bei denen das Markergen, häufig ein Antibiotikaresistenzgen, zwischen zwei *lox*-Motiven kloniert wird, die nach erfolgreicher Transformation und Selektion von der Cre-Rekombinase erkannt und geschnitten werden können. Die Rekombinase wird dabei in der Regel durch induzierbare Promotoren aktiviert, kann aber auch durch Kreuzungen oder erneute Transformation eingeschleust werden (Dale und Ow, 1991). Weitere

rekombinante Systeme sind das FLP/*flr*- (Kilby et al., 1995) und das R-*RS*-System (Onouchi et al., 1995). Neben dieser sogenannten *site-specific* Rekombination gibt es die homologe Rekombination. Hierbei geht der homologen Rekombination (HR) ein Doppelstrangbruch (DSB) voraus. DSBs können durch transiente Expression von Restriktionsenzymen an der transgenen Restriktionsstelle ausgelöst werden, wodurch es im Anschluss zu HR aber auch zu sogenannten *non-homologous end joining* (NHEJ) kommen kann (Gorbunova und Levy, 1999). Im Fall der Transformationsanwendung kann das Markergen zwischen zwei seltenen Restriktionsstellen, wie z.B. I-SceI, kloniert werden. Durch Induktion eines DSB wird das Markergen entfernt und durch HR oder NHEJ ersetzt (Siebert und Puchta, 2002). Eine weitere Möglichkeit zur Eliminierung der Markergene in der transgenen Pflanze ist die Kotransformation. Hierbei bestehen im Prinzip drei Möglichkeiten das Zielgen und Markergen zu transformieren: auf separierten T-DNAs auf einem Vektor, zwei Binärvektoren in einem *Agrobacterium*-Stamm oder mit zwei verschiedenen *Agrobacterium*-Stämmen. Im Anschluss kann das Markergen aus der transgenen Pflanze ausgekreuzt werden. (Puchta, 2003).

Auch *transposable elements* können für den Erhalt markerfreier transgener Pflanzen eingesetzt werden. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten: das Markergen wird in ein mobiles Element gesetzt und geht nach Transposition verloren (Gorbunova und Levy, 2000; Ebinuma et al., 1997), oder aber das Zielgen wird vom originalen Locus translokiert (Goldsborough et al., 1993).

Parallel zu der Entwicklung der Markereliminierung entstanden auch neue Marker, die anders als beim Einsatz von Antibiotika oder Herbiziden die untransformierten Zellen nicht aktiv abtöten, sondern transgenen Zellen einen metabolischen Vorteil verleihen. Solche Marker werden als *screenable* oder alternative Marker bezeichnet und werden in Kombination mit einem nichttoxischen Selektionsagens eingesetzt, wie z.B. bei der Xylose-Isomerase (Haldrup et al., 1998), der 2-Deoxyglukose-6-Phosphatase aus Hefe (Kunze et al., 2001) und der Phosphomannose-Isomerase (Joersbo et al., 1998; Negretto, 2000). Auch der Einsatz von Enzymen die in den Phytohormonmetabolismus eingreifen, wie die Isopentenyltransferase der T-DNA des Agrobakteriums, ist möglich (Ebinuma et al., 1997).

Weiter besteht die Möglichkeit ohne Markergene zu transformieren. Hierbei sind die Transformationsraten entsprechend gering. Zusätzlich bedarf es eines hohen Aufwands das putativ transgene Material im Anschluss zu überprüfen. Möglich ist

aber eine Erhöhung der Transformationsrate z.B. durch die Verwendung eines supervirulenten *Agrobacterium*-Stammes. Neuere Ansätze verfolgen die Idee, die Einführung fremder DNA in das pflanzliche Genom weitestgehend zu reduzieren, z.B. durch die Verwendung pflanzlicher Promotoren, Terminatoren und Bordersequenzen. Solche Pflanzen-Transfer-DNAs (P-DNA) könnten anstelle der T-DNA durch Agrobakterien übertragen werden. Bei Transformation mit einem pflanzenspezifischen Zielgen könnten die als *Intragenic* oder Cisgenic[®] bezeichneten Pflanzen eine höhere Akzeptanz der Öffentlichkeit bzw. des Verbrauchers erzielen (Rommens, 2004). Einige pflanzliche DNA-Abschnitte mit Border-Eigenschaften wurden bereits identifiziert und erfolgreich in Transformationsexperimenten getestet (Rommens et al., 2005; Richardson et al., 2007). Problematisch beim Einsetzen derartiger P-DNAs in das Ti-Plasmid könnten die, auch bei „üblichen“ Transformationen beobachtete, *backbone* Integration in das pflanzliche Genom sein. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die transferierte DNA häufig zusätzliche, Vektorsequenzen enthält, die über den *Left-* und *Rightborder* hinausgehen, und somit bakterielle genetische Elemente wie den Replikationsstart oder zusätzliche Antibiotikaresistenzgene übertragen werden können und daher unerwünscht sind. *Backbone* Integrationen wurden z.B. mit Häufigkeiten von 50 % bis 85 % bei Solanaceaeen wie Tomaten und Kartoffeln (Hanson et al., 1999) und mit 62 % in *Arabidopsis* (Wenck et al., 1997) beobachtet.

Ein weiteres Thema der letzten Jahre ist die Transformation von Plastiden, da hierbei zum einen die Verbreitung des transgenen Materials über Pollenflug vermieden werden kann, und zum anderen eine sehr hohe Proteinproduktion des Zielgens erreicht wird, was diese Methode insbesondere für Anwendungsgebiete wie das *molecular farming* interessant macht. Da jedes Plastid die gleiche DNA enthält, kann das Plastidengenom mit bis zu 10.000 Kopien in einer Zelle vorkommen, wodurch die hohe Proteinproduktion zustande kommt (Bock, 2001; Maliga, 2002). Auch das Markerprotein kann nach der Plastidentransformation 10 % des gesamten löslichen Enzymanteils der Zelle ausmachen und ist daher unerwünscht. Auch bei diesen Transformationsmethoden wird daher das Markergen z.B. durch rekombinante Systeme, transiente Kointegration oder Segregation durch Kotransformation entfernt (Lutz und Maliga, 2007).

A.4 *Rhododendron simsii* Planch.

Die Rhododendren sind eine Gattung aus der Familie der *Ericaceae*, die über 1.000 Arten umfasst, welche in bis zu 12 Untergattungen, wie z.B. *Pentanthera* zu der die winterharten und laubabwerfenden Azaleen gehören, gegliedert werden. Die Untergattung *Tsutsusi* beinhaltet 66 überwiegend immergrüne Azaleenarten, so auch die *Rhododendron Simsii*-Hybride. Der Hauptelter der heutigen Topf- oder Zimmerazalee ist *Rhododendron simsii*, dessen Heimat Ostasien, insbesondere die bergigen Landschaften in China, Thailand und Burma, ist. Neben *Rhododendron simsii* sind vermutlich noch drei weitere Arten der Untergattung *Tsutsusi* in die heutige Hybride eingegangen: *R. indicum*, *R. mucronatum* und *R. scabrum* (Vogel, 1982).

Die ersten Azaleen wurden bereits im 17. Jahrhundert nach Europa eingeführt, fanden aber erst im 19. Jahrhundert von England über Frankreich, Belgien und Deutschland Verbreitung. Während in England sich die züchterische Arbeit auf die heutigen Gartenformen konzentrierte, wurde auf dem Kontinent insbesondere die Züchtung der *Rhododendron*-*Simsii*-Hybriden vorangetrieben. Die meisten der inzwischen weltweit geschätzten 2.000 Sorten sind durch Sportbildung entstanden, die vegetativ vermehrt werden. Das heutige Sortiment besteht daher zum großen Teil aus nahverwandten Sortengruppen (z.B. „Helmut Vogel“-Gruppe, „Knut Erwen“-Gruppe), die sich meist in der Blütenfarbe, jedoch kaum in ihren Wuchseigenschaften unterscheiden (Horn, 1996).

Mit jährlich 25 Millionen produzierten Pflanzen zählt die Topfazalee zu den wirtschaftlich wichtigsten Zierpflanzenarten in Deutschland. Die „Beschreibende Sortenliste“ für Topfazaleen des Bundessortenamtes (2000) umfasst derzeit 143 Sorten, deren Blütenfarben von Weiß, Rosa, Lachs, Rot bis Violett reichen. Neben einzelnen mehrfarbigen Sorten mit beispielsweise rotem, sternförmigen Innenbereich und weißem Rand, besteht der größte Teil des Sortiments aus einfarbigen Blüten (Abb. A5).



Abb. A5: Blütenfarben bei Azaleen

A.5 Zielsetzung

Die wenigsten Pflanzenarten decken das ganze Spektrum der Blütenfarben ab und Neuheiten bezüglich der Blütenfarbe sind das Hauptthema in der Zierpflanzenzüchtung. So auch bei *Rhododendron simsii* in deren Sortiment die Blütenfarbe Gelb fehlt. Versuche der letzten Jahre, eine gelbblühende Azalee durch interspezifische Kreuzungen mit weiteren *Rhododendron*-Arten zu erhalten, führten bisher aufgrund verschiedener präzygotischer oder postzygotischer Barrieren nicht zum Erfolg. Zur Zeit gibt es in Belgien Bemühungen eine interspezifische Hybridisierung innerhalb der Gattung *Rhododendron* durch Anwendung des *embryo rescue*-Verfahrens zu erreichen (Eeckhaut et al., 2007). Aufgrund der umfangreichen Kenntnisse über die Bildung der Flavonoide bieten aber auch insbesondere die Methoden des *genetic engineering* eine exzellente Möglichkeit, in den Flavonoidbiosyntheseweg einzugreifen. Vorteilhaft hierbei ist das Einführen von nur einem oder weniger Genen in eine bewährte Sorte bzw. Linie, so dass definierte Eigenschaften erzielt werden können. Eine Durchmischung verschiedener Genotypen, wie bei der klassischen Kreuzung, wird dadurch vermieden und erübrigt aufwendige Rückkreuzungsarbeiten.

Viele Transformationsexperimente an ausgewählten Pflanzenarten sind in den letzten 20 Jahren publiziert worden, in denen die erfolgreiche Modifizierung der Farbe in spezifischen Gewebearten durch Eingreifen in den

Flavonoidbiosyntheseweg beschrieben wurden (Literaturüberblick in Tanaka et al., 2005; Forkmann und Martens, 2001). Voraussetzung für das *genetic engineering* ist eine genaue und gründliche Charakterisierung der Flavonoidbiosynthese in der zu modifizierenden Pflanze auf chemischer, biochemischer und molekularbiologischer Ebene. In dieser Arbeit sollen daher ausgewählte *Rhododendron-Simsii*-Sorten hinsichtlich ihres Flavonoidmusters untersucht werden und aufgrund der Ergebnisse eine geeignete Sorte für ein gentechnologisches Eingreifen ausgewählt werden. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Bildung der Blütenfarbe „Weiß“ gelegt, da vermutlich ausgehend von einer weißen Blüte eine Veränderung in Richtung gelb am erfolgsversprechendsten ist.

Als Voraussetzung für einen *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer soll zudem am Lehrstuhl ein *in vitro*-Regenerationssystem etabliert werden. Darauf aufbauend wird ein Transformationssystem zunächst basierend auf einer Antibiotikaselektion entwickelt. Der Einsatz grüner Gentechnologie und hier insbesondere die Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen für die Selektion transgener Pflanzen wird seit vielen Jahren intensiv in der Öffentlichkeit diskutiert und zumeist sehr kritisch beurteilt. Befürchtet wird vor allem eine Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen in humanpathogene Organismen. Obwohl eine Gefährdung aus wissenschaftlicher Sicht nicht gegeben ist, hat die kontroverse Diskussionen zum Beschluss einer schrittweisen Einstellung der Verwendung von Resistenzgenen für Antibiotika mit human- und veterinärmedizinischer Bedeutung innerhalb der EU geführt. Daher soll für die Transformation von *Rhododendron simsii* ein alternatives Markersystem entwickelt werden. Die Verwendung des *manA* Gens für die Mannose-6-Phosphat-Isomerase (PMI) hat sich bei einigen Pflanzenarten wie *Arabidopsis thaliana* (Todd und Tague, 2001), *Beta vulgaris* (Joersbo et al., 1998), *Citrus sinensis* (Boscariol et al., 2003) *Oryza sativa* (Lucca et al., 2001), und *Torenia fournieri* (Li, 2003) als alternatives Selektionssystem bewährt. Bei der Mannose handelt es sich um ein Stereoisomer der Glukose. Zur Nutzung der Mannose als Kohlenstoffquelle, muss diese zunächst durch das Enzym Hexokinase phosphoryliert werden, wobei Mannose-6-Phosphat entsteht. In einem anschließenden Schritt bewirkt das Enzym PMI eine reversible Isomerisierung zu Fructose-6-Phosphat, das Kohlenhydrat ist im Gegensatz zu Mannose-6-Phosphat ein Bestandteil des normalen pflanzlichen Energiestoffwechsels. Im Pflanzenreich ist die PMI jedoch, bis auf wenige Ausnahmen wie Soja und Gerste, kaum vertreten (Joersbo et al., 1998;

Privalle et al., 2000). Diese eingeschränkte Verbreitung ermöglicht es, die PMI als Selektionsmarker zu verwenden. Im Gegensatz zu dem Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen bestehen beim *manA* Gen zur Zeit keine Bedenken hinsichtlich der biologischen Sicherheit.

B Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Pflanzenmaterial

Ein Teil der für diese Arbeit verwendeten Azaleensorten wurden freundlicherweise von den Gartenbaufirmen

- Citzler Gartenbau, Gütersloh, Deutschland
- Gartenbau Holz, Weeze, Deutschland
- Lieven de Waele, Oostakker, Belgien

zur Verfügung gestellt. Für die inhaltsstofflichen, enzymologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden jährlich knospige Azaleen geliefert, die bis zum Ende der Blüte im Gewächshaus unter den in der Praxis üblichen Bedingungen behandelt wurden (Horn, 1996). Des Weiteren wurden Topfazaleen der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' gestutzt um anschließend junge Neuaustriebe für die Verwendung in der Gewebekultur zu erhalten.



Abb. B.1: Topfazaleen; vorne: Sorte 'Mevrouw Edmond Troch', hinten: Sorte 'Nordlicht'

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurde die rotblühende Sorte 'Nordlicht' und die weißblühende Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' verwendet. Der größte Teil des Sortiments war für die inhaltsstofflichen und enzymologischen Arbeiten bestimmt. Tab. B1 gibt einen Überblick über das untersuchte Sortiment:

Tab. B1: Untersuchte Sorten aus dem zur Verfügung gestellten Sortiment

Sorte	Blütenfarbe
'Anastasia'	rot
'Ballerina'	weiß
'Helmut Vogel'	rot
'Inka'	rosa
'Mevrouw Edmond Troch'	weiß
'Mevrouw Gerard Kint' bunt	rot mit weißem Rand
'Mevrouw Gerard Kint' weiß	weiß
'Nordlicht'	rot
'Petrick'	rot
'Polarstern'	weiß
'Rosa'	hellrosa
'Sachsenstern'	rot mit weißem Rand
'Schneekönigin'	weiß
'Winterperle'	weiß

Weiter wurde auf das Sortensortiment des Azaleenmuseums im Rhododendronpark in Bremen zurückgegriffen. Im Azaleenmuseum werden neben modernen Sorten ebenfalls alte, im Handel nicht mehr befindliche, Sorten kultiviert. Aus diesem Sortiment wurden 40 weißblühende und vier violettblühende Sorten inhaltstofflich untersucht. Die folgende Tabelle zeigt alle untersuchten Sorten aus dem Sortiment des Azaleenmuseums (Tab. B2):

Tab. B2: Untersuchte Sorten aus dem Sortiment des Azaleenmuseums in Bremen

Sorte	Blütenfarbe	Sorte	Blütenfarbe
'Adonia'	violett	'Pax'	weiß
'Adrien Steyert'	violett	'Perle de Saffelaere'	weiß
'Anton'	weiß	'Perle de Swynaerde'	weiß
'Avenir Alba'	weiß	'Petrick Alba'	weiß
'Coelestine White'	weiß	'Picollo'	violett
'Columba'	weiß	'Polarstern'	weiß
'Dame Blanche'	weiß	'Prinzess Josephine Charlotte'	weiß
'Delicatesse'	weiß	'Regina'	weiß
'Gloria'	weiß	'Rema'	violett
'Herme'	weiß	'Rigolletto'	weiß
'Irish Lace'	weiß	'Sakuntala'	weiß
'Laima'	weiß	'Schnee'	weiß
'Loelia'	weiß	'Tendresse'	weiß
'Madame A. Haerens alba rosea'	weiß	'Thea'	weiß
'Madame Boullard'	weiß	'Timo'	weiß
'Madame Marcel de Paepe'	weiß	'Tukuma Perle'	weiß
'Madame Papi'	weiß	'Vervaena Alba'	weiß
'Madame Wibier'	weiß	'Weiße Schäme'	weiß
'Mademoiselle Loise Cuvelier'	weiß	'Weißer Hirsch'	weiß
'Mareyke'	weiß mit violetten Sprenklen	'White Hexe'	weiß
'Niobe'	weiß	'White Lady'	weiß
'Paloma'	weiß	'Whitewater'	weiß

B.1.2 Blütenstadien

Das für enzymologische und molekularbiologische Untersuchungen eingesetzte Blütenmaterial wurde in fünf Blütenstadien eingeordnet:

- BS 1: völlig geschlossen Blütenknospen mit grünen Petalen
- BS 2: geschlossene oder leicht öffnende Blütenknospen mit beginnender Anthocyanfärbung an den Spitzen der Petalen
- BS 3: öffnende Blütenknospen mit Anthocyanfärbung zu 50 – 75 % der Petalen
- BS 4: öffnende Blütenknospe mit völlig durchgefärbten Petalen
- BS 5: komplett aufgeblühte und durchgefärbte Azaleenblüte

Folgende Abbildung zeigt die Blütenstadien der Sorte 'Nordlicht' und 'Mevrouw Edmond Troch' (Abb. B.2):



Abb. B.2: Blütenstadien (BS1-5); oben: 'Mevrouw Edmond Troch'; unten: 'Nordlicht'

B.1.3 Geräte

Folgende Geräte wurden in dieser Arbeit verwendet (Tab. B3):

Tab. B3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Tecnomara	Tecnomara GmbH (Fernwald, D)
Bio-Imaging-Analyzer	Fuji Photo (Tokyo, J)
Biolistic® PDS-1000/He	BIORAD (Hercules, USA)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg, D)
Elektrophorese-System Mini-Sub@Cell GT	BIORAD (Hercules, USA)
Elektrophorese-Spannungsquelle EPS 3500	Parmacia Biotech (Uppsala, S)
Klimaschrank RUMED Typ 1200	Rubarth Apparate (Hannover, D)
PCR-Express	Hybaid (Ashford, UK)
pH-Messgerät twinpH	Horiba (Japan)
Reinstwassersystem TKA-LAB HP 6UV/UF	TKA-GmbH (Niederelbert, D)
Thermo Block QBT2	Grant, Instr, Ltd. (Cambridgeshire, UK)
Thermocycler Autogene II	Grant
UV Transilluminator 254 nm	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Varioklav®Dampfsterilisator	H+P Labortechnik (Oberschleißheim, D)
Werkbank Gelair	Bio-Flow Technik (Meckenheim, D)
Werkbank Hera guard	Heraeus Instruments (Hanau, D)
Werkbank Laminair® Typ LB 48C	Kendro Laboratory Products (Hanau, D)
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments (Hanau, D)
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments (Hanau, D)
Zentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf (Köln, D)
Zentrifuge Biofuge 28RS	Heraeus Instruments (Hanau, D)

B.1.4 Hersteller

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Naturstoffe, Enzyme und Kits wurden von folgenden Herstellern bezogen (Tab. B4):

Tab. B4: Liste der Hersteller

Hersteller	Internetadresse
Biorad (USA)	http://www.bio-rad.com
Duchefa (NL)	http://www.duchefa.com
Eppendorf (D)	http://www.eppendorf.com
Fluka (D)	http://www.fluka.de
Invitrogen (UK)	http://www.invitrogen.com
J.T.Baker (NL)	http://www.jtbaker.com
MBI Fermentas (D)	http://www.fermentas.com
Merck (D)	http://www.merck.de
Moravek Biochemicals (USA)	http://www.moravek.com
Peqlab (D)	http://www.peqlab.de
Roche (D)	http://www.roche.com
Roth (D)	http://www.carl.roth.de
Qiagen (D)	http://www.qiagen.com
Sigma-Aldrich (D)	http://www.sial.com
Zefa Laborservice (D)	http://www.zefa-laborservice.de

B.1.5 Chemikalien, Naturstoffe und Verbrauchsmaterialien

Folgende Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden für diese Arbeit verwendet (Tab. B5):

Tab. B5: Verwendete Chemikalien, Naturstoffe und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie / Naturstoff	Hersteller	Chemikalie / Naturstoff	Hersteller
1,4- Dithio-DL-threitol (DTE)	Fluka	Kaliumjodid	Merck
2,4 Dichlorphenoxyessigsäure	Duchefa	Kaliumhydrogenphosphat	Merck
2,4- Dichlorphenoxyessigsäure	Duchefa	Kaliumnitrat	Merck
2-Isopentanyladenin	Duchefa	Kanamycin	Duchefa
4-Dimethylaminozimtaldehyd	Merck	Kobalt(II)chlorid	Merck
Acetosyringon	Duchefa	Kupfer(II)sulfat-5-hydrat	Merck
Adeninsulfat	Duchefa	Magnesium-Heptahydrat	Fluka
Agar Agar 1614	Merck	Magnesiumsulfat	Merck
Agar LP 0011	Oxoid (Wesel)	Mangan-Monohydrat	Fluka
Agarose	FMC Bioproducts	Mangansulfat	Merck
Aktivkohle	Merck	Mannose	Duchefa
Ampicillin	Duchefa	Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Ammoniak	Merck	Methanol	Merck
Ammoniumnitrat	Merck	myo-Inosit	Merck
Ampicillin	Duchefa	Na-EDTA	Merck
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	NADPH	Merck
Beefextrakt	Merck	Naphtylessigsäure	Duchefa
Benzyladenin	Duchefa	Natriumacetat	Merck
Borsäure	Merck	Natriumascorbat	Sigma-Aldrich
Bradford-Reagent	Sigma-Aldrich	Natriumborhydrat	Merck
Bromphenolblau	Merck	Natriumhydrogensulfat	Merck
Calciumchlorid	Roth	Natriummolybdat	Merck
Carbenicillin	Duchefa	NaturstoffreagenzA	Roth
Cefotaxim	Duchefa	n-Butanol	Merck
Chlorbleichlauge 12%	Nierle (Freising)	Nikotinsäure	Merck
Chloroform	Fluka	Pepton	Fluka
Cyanidinchlorid	Roth	Polyethylene glycol 1500 (PEG)	Fluka
DC-Platten 20 x 20 cm Cellulose	Merck	PVP	Sigma-Aldrich
D-Galaktose	Roth	PVPP	Fluka
D-Glukose	Duchefa	Pyridoxin	Merck
Dithioethyltriol	Sigma-Aldrich	Rifampicin	Duchefa
DMAZA	Sigma-Aldrich	Rinderserum Albumin Fraktion V	Fluka
DMSO	Duchefa	Saccharose	Merck
DNA-Längenstandards	MBI	Seesand, geglüht	Merck
dNTPs	MBI	Spermidin	Sigma-Aldrich
Dowex 1 x 2	Fluka	Streptomycin	Duchefa
Eisessig	J.T.Baker	Thiaminchlorid-hydrochlorid	Merck
EGME	Sigma-Aldrich	Thidiazuron	Duchefa
Ethanol abs.	Merck	Ticarcillin Clavulansäure	Duchefa
Ethidiumbromid	Merck	Tris	Sigma-Aldrich
Ethylacetat	Merck	Triton X-100	Fluka
Glas Beads 425-600 µM	Sigma-Aldrich	Tryptophan	Fluka
Glycin	Merck	UDP-Glukose	Sigma-Aldrich
HCl	Merck	X-Gal	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Fluka	X-Gluc	Duchefa
Hepes	Fluka	Yeast Nitrogen Base	Merck
Indolessigsäure	Merck	Zeatin	Duchefa
IPTG	Sigma-Aldrich	Zinksulfatheptahydrat	Merck
Isoamylalkohol	Merck	Zitronensäure	Merck
Isopropanol	Merck		
Kalilauge	Merck		

B.1.6 Substrate und Radiochemikalien

Für die enzymologischen Untersuchungen wurden folgende Substrate und Radiochemikalien verwendet (Tab. B6):

Tab. B6: Substrate und Radiochemikalien

Substrat/ Cosubstrat/ Radiochemikalie	Bezug /Hersteller
4-Cumaroyl-CoA	W. Heller, GSF, Neuherberg
Kaffeoyl-CoA	W. Heller, GSF, Neuherberg
[¹⁴ C]2-Malonyl-CoA (spez. Aktivität ≈ 55 mCi/mmol)	Movarek Biochemicals

B.1.7 Reaktionssysteme und Kits

Es wurden folgende Reaktionssysteme und Kits verwendet (Tab. B7):

Tab. B7: Reaktionssysteme und Kits

Reaktionssystem/ Kit	Hersteller
DNeasy Plant Mini-Kit	Qiagen
E.Z.N.A Plasmid Miniprep-Kit	Peqlab
Expand TM Hih fidelitty PCR System	Roche
pYes2.1 TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
RNA-isoltation-Kit	Invitrogen
S.c. EasyComp TM Transformation-Kit	Invitrogen
TOPO TA Cloning-Kit	Invitrogen

B.1.8 Puffer und sonstige Lösungen

CTAB-Puffer: 100mM Tris-HCl, pH 8,0
 1,4 M NaCl
 2 % EDTA,
 1 % Polyvinylpyrrolidon

TAE-Puffer: 0,2 M Tris-Acetat, pH 8,3
 1 mM EDTA

TE-Puffer : 0,5 M Tris-HCl, pH 8
 1 % EDTA

TEK-Puffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4
 1 mM EDTA
 100 mM KCl

B.1.9 Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie

Folgende Laufmittel wurden bei den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen eingesetzt (Tab. B8):

Tab. B8: Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	Zusammensetzung
CAW	10 Teile Chloroform, 9 Teile Eisessig, 1 Teil Wasser
Forestal	30 Teile Wasser, 3 Teile HCl, 10 Teile Eisessig
BAW	6 Teile n-Butanol, 1 Teil Eisessig, 2 Teile Wasser
HOAC	82 Teile Wasser, 15 Teile Eisessig, 3 Teile HCl

B.1.10 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren sterilisiert. Verwendete Phytohormone und Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben.

B.1.10.1 Bakterien- und Hefemedien

Medien für *Agrobacterium tumefaciens*:

YEB-Medium: 2 g/l Hefeextrakt
 5 g/l Pepton
 0,5 g/l MgSO₄
 5 g/l Beefextrakt
 5 g/l Saccharose
 pH 7,2

Zur Verfestigung wurde dem Medium 15 g/l Agar (Merck) zugegeben.

Medien für *Escherichia coli*:

LB-Medium: 10 g/l Pepton
 5 g/l Hefeextrakt
 0,5 g/l NaCl
 pH 7,0

Zur Verfestigung wurde dem Medium 15 g/l Agar (Merck) zugegeben.

SOC-Medium: 20 mg/l Pepton
 5 g/l Hefeextrakt
 0,6 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1 g/l MgCl₂
 3,5 g/l Glukose

Medien für *Saccharomyces cerevisiae*:

SGI-Medium: 1 g/l Pepton
 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base
 0,02 g/l Tryptophan
 20 g/l Glukose

Zur Verfestigung wurde dem Medium 15 g/l Agar (Merck) zugegeben.

YPD-Medium: 10 g/l Hefeextrakt
 20 g/l Pepton

	20 g/l	Glukose
	0,1 g/l	Adenin
YPGE-Medium:	10 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Pepton
	5 g/l	Glukose
	3 vol%	Ethanol

B.1.10.2 Pflanzenmedien

Als Basalmedium für die Gewebekultur bei *R. simsii* wurde das leicht modifizierte Nährmedium nach Anderson (1984) sowie das MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962) verwendet (Tab. B9 und Tab. B10). Den Medien wurde jeweils 7 g/l Agar (Oxoid) und 30 g/l Saccharose zugegeben

Tab. B9: **Zusammensetzung des Nährmediums modifiziert nach Anderson (1984)**

Nährstoffe			
Makronährstoffe		mg/l	mM
Kaliumnitrat	KNO ₃	480	4,7
Ammoniumnitrat	NH ₄ NO ₃	400	5,0
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	370	1,5
Natriumhydrogensulfat	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	380	2,75
Kalziumchlorid	CaCl ₂ • 2H ₂ O	440	3,0
NaFe-EDTA		73,6	200
Mikronährstoffe		mg/l	µM
Borsäure	H ₃ BO ₃	6,2	100
Mangansulfat	MnSO ₄ • H ₂ O	16,9	100
Zinksulfat	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	8,6	30
Kaliumjodid	KJ	0,30	1,8
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,25	1,1
Kupfersulfat	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,025	0,1
Kobaltchlorid	CoCl ₂ • 6H ₂ O	0,025	0,1
Vitamine		mg/l	µM
Inositol		100	560
Adeninsulfat		80	198
Thiamin-HCl		0,4	1,19

Tab. B10: Zusammensetzung des MS-Mediums nach Murashige und Skoog (1962)

Nährstoffe		mg/l	mM
Makronährstoffe			
Ammoniumnitrat	NH ₄ NO ₃	1650	20,6
Kaliumnitrat	KNO ₃	1900	18,8
Kalziumchlorid	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	3,0
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	370	1,5
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	170	1,3
Mikronährstoffe		mg/l	mM
Borsäure	H ₃ BO ₃	6,2	100
Mangansulfat	MnSO ₄ · H ₂ O	16,9	100
Zinksulfat	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	30
Kaliumjodid	KI	0,83	5,0
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	1,1
Kupfersulfat	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,1
Kobaltchlorid	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,1
NaFeEDTA		36,7	100
Vitamine		mg/l	µM
Inositol		100	560
Nikotinsäure		0,5	4,06
Pyridoxin		0,5	2,43
Thiamin-HCl		0,1	0,3
Glycin		2	26,64

B.1.11 Bakterien und Hefestämme

Agrobacterium tumefaciens:

Zur Transformation von *R. simsii* wurde der *A. tumefaciens* Stamm EHA105 und LBA4404 verwendet. Beide Stämme besitzen eine chromosomale Resistenz gegen das Antibiotikum Rifampicin. Zusätzlich trägt der Stamm LBA4404 eine Resistenz gegen das Antibiotikum Streptomycin auf dem Helferplasmid

Escherichia coli:

Verwendet wurden die *E.coli* Stämme TOP10 und TOP10F' (Invitrogen). Die Selektion wird durch α -Komplementation (blau/weiß-Screening) aufgrund einer Deletion im β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) ermöglicht. Bei dem Stamm TOP10F' ist der Lac Repressor (*lacI^q*) überexprimiert, so dass für die Expression des *lac* Promotors die Zugabe von IPTG im Selektionsmedium notwendig ist.

Saccharomyces cerevisiae:

Es wurde der diploide Hefestamm INVSc 1 (Invitrogen) für die heterologe Expression von Genen eingesetzt. Als Selektionssystem wird eine Auxotrophie der Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan, sowie die Base Uracil der transformierten Hefezellen genutzt.

B.1.12 Vektoren

pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor von Invitrogen aus dem TOPO TA Cloning[®]Kit verwendet. Der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor ist ein linearisiertes *high copy*-Plasmid, welches die Resistenzgene Ampicillin und Kanamycin trägt. Es enthält einen Replikationsstart für *E. coli*. Die multiple Klonierungsstelle liegt innerhalb des *lacZ*-Gens, was ein blau/weiß-Screening ermöglicht. Der Vektor enthält an der Insertionsstelle Thymin-Überhänge.

pYES2.1/V5-His-TOPO[®]

Der Hefexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO[®] (Invitrogen) ist ein linearisiertes *high copy*-Plasmid, welches ein Ampicillin-Resistenzgen trägt. Es enthält jeweils einen Replikationsstart für *E. coli* und *S. cerevisiae*. Der pYes-Vektor enthält einen mit Galaktose induzierbaren GAL1-Promoter. Die Selektion erfolgt mit Hilfe eines Ampicillin-Resistenzgens und des URA3-Gens als Komplementationsmarker. An der Insertionsstelle befinden sich Thymin-Überhänge.

pBI121

Für die Transformation von *R. simsii* wurde der Binärvektor pBI121 (Clontech) verwendet. Außerhalb der T-DNA enthält er jeweils einen Replikationsstart für *A. tumefaciens* und für *E. coli* (*ori* und *ori v*). Auf der T-DNA besitzt der Vektor zur Selektion transgener Pflanzenzellen das Kanamycin-Resistenzgen *nptII*. Vor dem *nptII*-Gen liegt der NOS Promoter der Nopalinsynthase. Die T-DNA enthält zusätzlich das *E. coli* β -Glucuronidase (GUS) Reportergen *uidA* unter der Kontrolle des 35S-Promoter des Blumenkohlmosaikvirus. Zu jedem Promoter ist ein NOS-Terminator zugeordnet (Abb. B.3).

pNOV2819

Der binäre Vektor pNOV2819 (Syngenta) enthält zur Selektion transgener Pflanzenzellen das Gen *manA* für die Phosphomannose Isomerase (PMI), welches von dem konstitutiven CMPS-Promoter des *caestrum yellow leaf curling virus* und dem NOS-Terminator flankiert wird. Außerhalb der T-DNA besitzt pNOV2819 ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Spectinomycin und einen Replikationsstart (Abb. B.3).

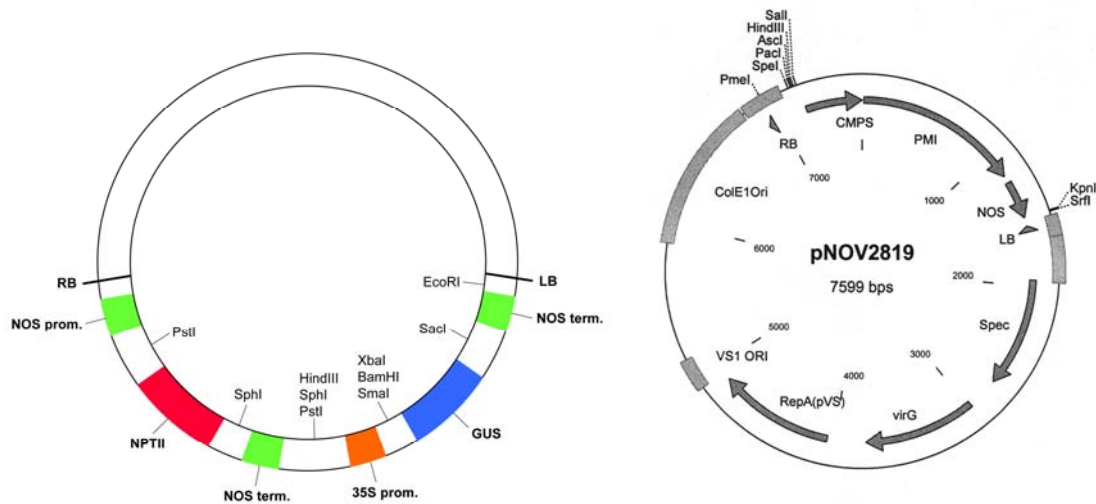


Abb. B.3: Plasmide für die Pflanzentransformation; rechts: pBI121 Plasmid mit Restriktionsschnittstellen; links: pNOV2819 Plasmid mit Restriktionsschnittstellen (*Quelle: <http://www.syngenta.com>*)

B.2 Methoden

B.2.1 Blüteninhaltsstoffanalysen

B.2.1.1 Extraktion und Aufbereitung der Flavonoide

Zur Herstellung von Extrakten für Inhaltsstoffanalysen wurden von jeder untersuchten *R. simsii*-Sorte 1 g Petalen (vollaufgeblühte Blüten) in 10 ml Lösungsmittel extrahiert. Zur Gewinnung von anthocyanfreien Extrakten diente als Lösungsmittel MeOH. Für die Anthocyanidin-Untersuchungen wurden die Blütenpetalen in MeOH-HCl (1 %) überführt.

Die Extraktion erfolgte für mindestens 72 Stunden bei 4°C im Dunkeln.

Der erhaltene Rohextrakt wurde anschließend im Rotationsverdampfer auf 1 ml Endvolumen eingengt.

In der Regel liegen in der Pflanze die Flavonoide glykosidisch gebunden vor. Um für die entsprechenden Untersuchungen an die Aglyka zu gelangen, erfolgte eine saure Hydrolyse. Der Rohextrakt wurde hierzu mit 2 N HCl im Verhältnis 1:1 bei 95°C für 30 min inkubiert.

Die erhaltenen Produkte wurden mit Isoamylalkohol (zur Gewinnung der Anthocyanidine) bzw. mit EtOAc (zur Gewinnung der restlichen Flavonoide) im Verhältnis 2:1 extrahiert.

B.2.1.2 Herstellung von Standards

Die als Standards verwendeten Flavonoide wurden von unter B.1.5 angegebenen Firmen bezogen. Die Vergleichssubstanzen Cyanidin 3-Glukosid und Pelargonodin 3-Glukosid wurden aus MeOH-HCl-Extrakte (vergl. B.2.1.1) von den Levkojen Linien 8 (enthält Cyanidin 3-Glukosid) bzw. 16 (enthält Pelargonidin 3-Glukosid) isoliert. Hierzu wurde der Rohextrakt auf DC-Platten aufgetragen und im Laufmittel HOAC aufgetrennt. Die Cyanidin 3-Glukosid- bzw. Pelargonidin 3-Glukosid Banden wurden mitsamt der Celluloseschicht herausgekratzt und erneut extrahiert. Anschließend wurden die Cellulosebestandteile abzentrifugiert. Der Überstand konnte als Vergleichssubstanz verwendet werden.

B.2.1.3 Dünnschichtchromatographie und Detektion der Flavonoide

Die Chromatographie der Blüteninhaltsstoffe erfolgte auf Cellulose-Dünnschicht-Platten. Zur Auftrennung der Inhaltsstoffe wurden die Platten in geeignete Laufmittel gestellt (vgl. B.1.9).

Die farbigen Banden der Anthocyane und Anthocyanidine sind direkt nach der Dünnschichtchromatographie erkennbar.

Flavanone wurden durch das Besprühen der DC-Platte mit Natriumborhydrid-Lösung (100 mg NaBH_4 gelöst in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, mit Isopropanol auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt) und anschließendem Bedampfen mit 6 N HCl als rote (Naringenin) bzw. violette (Eriodictyol) Banden detektiert.

Zur Visualisierung der Stoffklassen Flavone und Flavonole wurden die DC-Platten mit konz. Ammoniaklösung bedampft und anschließend mit Naturstoffreagenz A besprüht. Bei dieser Behandlung verfärben sich das Flavon Luteolin und die Flavonole Kämpferol und Isorhamnetin gelb. Apigenin-Banden werden durch eine rotbraune Färbung und die Flavonole Quercetin, Myricetin und Rhamnetin durch eine orange Färbung sichtbar.

Die Dihydroflavonole wurden als rot-violette Banden durch den Auftrag von Zinkstaub auf die DC-Platte und anschließendem Besprühen mit 6 N HCl sichtbar gemacht.

Die Detektion der Flavan 3-ole erfolgte über das Besprühen mit 4-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) Lösung (6N HCl und EtOH im Verhältnis 1:1 mit 0,1 % DMAZA). Durch eine DMAZA-Behandlung verfärben sich Flavan 3-ole bläulich-türkis.

Zudem wurden die DC-Platten direkt nach der Chromatographie unter UV-Licht ausgewertet.

B.2.1.4 pH-Wert Messung des Blütenzellsafts

Die pH-Wert Messung des Blütenzellsafts erfolgte nach der Methode von De Vlaming et al. (1983). Blütenmaterial verschiedener Blütenstadien wurde mit entionisiertem Wasser gespült und anschließend mit entionisiertem Wasser gemörsert. Der Zellsaft wurde anschließend im pH-Messgerät (Horiba) gemessen.

B.2.2 Histologische Untersuchungen der Blütenblätter

Für histologische Studien wurden mit einer feinen Pinzette Abzüge der oberen und unteren Epidermis von Blütenblättern der Sorten 'Nordlicht', 'Mevrouw Edmond Troch' und 'Mevrouw Gerard Kint' präpariert. Die Anfertigung von Blütenquerschnittspräparaten erfolgte durch einen freihändigen Schnitt mit der Rasierklinge.

Zur Identifikation der Flavan-3-ol Verteilung im Blütengewebe bzw. in Blütenzellen wurden die Präparate mit einem DMAZA-Reagent nach Feucht et al. (2004) infiltriert (1 g DMAZA gelöst in 100 ml 1,5 N Schwefelsäure). Während einer 2 bis 10minütigen Inkubationszeit bilden die in den Zellen lokalisierten Flavan-3-ole zusammen mit DMAZA einen blauen Farbstoffkomplex. Anschließend erfolgte eine weitere Infiltration mit Wasser, bei der durch evtl. verletzte Vakuolen frei diffundierende Flavan-3-ole entfernt werden sollten. Gegebenenfalls wurde eine Plasmolyse der Zellvakuolen durch 10 %iges Kaliumnitrat ausgelöst.

B.2.3 Enzymologische Untersuchungen

B.2.3.1 Enzympräparation aus Blütenmaterial

Die Herstellung von Enzymextrakten für Enzymtests erfolgte in Anlehnung an die Präparationsmethode nach Dellus et al. (1997).

Für den Extraktionspuffer wurde 0,1 M HEPES-Puffer pH 7,5 aufgekocht und anschließend auf Eis unter Stickstoffatmosphäre abgekühlt. Unter ständigem Rühren wurden dem Puffer unter Stickstoffatmosphäre 1,5 % PEG 1500, 10 % Saccharose, 1 mM Dithioerythriol und 100 mM Na-Ascorbat zugesetzt. Der Extraktionspuffer wurde für jede Aufarbeitung frisch angesetzt.

200 mg des bei -70°C gelagerten Blütenmaterials wurden mit 200 mg PVPP in flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Dem gemahlene Blüten / PVPP-Gemisch wurde

sofort der Extraktionspuffer zugegeben. Anschließend wurde das Homogenat in Eppendorfgefäße pipettiert und bei 4°C und 17000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die entstandene Oberphase wurde in 15 ml Falconröhrchen mit 200 mg vorgelegtem Dowex 1x2 (äquibriert in Extraktionspuffer) überführt und für 10 min auf Eis leicht gerührt. Das Gemisch wurde anschließend für weitere 10 min bei 4°C und 17000 rpm zentrifugiert. Der dabei gebildete Überstand diente als Enzymquelle und wurde aliquotiert bei -70°C gelagert.

B.2.3.2 Heterologe Genexpression in Hefe

Für die heterologe Expression von Genen wurde ein Protokoll nach Pompon et al. (1996) verwendet. Als Vorkultur wurde eine Hefekolonie in 25 ml SGI-Medium ca. 24 h bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Ab einem OD₆₀₀-Wert zwischen 0,2 bis 0,4 wurde die Hauptkultur angeimpft (250 ml YPGE-Medium). Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8-1,2 erfolgte die Induktion des Galaktose-Promotors mit 27 ml steriler Galaktose-Lösung (200 g/l). Die Hauptkultur wurde bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,6 bis 1,2 bei 28°C und 200 rpm inkubiert.

B.2.3.3 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Enzymextrakte erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit Rinderserum Albumin Fraktion V (BSA).

B.2.3.4 Herstellung radioaktiv markierter Substrate

Für die enzymologischen Untersuchungen wurden [¹⁴C]-markierte Substrate verwendet. Die radioaktiv markierten Flavonoide wurden ausgehend von 4-Cumaroyl-CoA und [¹⁴C]-Malonyl-CoA nach Britsch et al. (1981) und Britsch und Grisebach (1985) hergestellt. Die für die Synthese benötigten rekombinanten Proteine wurden in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert.

Die Tab. B11 zeigt alle Substrate, rekombinanten Proteine, Kofaktoren und Puffer, die bei der Synthese der [¹⁴C]-markierten Substrate verwendet wurden.

Tab. B11: Für die Synthese radioaktiv markierter Flavonoide verwendete Substrate, Proteine, Kofaktoren und Puffer

Synthetisiertes Flavonoid	Substrat	Protein	Kofaktoren	Puffer
Naringenin	10µl [¹⁴ C]-Malonyl-CoA (110.000 dpm) 10 µl 4 Cumaroyl-CoA (1 nmol)	50 µl CHS* 10 µl CHI*		200 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)
Eriodictyol	10µl [¹⁴ C]-Malonyl-CoA (110.000 dpm) 10 µl Kaffeoyl-CoA (1 nmol)	50 µl CHS* 10 µl CHI*		200 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)
Dihydrokämpferol	[¹⁴ C]- Naringenin (30000 dpm) in EtOAc gelöst	60 µl FHT*	10 µl 2-Oxoglutarat (50 nmol), 10 µl FeSO ₄ (10 nmol), 10 µl Na-Ascorbat (1nmol)	200 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)
Dihydroquercetin	[¹⁴ C]- Eriodictyol (30000 dpm) in EtOAc gelöst	60 µl FHT*	10 µl 2-Oxoglutarat (50 nmol), 10 µl FeSO ₄ (10 nmol), 10 µl Na-Ascorbat (1nmol)	200 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)

*Proteine wurden heterolog in Hefe exprimiert

Für jede Synthese wurden 50 bis 100 Ansätze in Eppendorfgefäße pipettiert. Die in EtOAc gelösten Substrate Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin wurden vor der Synthese bis zur vollständigen Trockne in der Vakuumzentrifuge eingengt. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37°C. Die gebildeten Reaktionsprodukte wurden einschließlich evtl. verbliebener Ausgangsprodukte in EtOAc extrahiert. Hierzu wurde 2x 150 µl EtOAc zum Reaktionsansatz zugegeben. Die Ansätze wurden gevortext und für 2 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Die dabei gebildete Oberphase aus EtOAc wurde von jedem Ansatz abgenommen und vereinigt.

B.2.3.5 Standardenzymtests mit radioaktiv markierten Substraten

Der Nachweis für die Aktivität der Enzyme CHS, FHT, DFR und ANS erfolgte mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate. In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Puffer, Substrate und Kofaktoren aufgeführt (Tab. B12).

Tab. B12: Verwendete Puffer, [¹⁴C]-markierte Substrate und Kofaktoren für den Standardenzymtest

Nachzuweisendes Enzym	Substrat	Kofaktoren	Menge Enzymextrakt	Puffer
CHS	10 µl [¹⁴ C]-Malonyl-CoA (110.000 dpm) 10 µl 4 Cumaroyl-CoA (1 nmol) bzw. 10 µl Kaffeoyle-CoA (1 nmol)		x µl (0-30 µg Gesamtprotein)	200 – x µl 0,1 M KPI pH 7,5
FHT	2000 dpm [¹⁴ C]-Naringenin* bzw. 2000 dpm [¹⁴ C]-Eriodictyol*	10 µl 2-Oxoglutarat (50 nmol), 10 µl FeSO ₄ (10 nmol), 10 µl Na-Ascorbat (1nmol)	x µl (0-50 µg Gesamtprotein)	200 – x µl 0,1 M KPI pH 6,5
DFR	1500 dpm [¹⁴ C]-Dihydrokämpferol* bzw. 1500 dpm [¹⁴ C]-Dihydroquercetin*	10 µl 20 µM NADPH (0,2 nmol)	x µl (0-50 µg Gesamtprotein)	200 – x µl 0,1 M KPI pH 6,5
ANS	Leukopelargonidin	10 µl 2-Oxoglutarat (50 nmol), 10 µl FeSO ₄ (10 nmol), 10 µl Na-Ascorbat (1nmol)	100 µl heterolog exprimierter Proteinextrakt	300 µl 0,1 M KPI pH 6,5

*Substrat gelöst in EtOAc

Die in EtOAc gelösten Substrate wurden vor der Reaktion in der Vakuumzentrifuge bis zur vollständigen Trockne eingengt. Nach dem Pipettieren aller Komponenten in Eppendorfgefäße erfolgte die Reaktion für 30 min bei 30°C. Anschließend wurde der Enzymtest durch die Zugabe von 2x 150 µl EtOAc abgestoppt. Durch Vortexen und zweiminütiges Zentrifugieren bei 14000 U/min wurden die gebildeten Flavonoide im EtOAc extrahiert. Der so erhaltene Extrakt wurde vom Reaktionsansatz abgenommen, in der Vakuumzentrifuge eingengt und auf Dünnschicht-Celluloseplatten aufgetragen. Die Celluloseplatten wurden zur Auftrennung der Reaktionsprodukte in das Laufmittel CAW gestellt.

Für den Nachweis der ANS-Aktivität wurde zunächst das Substrat Leukopelargonidin durch eine 30minütige Vorinkubation von Dihydrokämpferol mit NADPH und heterolog exprimierter DFR im Reaktionsansatz gebildet. Unmittelbar im Anschluß wurde die ANS-Reaktion durch Zugabe des Proteinextraktes und der Kofaktoren im gleichen Reaktionsansatz gestartet. Die Extraktion der Reaktionsprodukte erfolgte nach weiteren 30 min wie oben beschrieben

B.2.3.6 Nachweis der radioaktiv markierten Flavonoide und Auswertung der Enzymtests

Nach Auftrennung der radioaktivmarkierten Enzymprodukte auf Dünnschicht-Celluloseplatten in geeigneten Laufmitteln (siehe B.1.9) wurden diese zur Visualisierung der radioaktiven Signale auf Expositionsplatten (Phospho-Imager-Screen, Fujix) gelegt. Nach einer Expositionszeit von wenigstens vier Stunden wurden die Screens im Phosphoimager (Fujix Bas 1000) eingelesen und ausgewertet (Software Basreader 2.21 und TINA 2.10i, raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt). Für die Charakterisierung und die quantitativen Untersuchungen der Enzyme FHT und DFR wurden die Aktivitätswerte (in dpm) des eingesetzten Substrats und der Reaktionsprodukte bestimmt. Die Enzymaktivität wurde als Quotient aus dem dpm-Wert des Produktes und den addierten Werten von Produkt und Substrat errechnet. Zur Bestimmung der CHS-Aktivität wurde zusätzlich 10 % der wässrigen Unterphase des Reaktionsansatzes auf eine DC-Platte aufgetragen. In der Unterphase verbleibt das als Substrat eingesetzte [¹⁴C]-Mal-CoA. Die Aktivität des [¹⁴C]-Mal-CoA in dpm wurde anschließend auf 100 % hochgerechnet. Für die Berechnung der CHS-Aktivität wurde der Umsatz von [¹⁴C]-Mal-CoA zu [¹⁴C]-Naringenin in Prozent ermittelt.

B.2.3.7 Enzymtest mit nicht radioaktiv markierten Substraten

Der Nachweis der Enzyme CHI, ANR und FGT erfolgte mit nicht radioaktiv markierten Substraten, da die Reaktionsprodukte entweder, wie im Fall der FGT, direkt nach der Dünnschicht-Chromatographie sichtbar waren oder durch die Behandlung mit einem Färbereagenz visualisiert wurden (ANR). Die Aktivität der CHI wurde am Photometer durch den Abbau des farbigen Substrats bestimmt.

CHI-Standard Enzymtest

Die CHI-Aktivität wurde nach Hahlbrock et al. (1970) photometrisch bestimmt. Hierbei wurde die enzymatische, stereospezifische Zyklisierung des gelben Substrats 2',4',6',4-Tetrahydroxychalkon (THC) zum farblosen Naringenin gemessen.

In einem Reaktionsansatz wurden in einer Einmal-Küvette zu einem Gesamtvolumen von 1000 µl pipettiert:

20 µl	2',4',6',4 Tetrahydroxychalkon, 4 mg in 1 ml EGME gelöst
x µl	Enzymextrakt (25 µg Gesamtprotein)
980 – x µl	0,1 M KPi, pH 8,0

Die Abnahme des Chalkons wurde am Spektralphotometer bei 385 nm (Absorptionsmaximum des THC) gegen eine Referenzküvette ohne Chalkon gemessen. Die Messungen erfolgten alle 5 s über eine Versuchsdauer von 2 min. In jeder Versuchsreihe wurde ein Ansatz ohne Enzym untersucht um die spontane Isomerisierung des Chalkons zu Naringenin zu bestimmen. Jede Messung wurde dreimal wiederholt. Aus den einzelnen Extinktionswerte der enzymatischen und der nichtenzymatischen Reaktion wurden jeweils die Regressionsgeraden berechnet. Die Differenz der Steigung beider Geraden gab den Anteil der enzymatischen Reaktion wieder.

ANR-Standard Enzymtest

Der ANR-Test erfolgte nach einer am Lehrstuhl entwickelten Standardmethode (Helmich, 2005). Ein Ansatz enthielt ein Gesamtvolumen von 500 μ l:

50 μ l	Cyanidinchlorid (10 mM), gelöst in EGME
50 μ l	NADPH (20 mM)
x μ l	Enzymextrakt (50 μ g Gesamtprotein)
400 – x μ l	0,1 M KPi, pH 5,5

Der Reaktionsansatz wurde für 40 min bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Durch zweimalige Zugabe von 500 μ l EtOAc wurde der Enzymtest abgestoppt und die Reaktionsprodukte extrahiert. Die Oberphase wurde abgenommen, in der Vakuumzentrifuge eingeeengt und auf Dünnschicht-Celluloseplatten aufgetragen. Für die Chromatographie wurde das Laufmittel BAW verwendet. Nach vollständiger Trocknung der DC-Platte wurde diese mit 0,1%iger DMAZA-Lösung besprüht. Im Reaktionsansatz gebildete Flavan 3-ole verfärbten sich nach dieser Behandlung grünlich-blau. Zur Auswertung des enzymatischen Umsatzes bei quantitativen Untersuchungen wurden die DC-Platten eingescannt und mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Quantity One[®] (Bio-Rad) ausgewertet. Als Referenz wurde auf jede auszuwertende DC 0,02 μ g, 0,04 μ g, 0,06 μ g und 0,08 μ g Epicatechin-Standard aufgetragen.

FGT-Standard Enzymtest

Der Nachweis der FGT erfolgte in Anlehnung an Teusch (1986). Der Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 μ l:

5 μ l	Cyanidin (30 nmol), gelöst in EGME
5 μ l	UDP-Glukose (70 nmol)

x µl	Enzymextrakt (50 µg Gesamtprotein)
90 – x µl	0,1 M KPi, pH 7,0

Der Enzymtest wurde bei 30°C für 30 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurde mit 2 x 100 µl Folch Reagenz (CHCl₃ : MeOH (0,5 % HCL) 2:1) extrahiert. Die Oberphase wurde abgenommen und auf eine DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte in dem Laufmittel HOAC. Das gebildete Cyanidin 3-O-Glukosid war direkt nach der Chromatographie durch eine rötliche Bande sichtbar.

B.2.3.8 Optimierung der Standardbedingungen für Enzymtests

Um für eine Charakterisierung einzelner Enzyme die Standardbedingungen für Enzymtests so gestalten zu können, dass eine Steigerung der Produktbildung möglich ist, wurde die Protein- und Zeitlinearität für die Enzyme CHS, FHT und DFR untersucht. Zudem ist durch Bestimmung der Proteinkonzentration und der Inkubationsdauer im linearen Bereich ein quantitativer Vergleich der Enzymaktivität zwischen verschiedenen Azaleensorten möglich. Untersuchungen zur Proteinlinearität wurden zusätzlich an dem Enzym CHI durchgeführt.

Proteinlinearität

Um den Proteinkonzentrationsbereich zu ermitteln, bei dem die gebildete Produktmenge linear von der eingesetzten Proteinmenge abhängt, wurden Enzymtests mit verschiedenen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Zu Ermittlung der Proteinlinearität der CHS und der FHT wurden Enzymkonzentrationen von 0 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg und 30 µg eingesetzt. Bei den DFR-Testreihen wurden 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg und 40 µg Protein verwendet. Die übrigen Testbedingungen entsprachen dem Standardenzymtest.

Zur Messung der Proteinlinearität der CHI wurden 0 µg, 6,6 µg, 13,2 µg, 19,7 µg, 26,3 µg, 39,5 µg, 52,6 µg Enzymextrakt verwendet. Auch hier entsprachen die weiteren Testbedingungen dem Standardenzymtest.

Zeitlinearität

Zur Ermittlung der Zeitlinearität wurden die Enzymtests für die CHS, FHT und DFR gemäß der Standardbedingungen durchgeführt. Die Ansätze wurden für 15, 30, 45, 60 und 75 min inkubiert.

B.2.3.9 Charakterisierung der Enzyme

Zur Charakterisierung wurden die Flavonoidenzyme CHS, FHT und DFR bezüglich ihres Temperatur- und pH-Optimums, sowie ihrer Substratspezifität untersucht.

Temperaturoptimum

Zur Ermittlung der Temperaturoptima wurden die enzymatische Reaktion der CHS, FHT und DFR bei den Inkubationstemperaturen 15°C, 22°C, 30°C, 37°C und 42°C gemessen. Die weiteren Bedingungen entsprachen dem Standardenzymtest.

pH-Optimum

Die Messung der pH-Optima der Enzyme CHS, FHT und DFR erfolgten unter Standardbedingungen. Es wurden jeweils fünf parallele Versuchsreihen bei pH-Werten von 6,0 bis 8,0 in pH 0,5 Schritten durchgeführt.

Substratspezifität

Für die Untersuchung der Substratspezifität der CHS wurden die Substrate p-Cumaroyl-CoA und Kaffeooyl-CoA verwendet. Die Testbedingungen entsprachen dem CHS-Standardtest. Für die FHT wurden, ebenfalls unter Standardbedingungen, die Substrate Naringenin und Eriodictyol eingesetzt. Die DFR wurde auf Substratspezifität bezüglich Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin untersucht.

B.2.4 Molekularbiologische Methoden

B.2.4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Folgende Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) oder nach Abgaben des Herstellers durchgeführt:

- Agarosegelelektrophorese
- Fällungen von Gesamt-RNA, cDNA und Plasmiden mit Ethanol und Isopropanol
- Reinigung von PCR-Produkten und Plasmiden („PCR Purification“ -Kit, Qiagen)
- Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren
- Klonierung von PCR-Produkten und Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen („TOPO T/A Cloning“ -Kit, Invitrogen) bzw. kompetenten *S. cerevisiae* Zellen („S.c. Easy CompTM Transformation“ –Kit, Invitrogen)
- Restriktionsanalysen

B.2.4.2 Extraktion von genomischer DNA

Zur Extraktion der genomischen DNA wurden je nach Menge des Pflanzenmaterials die *in vitro*-Sprosse in einem Eppendorfgesäß unter der Zugabe von flüssigem Stickstoff mit einer am Ende zusammengeschnittenen 1000 µl Pipettenspitze zerstoßen oder mit einem Mörser pulverisiert. Auf 20 bis 50 mg des homogenisierten Materials wurden 500 µl CTAB-Puffer, 5 µl Mercaptoethanol und 5 µl RNase (1 mg/ml) zugegeben und der Ansatz gut gevortext. Nach einer 10minütigen Inkubation bei 65°C wurden 500 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) dem Gemisch zupipettiert, gevortext und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die entstandene wässrige Oberphase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Anschließend erfolgte eine Fällung der Nukleinsäure mit 500 µl EtOH (100 %) und erneute Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm. Das entstandene Pellet wurde ein- bis zweimal mit kaltem 70 %igem EtOH gewaschen. Die DNA wurde im Anschluss in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

B.2.4.3 Extraktion von Plasmid-DNA

Plasmid DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe „Plasmid Miniprep“ –Kit von Peqlab nach Herstellerangaben isoliert.

B.2.4.4 Extraktion von Gesamt-RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Blütenmaterial von Azaleen gelang in ausreichenden Mengen und in guter Qualität mit dem *RNA Isolation*-Kit von Invitrogen.

B.2.4.5 Reverse Transkription

Isolierte RNA aus Azaleenblütenmaterial wurde mit Hilfe der M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) in ihre komplementäre cDNA umgeschrieben. Als Primer wurden der Oligo(dT) oder der *adapter* Primer (AP) verwendet. Der AP-Primer besitzt neben dem Poly-dT-Anteil einen spezifischen, 20 Nukleotid großen Adapterbereich, der bei einer nachfolgenden 3'RACE PCR genutzt wird. Für eine anschließende 5'RACE PCR wurde ein genspezifischer Primer (GSP) verwendet.

Der Ansatz wurde gemäß Herstellerangaben mit 1 bis 5 µg Gesamt-RNA und 25 pmol Primer bei einem Gesamtvolumen von 25 µl für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde der Reaktionspuffer (Promega) und dNTPs (12,5 nmol) zugegeben. Nach einer 2minütigen Vorinkubation wurde die

Transkriptase (200 U) dem Ansatz zugegeben. Die Synthese erfolgte für 60 min bei 42°C.

B.2.4.6 Methoden der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR

Die Standard-PCR enthielt in einem Gesamtvolumen 1 x Polymerase Puffer (Promega), 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1 – 4 µl cDNA und jeweils 0,2 µl 3'- und 5'Primer. Standardmäßig wurde 1 u *Taq* DNA Polymerase (Promega) verwendet.

Die Amplifikation erfolgte bei 25 bis 35 Zyklen (Denaturierung 45 sec 90°C, Annealing 60 sec 45 – 60°C, Extension 60 sec 72°C) mit einer anfänglich 2minütigen Denaturierung und einer abschließenden 10minütigen Extension). Bei evtl. notwendigen Optimierungen der Standard-PCR, wurde insbesondere die Annealing-Temperatur, Zyklenzahl, sowie die MgCl₂-Konzentration variiert.

Die PCRs wurden am Thermocycler Autogene II (Grant) und am Gradiententhermocycler Hybaid Express (Hybaid) durchgeführt.

Proofreading-PCR

Um eine sehr genaue Amplifikation des PCR-Produktes zu erhalten wurde das Expand High fidelity PCR-System (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Die Amplifikation erfolgte bei max. 30 Zyklen.

Colony-PCR

Mit der Colony-PCR wurden *E. coli*- oder *S. cerevisiae*-Kolonien auf die Anwesenheit von Plasmiden mit gewünschtem Insert getestet. Die Bakterienzellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Durch die anfängliche 2minütige Denaturierung wurden die Zellen lysiert und die Plasmide freigesetzt.

RACE-PCR

Mit Hilfe der Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) wurde ausgehend von bereits bekannten Teilsequenzen eines cDNA-Klons die noch unbekanntes 3'- bzw. 5'-Enden eines Gens aufgeklärt (3'-RACE bzw. 5'-RACE).

Zur Durchführung der 3'RACE wurde zunächst von dem bekannten Fragment ein genspezifischer Primer in Richtung des fehlenden 3'Endes abgeleitet (GSP). An dessen Ende wurde der genspezifische Oligo-dT-Anchor-Primer verwendet. Die

anschließende PCR-Reaktion erfolgte bei verschiedenen Annealing-Temperaturen. Bei Erhalt mehrerer oder nicht eindeutiger Amplifikationsprodukte wurde eine anschließende *nested*-PCR durchgeführt. Hierzu wurde ein weiterer genspezifischer-Primer, welcher näher am gesuchten 3'Ende lag, abgeleitet. Als Template für die nachfolgende PCR diente der 1:1000 verdünnte PCR-Ansatz aus der ersten 3'RACE. Wenn notwendig wurde eine weitere *nested*-PCR durchgeführt.

Für die Amplifikation des 5'Endes wurde das GeneRacer™ Kit von Invitrogen verwendet. Die Prozedur des Kits basiert auf der *RNAase-ligated* RACE-Methode (RLM-RACE). Im ersten Schritt wurde mit der *Capfinder*-Strategie die Gesamt-RNA mit dem Enzym *calf internal phosphatase* (CIP) behandelt. Hierbei wird die 5'-Modifizierung (CAP-Struktur) bei eukaryotischen mRNAs genutzt. Durch die Behandlung mit CIP werden sämtliche 5'OH-Enden degradiert, so dass lediglich die durch das *Capping* geschützten mRNAs verbleiben. Die 5'CAP-Struktur wurde anschließend durch die *tobacco acid pyrophosphatase* (TAP) entfernt, wobei das 5'-Phosphatende für die Ligation mit einem Adapter (GeneRacer™ RNA Oligo) erhalten blieb. Nach anschließender cDNA-Synthese nach Standardprotokoll (mit Oligo-dT-Primer) bzw. mit einem genspezifischer Primer (GSP), erfolgte die Amplifikation des 5'-Endes mit einem reverse GSP und dem zum GeneRacer™ RNA Oligo homologen GeneRacer™ 5'Primer. Wenn notwendig, schloss sich eine *nested*-PCR an. Die Durchführung der RLM-RACE erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Nested-PCR

Die *nested*-PCR wurde zur Steigerung der Produktspezifität eingesetzt. Hierbei dienten 1:1000 verdünnte Produkte aus einer vorangegangenen PCR als Matrize. Die verwendeten Primer der *nested*-PCR wurden innerhalb der Sequenz des Amplifikats der ersten PCR gelegt.

B.2.4.7 DNA-Sequenzanalysen

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt.

B.2.5 Methoden der pflanzlichen Gewebekultur

Die Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien ist unter B.1.10 aufgeführt. Der pH-Wert wurde mit 1 N KOH bzw. 1 N HCl eingestellt. Alle verwendeten Phytohormone und Antibiotika wurden sterilfiltriert nach dem Autoklavieren (15 min, 1,4 bar, 121°C) in die auf 50°C abgekühlten Medien zugegeben. Die Arbeiten am

sterilen Pflanzenmaterial erfolgten an der Raumreinwerkbank, die Transformationsarbeiten wurden an der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Die Kultur der Gewebekultur- bzw. Transformationsversuche erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Kulturräumen bzw. in Klimaschränken (Rubarth, Hannover) bei $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und einen 16 Stunden-Tag bei ca. $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Leuchtstoffröhren Osram 32/36 Watt).

B.2.5.1 Überführung der Azaleen in die Gewebekultur

Um für Regenerations- und Transformationsversuche *in vitro*-Material zur Verfügung zu haben, wurden die Azaleen aus dem Gewächshaus in die Gewebekultur überführt. Nach einem Protokoll nach Preil (persönliche Mitteilung) wurden von Gewächshauspflanzen junge, unverholzte Triebe mit vier bis sechs Nodi mit einem scharfen Messer geschnitten. Zur Oberflächensterilisation wurden diese für 1 min in 70%igem Isopropanol vorbehandelt und anschließend in 1%iger Chlorbleichlauge für 10 min desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Blätter entfernt, ohne dabei die Achselknospen zu verletzen. Die präparierten Triebe wurden anschließend in einem 45° Winkel in das Nährmedium gesetzt. Für die Etablierung wurde das Medium nach Anderson (1984) mit 1 mg/l IAA und 2 mg/l Zeatin verwendet. Als Kulturgefäße dienten Weckgläser (500 ml) oder Petrischalen. Ca. acht Wochen nach Anlage der Kultur konnten die aus den Achselknospen entwickelten Sprosse abgenommen und weitervermehrt werden.

B.2.5.2 *In vitro*-Vermehrung der Azaleen

Die Vermehrung der *in vitro*-Sprosse erfolgte in sterilen 9 cm Durchmesser Petrischalen oder in Reagenzgläsern (25 x 150 mm) auf Andersonmedium mit 1 mg/l IAA und 2 mg/l Zea. Die während der Vermehrungsphase gebildeten Seitentriebe wurden nach 10 bis 12 Wochen unter sterilen Bedingungen abgenommen und auf frisches Vermehrungsmedium gesetzt.

Ein Teil der in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Sprosse wurden von der Fa. Multiplant (Stapelfeld) bereitgestellt.

B.2.5.3 Adventivsprossregeneration

Für die Regeneration von Adventivsprossen wurden Basalmedien nach Anderson (1984) und Murashige und Skoog (1962), sowie verschiedene Phytohormonkombinationen verwendet. Für das Standardprotokoll wurden *in vitro*-

Blätter aus der Vermehrungskultur mit einem feinen Seziermesser unter dem Binokular quer zur Mittelrippe zerteilt. Die Blattexplantate wurden abaxial auf Kallusinduktionsmedium (Andersonmedium mit 2 mg/l 2,4-D und 0,75 mg/l Zea) gelegt. Nach einer Kallusinduktionsphase, die, wenn nicht anders angegeben, zwei Wochen dauerte, wurden die Explantate auf Sprossinduktionsmedium (Andersonmedium mit 2 mg/l TDZ) gesetzt. Im weiteren Kulturverlauf wurden die Explantate alle zwei bis drei Wochen auf frisches Nährmedium umgesetzt.

B.2.5.4 Bonitur der Adventivsprossregeneration

Zur Bonitur der Regeneration wurden die angelegten Explantate nach Größe der gebildeten Adventivsprosse nach folgendem Schlüssel klassifiziert (Abb. B.4):

- 1 = keine Bildung von Adventivsprossen
- 2 = Regeneration von kleinen, nicht subkultivierbaren Adventivsprossen (Länge: < 2 mm)
- 3 = Regeneration von subkultivierbaren Adventivsprossen (Länge: > 2 und < 5 mm)
- 4 = Regeneration von großen, gut subkultivierbaren Adventivsprossen (Länge: > 5 mm)

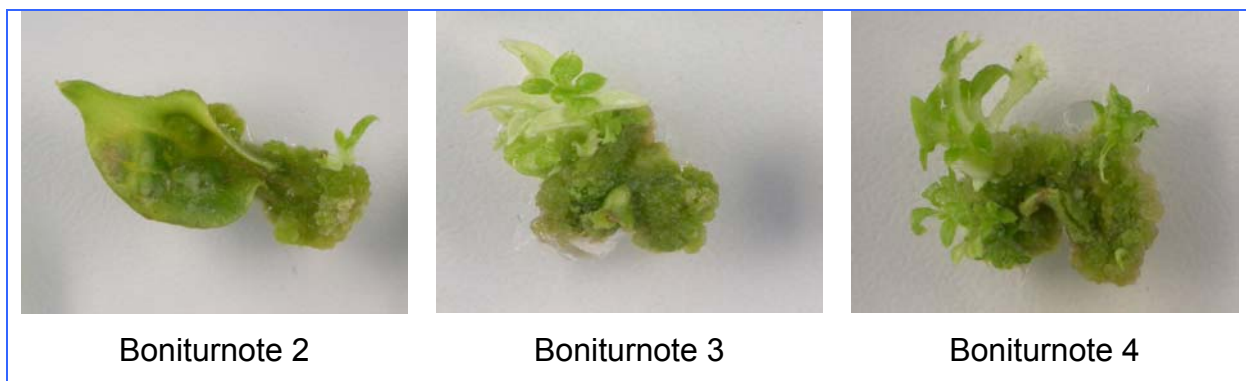


Abb. B.4: Boniturschlüssel der Adventivsprossregeneration;

B.2.5.5 Statistische Analysen

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Behandlungen wurden Varianzanalysen durchgeführt. Bei Feststellung signifikanter Unterschiede ($P \leq 0,05$) wurden Mittelwertsvergleiche nach Tukey berechnet. Stochastische Zusammenhänge wurden mittels Korrelations- und Regressionsanalysen überprüft. Die Berechnung der Daten erfolgten mit dem Statistikprogramm SAS 9.1 (SAS Institute GmbH, Heidelberg). Zum statistischen Vergleich von Häufigkeiten, wie die Regenerationsrate, wurde der Chi-Quadrat-Test (χ^2) verwendet.

B.2.6 Methoden des pflanzlichen Gentransfers

B.2.6.1 Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Der jeweils verwendete *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm wurde zur Vermehrung in 5 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 28°C und ca. 170 rpm im Dunkeln geschüttelt. Die logarithmische Wachstumsphase, in der die Agrobakterien die höchste Virulenz aufweisen, wurde i.d.R. innerhalb von 24 h erreicht.

Wenn nicht anders angegeben wurden für die Transformationsexperimente Blattexplantate nach einer zwoöchigen Präkultur auf Kallusinduktionsmedium verwendet. Die Agrosuspension wurde in Petrischalen pipettiert und mit sterilen H₂O verdünnt. Zur Infektion mit den Agrobakterien wurden die Blattexplantate für 30 min in die Suspension getaucht. Anschließend wurden die Blattstücke auf sterilem Filterpapier abgetupft und auf frisches Kallusinduktionsmedium mit 100 µmol Acetosyringon für 2 Tage bei 25°C im Dunkeln kokultiviert. Vor dem Umsetzen auf Selektionsmedium (Andersonmedium mit 2 mg/l TDZ, 200 mg/l Cefotaxim bzw. 200 mg/l Timentin und 0-20 mg/l Kanamycin) wurden die Explantate, zum Entfernen von anhaftenden Agrobakterien, in sterilen H₂O mit Cefotaxim oder Timentin gewaschen und auf Filterpapier abgetupft. Im weiteren Kulturverlauf wurden die Explantate alle 2 bis 3 Wochen auf frisches Selektionsmedium gesetzt. Vor dem Umsetzen wurden die Explantate in Cefotaxim enthaltenden sterilen Wasser gewaschen um ein Wachstum evtl. noch anhaftender Agrobakterien zu verhindern.

B.2.6.2 Nachweis des putativ transgenen Pflanzenmaterial

Für den Nachweis von putativ transgenen Pflanzenmaterial wurde die Integration der übertragenen DNA in das pflanzliche Genom mittels PCR überprüft.

Zudem wurde die Aktivität des Reportergens GUS mit Hilfe histochemischer Methoden nachgewiesen.

B.2.6.2.1 Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase Aktivität

Der histochemische Nachweis für den Einbau und die Funktion des Reportergens *uidA* erfolgte nach dem Protokoll von Jefferson et al. (1987). Das zu untersuchende Gewebe wurde mit einer Färbelösung nach Jefferson (9,8 ml 50 mM KPi pH 7,0; 7 µl Mercaptoethanol; 5,2 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indyol- β -D-Glucuronsäure (X-Gluc), gelöst in 100 ml DMSO; 100 µl Triton X-100) in Eppendorfgefäße überführt. Zur

besseren Infiltration der Lösung wurden die Explantate für ca. 30 sek. einem Unterdruck ausgesetzt. Die anschließende Inkubation erfolgte für 3-4 Stunden bei 37°C. Anhand von blauen Farbstoffkomplexen im Bereich der exprimierenden Zellen wurde die Aktivität des *uidA*-Gens nachgewiesen.

B.2.6.2.2 PCR-gestützter Nachweis der Transgenität

Aus dem zu untersuchenden putativ transgenen Gewebe wurde wie unter B.2.4.2 beschrieben die genomische DNA extrahiert. Für die nachfolgende Polymerase Kettenreaktion wurden jeweils 100 ng gDNA eingesetzt. Mit jeder durchgeführten PCR wurde die gDNA eines untransformierten *in vitro*-Azaleen-Sprosses (Wildtyp) als Negativkontrolle, und das für die Transformation eingesetzte Plasmid als Positivkontrolle verwendet.

C Ergebnisse

C.1 Flavonoidbiosynthese bei *Rhododendron simsii*

Es wurden an Blütenpetalen von farbig- und weißblühenden Azaleensorten analytische, enzymologische und molekularbiologische Untersuchungen vorgenommen. Die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Flavonoidbiosynthese in Azaleenblüten, insbesondere die Aufklärung über das Zustandekommen der Blütenfarbe Weiß, stand hierbei im Vordergrund. Zusätzlich sollten die Möglichkeiten einer gezielten gentechnischen Veränderung der Blütenfarbe des zur Verfügung stehenden Sortiments überprüft werden.

C.1.1 Analytische Untersuchungen der Blütenblätter

Mit Hilfe chromatographischer und spektroskopischer Methoden wurden die Blüten von zunächst 14 weiß- und farbigblühenden Azaleensorten auf das Vorkommen der Flavonoidklassen Flavanone, Flavone, Dihydroflavonole, Flavonole, Flavan-3-ole und Anthocyanidine untersucht. Um das zu untersuchende Sortenspektrum zu erweitern und zusätzliche Aufschlüsse über die Blütenfarbgebung der Azaleen zu erhalten, wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen 28 weißblühende, sowie vier violettblühenden Sorten aus dem Azaleenmuseum in Bremen auf das Vorhandensein von Flavan-3-olen und Anthocyanidinen überprüft. Mittels DC-Analysen können keine eindeutigen quantitativen Aussagen getroffen werden. Um dennoch einen Überblick über den Flavonidgehalt in den Blütenpetalen des zur Verfügung stehenden Azaleensortiments zu erhalten und hierbei evtl. einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt einzelner Flavonoide und der Blütenfarbe, insbesondere bei der Unterscheidung der Blütenfarbe „farbig“ und „weiß“, festzustellen, wurden die Spots der nachzuweisenden Klassen halbquantitativ abgeschätzt.

Mit den Methoden der Dünnschichtchromatographie war es möglich, Flavonole, Flavan-3-ole und Anthocyanidine, insbesondere die 3'4'-hydroxylierten Verbindungen Quercetin (Qu), Catechin (Cat), Epicatechin (EGC), Cyanidin (Cy) und Päonidin (Pn) nachzuweisen. Flavanone, Flavone und Dihydroflavonole konnten nicht detektiert werden. Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt (siehe Tab. G1, Tab. G2 und Tab. G3).

Der größte Teil des untersuchten Sortiments variierte hinsichtlich des Flavonoidmusters nur gering. Eine grundsätzliche Unterscheidung ist zwischen den

vier violettblühenden Sorten und den zwei weißblühenden Sorten 'Anton' und 'Sakuntala' zum restlichen Sortiment zu treffen, da hier bei den nachweisbaren Flavonoidklassen neben den 3'4'-hydroxylierten Flavonoiden zum Teil die entsprechenden 3'4'5'-Derivate auftraten. Neben Cyanidin und Päonidin wurde in den hydroxylierten Extrakten der violetten Sorten Delphinidin (Dp) nachgewiesen (Tab. C1:).

Tab. C1: Flavonoide in Extrakten aus vier violettblühenden und zwei weißblühenden Sorten (+ = schwacher Spot; ++ = deutlicher Spot; +++ = kräftiger Spot)

Sorte	Farbe	Qu	My	Cat	EC	EGC	Cy	Pn	Dp
Anton	weiß	+++	++	+	++	+	+	+	
Sakuntala	weiß	+++	+	+	++		+	+	
Adonia	violett	+++	++	++	++	+	+++	+	+++
Adrien Steyert	violett	++	+	+	++		+++	+	+++
Picollo	violett	+++	+++	+	++	+	+++	+	+++
Rema	violett	+++	++	+	++	+	+++	+	+++

In den weiteren farbig- und weißblühenden Sorten wurden nach saurer Hydrolyse die Anthocyanidine Cyanidin und Päonidin nachgewiesen. Die hydrolysierten Extrakte weißer Blüten wiesen nach der chromatographischen Auftrennung im Gegensatz zu denen farbiger Blüten nur schwache Anthocyanidinspots auf. Das Auftreten von Anthocyanidin nach saurer Hydrolyse in weißen Blütenextrakten gab erste Hinweise auf das Vorkommen von Proanthocyanidinen in Azaleen.

Das Flavan-3-ol Catechin konnte nicht in allen Sorten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. Dagegen traten nach Behandlung der DC mit dem Färbereagenz DMAZA bei allen farbigblühenden und bei allen weißblühenden Sorten deutliche Spots auf Höhe der Epicatechinreferenz auf. In den vier violettblühenden Sorten konnte zusätzlich Epigallocatechin nachgewiesen werden. Zum Nachweis der Flavonole in den Azaleenblüten wurde die dünnschichtchromatographische Auftrennung zunächst unter UV-Licht ausgewertet. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung der DC mit Naturstoffreagenz A. Bei allen untersuchten Sorten konnte sowohl unter UV-Licht als auch nach der Naturstoffreagenz A-Behandlung das Flavonol Quercetin und zusätzlich in den violetten Sorten und zwei weißen Sorten Myricetin nachgewiesen werden (Abb. C.1).

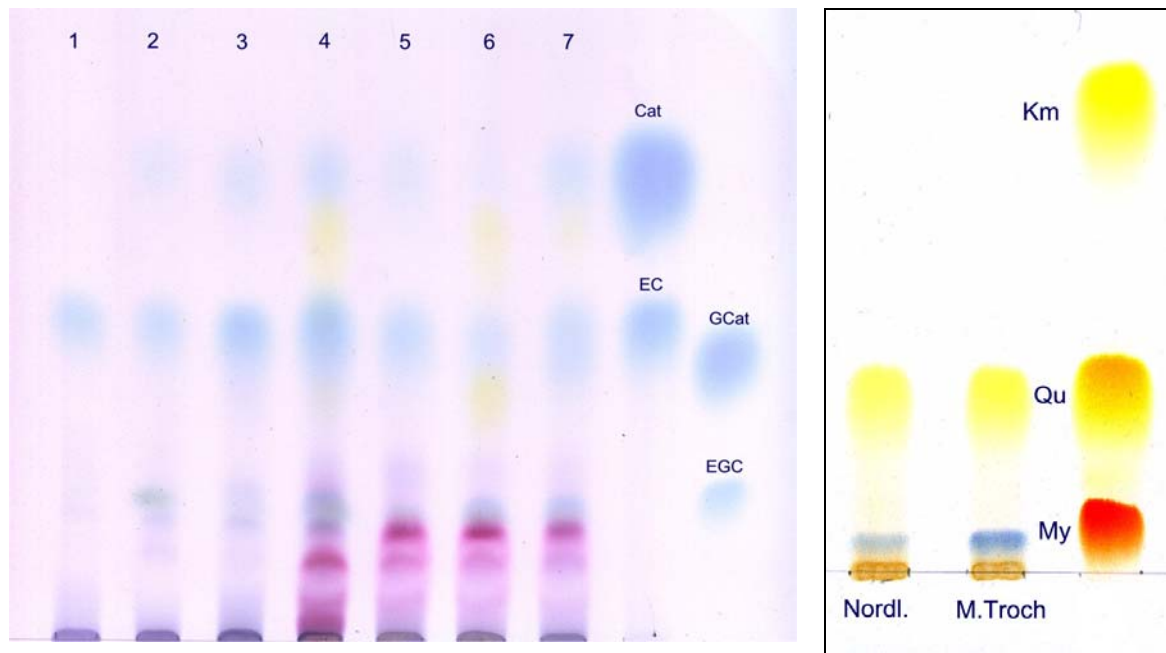


Abb. C.1: Dünnschichtchromatographische Auftrennung; links: Flavan-3-ole (am Beispiel der Sorten: 1= Verveneana Alba, 2= Weiße Schäume, 3= Weißer Hirsch, 4= Adonia, 5= Adrien Steyert, 6= Picollo, 7= Rema); rechts: DC Nachweis von Quercetin am Beispiel der Sorten 'Nordlicht' und 'Mevrouw Edmond Troch'

Die Gruppierung des untersuchten Sortiments in weiß- und in farbigblühenden Azaleen ergab nach halbquantitativer Abschätzung keine Relationen in den Flavonol- und Flavan-3-ol-Gehalten. Die Stärke der Spots variierte sowohl in dem weißblühenden, wie auch in dem farbigblühenden Sortiment, so dass in weißblühenden Sorten nicht generell eine höhere Anreicherung von Flavonolen oder Flavan-3-olen gegenüber farbigblühenden Sorten, sowie umgekehrt beobachtet werden konnte.

Die Messung des pH-Werts des Blütenzellsaftes ergab sowohl für die rotblühende Sorte 'Nordlicht' als auch für die weißblühende Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' bei Blüten des Stadium BS 3 einen durchschnittlichen pH-Wert von 4,3 und bei BS 5 von 3,4.

C.1.2 Histologische Untersuchungen der Blütenblätter

Von der rotblühenden Sorte 'Nordlicht', der weißblühenden Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' und der sternförmig gemusterten Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' (rot mit weißem Rand) wurden Querschnitts-, Epidermis- und Mesophyllpräparate angefertigt. Zunächst wurden vergleichende Untersuchungen zur Anthocyanverteilung in den Blütenbereichen der farblich unterschiedlich ausgeprägten Sorten vorgenommen. Die Zellvakuolen der oberen und unteren Epidermis der Sorte 'Nordlicht' und der Sorte

'Mevrouw Gerard Kint' (roter Bereich) wiesen eine intensive rote Färbung auf, während das dazwischen liegende Mesophyllgewebe anthocyanfrei ist (Abb. C.2). Im weißen Randbereich der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' und der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' zeigten die Epidermis- und Mesophyllzellen erwartungsgemäß keinen Farbstoff an.

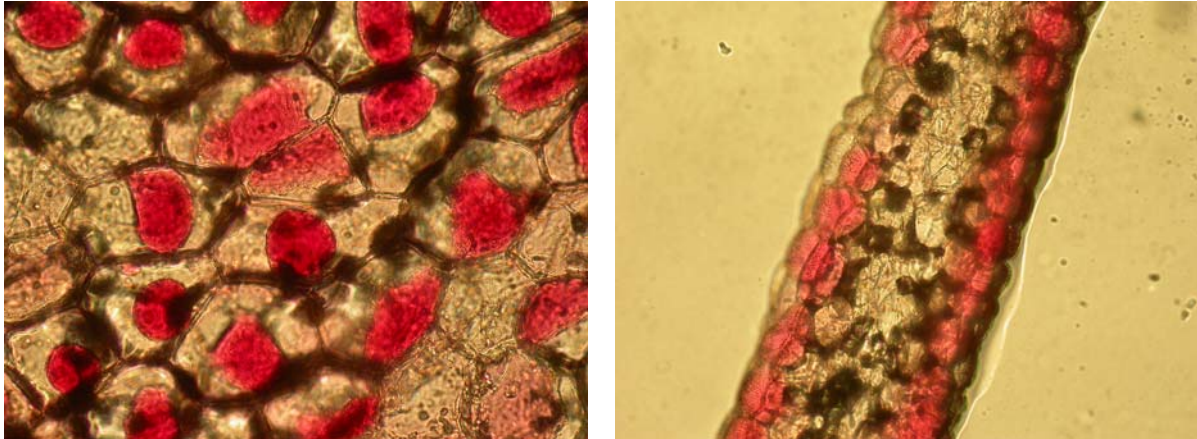


Abb. C.2: Anthocyanverteilung in Blütenblätter der Sorte 'Nordlicht', links: Epidermiszellen nach Plasmolyse der Vakuolen, rechts: Blütenquerschnitt

Zum Nachweis der Flavan-3-ole im Blütengewebe und Blütenzellen wurden die Präparate mit einer DMAZA-Lösung behandelt. Die Untersuchungen wurden an Epidermiszellen aus verschiedenen Blütenarealen (Oberseite, Unterseite, Randbereich, Zentrum) vorgenommen. Nach Behandlung zeigte ein Großteil der Epidermiszellen aller drei Sorten einen blauen Farbstoffkomplex auf, der sowohl in den anthocyanhaltigen wie anthocyanfreien Zellen auftrat (Abb. C.3). Eine Lokalisation der Flavan-3-ole in verschiedenen Arealen der Epidermisschicht konnte nicht beobachtet werden. Die Präparation des Mesophyllgewebes erwies sich als schwierig und konnte lediglich im zentralen Blütenbereich vorgenommen werden, wobei eine Farbreaktion des DMAZAs im Mesophyllgewebe aller drei Sorten stattfand.

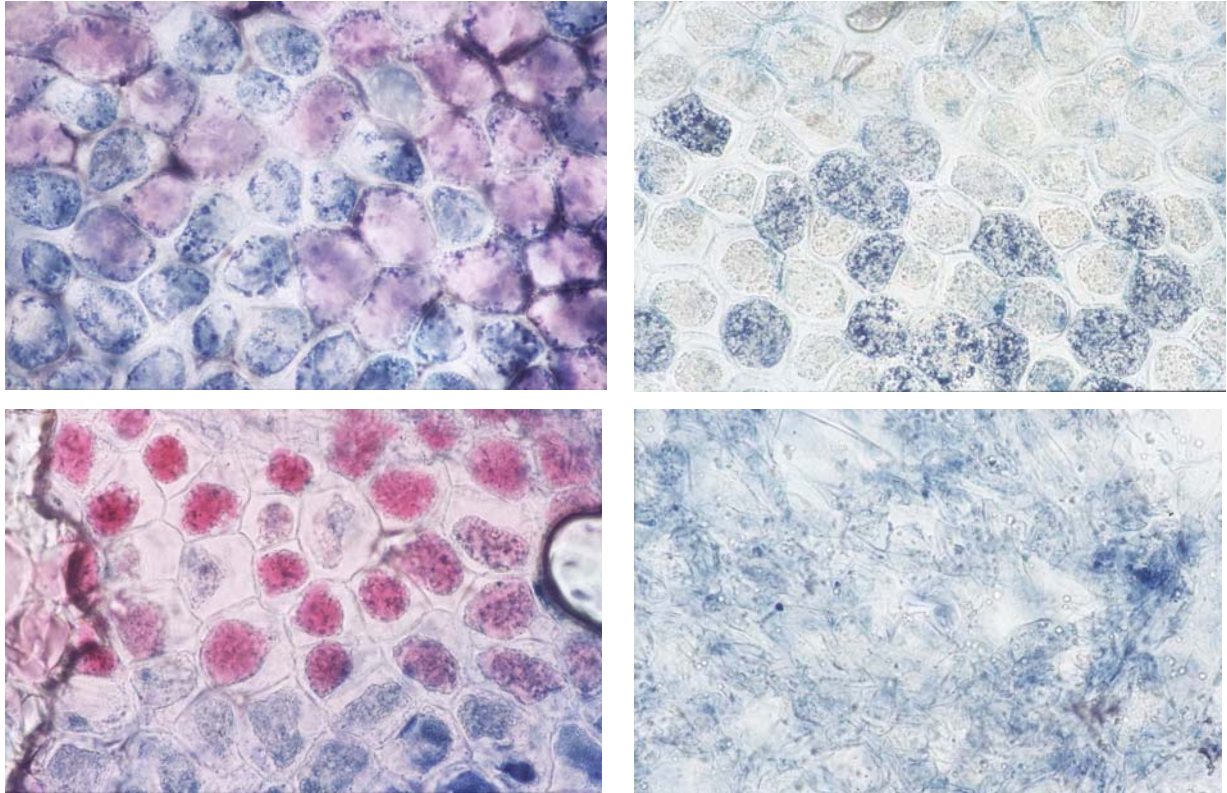


Abb. C.3: DMAZA-Färbung in Blütenzellen, A: Epidermiszellen der Sorte 'Nordlicht', B: Epidermisschicht der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch', C: Epidermisschicht der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' (Randbereich zwischen anthocyanhaltigem Gewebe und anthocyanfreiem Gewebe), D: Mesophyllgewebe der Sorte 'Nordlicht'

C.1.3 Enzymologie der Blütenblätter

In bisherigen Untersuchungen zur Enzymologie der Blütenfarbe bei *R. simsii*-Hybriden wurde die Aktivität der Enzyme Chalkonsynthase, Flavanon 3-Hydroxylase und Dihydroflavonol 4-Reduktase in vornehmlich farbig- und buntblühenden Sorten beschrieben (De Cooman et al., 1993; De Schepper, 2001). Es gibt allerdings bis dato keine eingehenden Untersuchungen zur Enzymologie weißer Azaleenblüten.

Zunächst wurde überprüft, ob die Enzyme der Flavonoidbiosynthese sowohl in der rotblühenden Sorte 'Nordlicht' als auch in der weißblühenden Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' nachzuweisen sind. Mit Hilfe der Aufarbeitungsmethode nach Dellus et al. (1997) gelang der qualitative Nachweis der Chalkonsynthase (CHS), Chalkonisomerase (CHI), Flavanon 3-Hydroxylase (FHT), Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR), Anthocyanidinreduktase (ANR) und Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (FGT) in beiden Sorten (Abb. C.4 und Abb. C.5).

Die CHS aus Azaleen setzt sowohl Cumaroyl-CoA (Cum-CoA) als auch Kaffeoyl-CoA (Caff-CoA) nach anschließender Isomerisierung durch die CHI zu den Reaktionsprodukten Naringenin (NAR) bzw. Eriodictyol (ERI) um. Die in Abb. C.4

dargestellte DC-Auftrennung der Reaktionsprodukte des CHS- und CHI-Nachweises zeigen zudem die Bildung von Dihydrokämpferol (DHK). Dies ist auf eine Aktivität der im Enzymextrakt enthaltenen FHT zurückzuführen, die das zuvor gebildete NAR umsetzt. Die Flavanone NAR und ERI können durch die FHT zu den Dihydroflavonolen Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin (DHQ) hydroxyliert werden. Da ein enzymatischer Umsatz von DHK zu Leukopelargonidin nicht nachgewiesen werden konnte, dagegen aber DHQ zu Leukocyanidin reduziert wird, kann von einer Substratspezifität der Azaleen-DFR für DHQ ausgegangen werden.

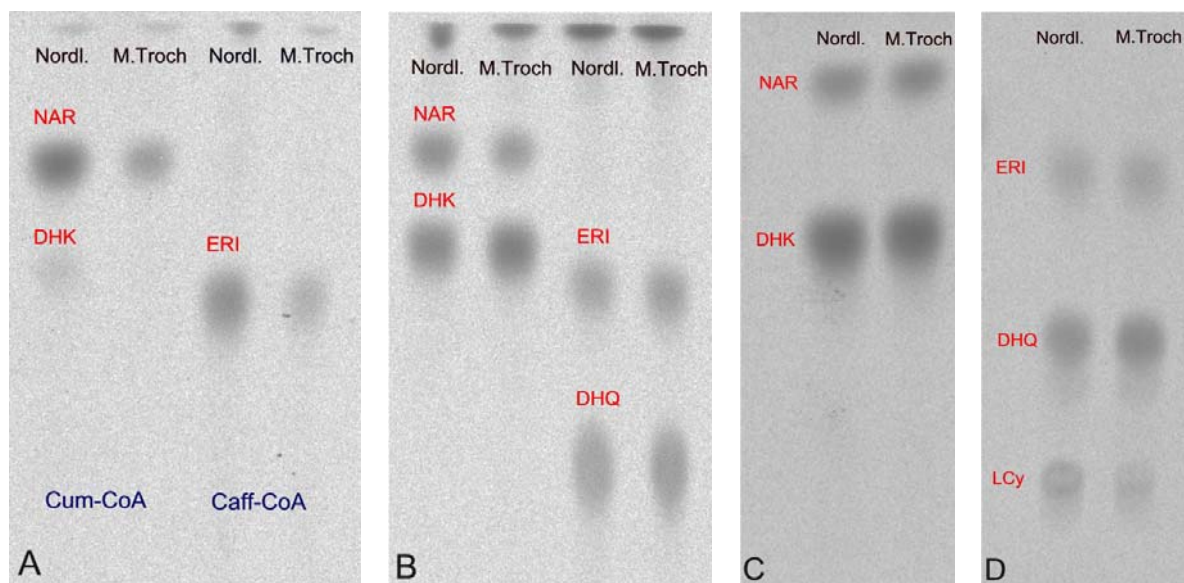


Abb. C.4: Aktivität der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in Blütenpetalen der Sorten 'Nordlicht' und Mevrouw Edmond Troch; A: Nachweis der CHS- und CHI-Aktivität mit den Substraten Cum-CoA und Caff-CoA, Reaktionsprodukte: NAR und ERI. B: Nachweis der FHT-Aktivität mit den Substraten NAR und ERI, Reaktionsprodukte: DHK und DHQ. C: Test der DFR-Aktivität mit DHK als Substrat, kein Reaktionsprodukt (NAR: Rest aus DHK-Synthese). D: Nachweis der DFR-Aktivität mit DHQ als Substrat, Reaktionsprodukt: LCy (ERI: Rest aus DHQ-Synthese). DC-Cellulose; Laufmittel: CAW

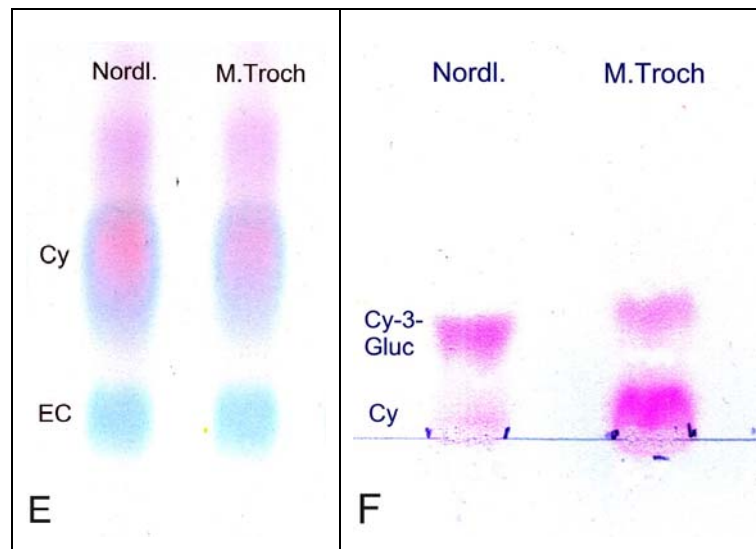


Abb. C.5: Nachweis der ANR- und FGT-Aktivität in Blütenpetalen der Sorten 'Nordlicht' und 'Mevrouw Edmond Troch'; E: Nachweis der ANR-Aktivität mit dem Substrat Cy, Reaktionsprodukt: EC. F: Nachweis der FGT-Aktivität mit dem Substrat Cy, Reaktionsprodukt Cy-3-Gluc. DC-Cellulose; Laufmittel E: BAW; Laufmittel F: HOAC

Der Nachweis des membrangebundenen Enzyms F3'H war weder durch die Aufarbeitungsmethode nach Dellus et al. (1997) noch nach Präparation der Mikrosomen möglich. Allerdings konnte nach Behandlung von Azaleenknospen farbiger Blüten mit dem F3'H bzw. F3'5'H Inhibitor Tetcyclacis eine deutliche Reduktion der Anthocyan synthese beobachtet werden (Abb. C.6)



Abb. C.6: Tetcyclacisbehandlung der Azaleensorte 'Friedhelm Scherrer'; rechts: unbehandelte Kontrolle, links: mit Tetcyclacis behandelt

In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob die Blütenfarbe „Weiß“ bei Azaleen durch eine reduzierte Aktivität der Enzyme der Flavonoidbiosynthese zustande kommt. Es wurde die Enzymaktivität der CHS, CHI, FHT, DFR und ANR zwischen der rotblühenden Sorte 'Nordlicht' und einer Auswahl von Azaleensorten

mit weißen Blüten ('Mevrouw Edmond Troch', 'Ballerina', 'Schneekönigin' und 'Winterperle') quantitativ verglichen. Hierzu mussten Standardbedingungen geschaffen werden, unter denen die enzymatische Produktbildung bei einem quantitativen Vergleich verschiedener Sorten steigerungsfähig war. Es wurde die Sorte 'Nordlicht' als Standardsorte festgelegt, an der für die zu untersuchenden Enzyme die Proteinmengenlinearität und die Inkubationszeitlinearität bestimmt wurde. Zudem wurden die einzelnen Enzyme hinsichtlich des pH- und Temperaturoptimums charakterisiert. Für den quantitativen Vergleich der Enzymaktivität von CHS, FHT und DFR wurden Blütenproben der Wintersaison 2004/05 und 2005/06 in getrennten Versuchsreihen aufgearbeitet und hinsichtlich ihrer Enzymaktivität untersucht. Das für die enzymatischen Untersuchungen der CHI und ANR verwendete Blütenmaterial stammt aus der Wintersaison 2005/06.

C.1.3.1 Charakterisierung und quantitativer Vergleich der CHS

Für die Charakterisierungen der Azaleen-CHS wurde ein Gemisch der Enzympräparationen der Blütenstadien (BS) 1 bis 4 der Sorte 'Nordlicht' verwendet. Zunächst wurde die Proteinmengenlinearität der CHS bestimmt. Hierbei konnte der lineare Bereich der CHS-Reaktion zwischen 5 und 30 µg Gesamtprotein festgelegt werden. Die Zeitreihe der CHS-Reaktion ergab bei einer Inkubationszeit ab 45 min einen kaum noch steigerungsfähigen Umsatz. Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf die CHS-Aktivität ergaben ein Optimum bei 30°C. Das pH-Optimum der CHS mit Cum-CoA als Substrat lag bei pH 7,5. Die ermittelten Optima, sowie 20 µg Gesamtprotein und eine Inkubationszeit von 30 min wurden als Standardbedingungen festgelegt. Die Ergebnisse zur Charakterisierung der CHS sind in den folgenden Diagrammen dargestellt (Abb. C.7):

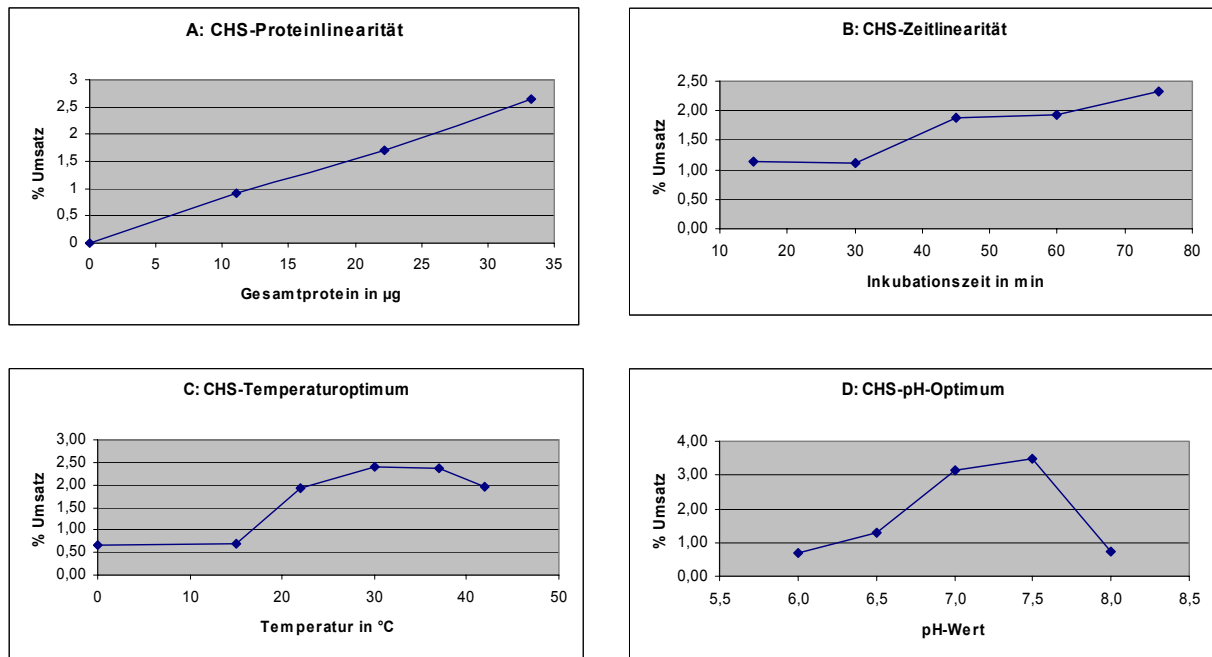


Abb. C.7: Charakterisierung der CHS: A: Proteinlinearität (Reaktionsbedingungen: 0 – 33,3 µg Enzym, 30 min, 37°C, pH 7,5); B: Zeitlinearität (Reaktionsbedingungen: 20 µg Enzym, 15 – 75 min, 37°C, pH 7,5); C: Temperaturoptimum (Reaktionsbedingungen: 20 µg Enzym, 30 min, 0 – 42°C, pH 7,5); D: pH-Optimum (Reaktionsbedingungen: 20 µg Enzym, 30 min, 37°C, pH 6,0 – 8,0); „% Umsatz“ = Umsatz von [¹⁴C]-Mal-CoA zu [¹⁴C]-Naringenin in %

Der enzymatische Umsatz der CHS der Sorte ‘Nordlicht’ wurde mit dem Umsatz der weißblühenden Sorten ‘Mevrouw Edmond Troch’, ‘Ballerina’, ‘Schneekönigin’ und ‘Winterperle’ unter Standardbedingungen quantitativ verglichen. Die Untersuchungen erfolgten an den Blütenstadien 1 bis 5. Die in Abb. C.8 dargestellten Ergebnisse sind Durchschnittswerte der zwei Untersuchungsjahre. Ein auffällig hoher Umsatz über alle fünf Blütenstadien hinweg wurde bei der Sorte ‘Schneekönigin’ gemessen. Die rotblühende Sorte ‘Nordlicht’ wies im Mittel die zweithöchste Aktivität auf. Es kann demnach nicht davon ausgegangen werden, dass bei weißblühenden Sorten eine reduzierte CHS-Aktivität im Vergleich zu Azaleen mit farbigen Blüten vorliegt.

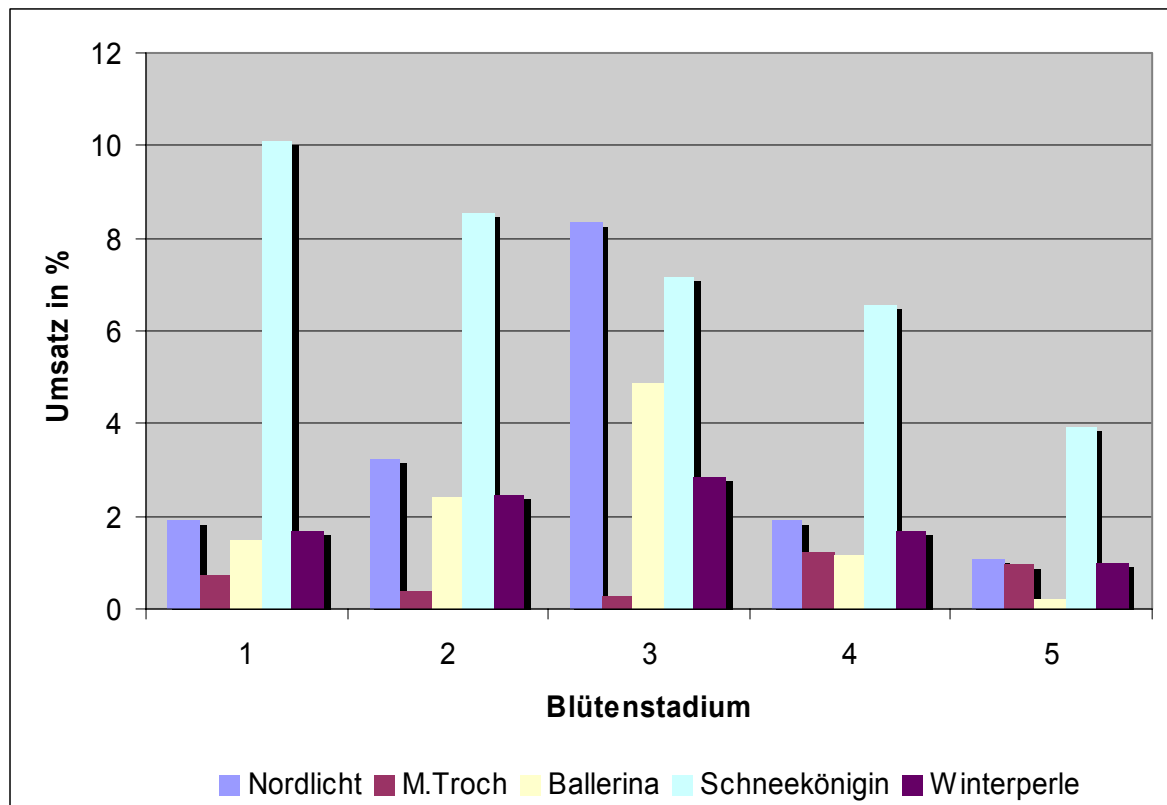


Abb. C.8: Quantitativer Vergleich der CHS-Aktivität; „Umsatz in %“ = Umsatz von [^{14}C]-Mal-CoA zu [^{14}C]-Naringenin in %

C.1.3.2 Charakterisierung und quantitativer Vergleich der CHI

Die Reaktion der CHI wurde photometrisch bestimmt. Hierbei wird der Umsatz des farbigen Substrats 2',4',6',4-Tetrahydroxychalkon (THC) zu dem farblosen Naringenin bei einer Wellenlänge von 385 nm über einen Zeitraum von 2 min beobachtet. Um die spontane Isomerisierung des THC zu NAR herauszurechnen, wurde eine Kontrolle ohne Enzym gemessen. Aus den einzelnen Extinktionswerte der enzymatischen und der nichtenzymatischen Reaktion wurden jeweils die Regressionsgeraden und deren Steigung berechnet. Die Differenz der Steigung beider Geraden gab den Anteil der enzymatischen Reaktion wieder (siehe auch B.2.3.7).

Vor einem Vergleich der CHI-Aktivität der einzelnen Sorten wurde die Proteinmengenlinearität an der Sorte 'Nordlicht' (BS 1 - 4) gemessen (Abb. C.9).

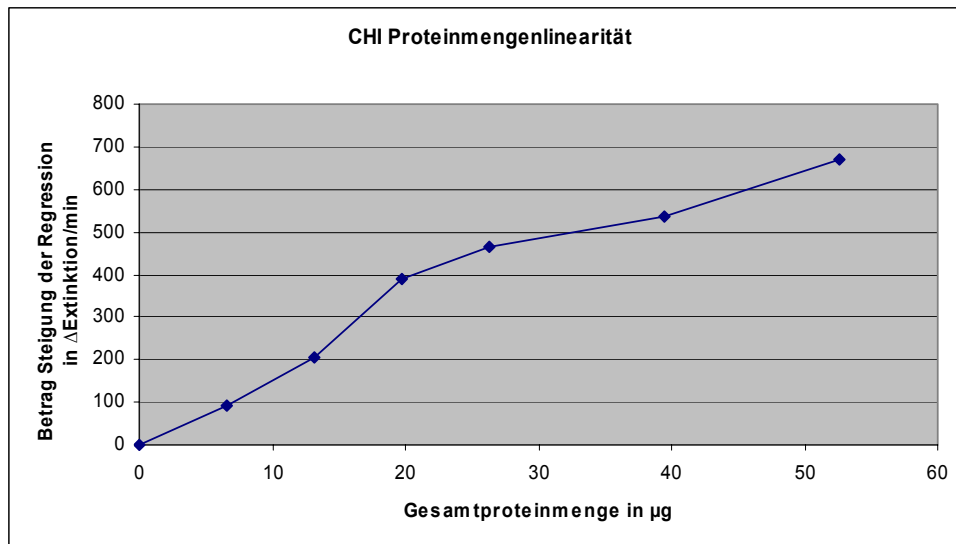


Abb. C.9: Proteinmengenlinearität der CHI;

Anschließend erfolgte der Vergleich der CHI-Aktivität im Verlauf der Blütenentwicklung (BS 1 - 5) zwischen der rotblühenden Standardsorte 'Nordlicht' und den weißblühenden Sorten 'Ballerina', 'Mevrouw Edmond Troch', 'Schneekönigin' und 'Winterperle' (Abb. C.10). Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und einer Gesamtproteinmenge von 25 µg.

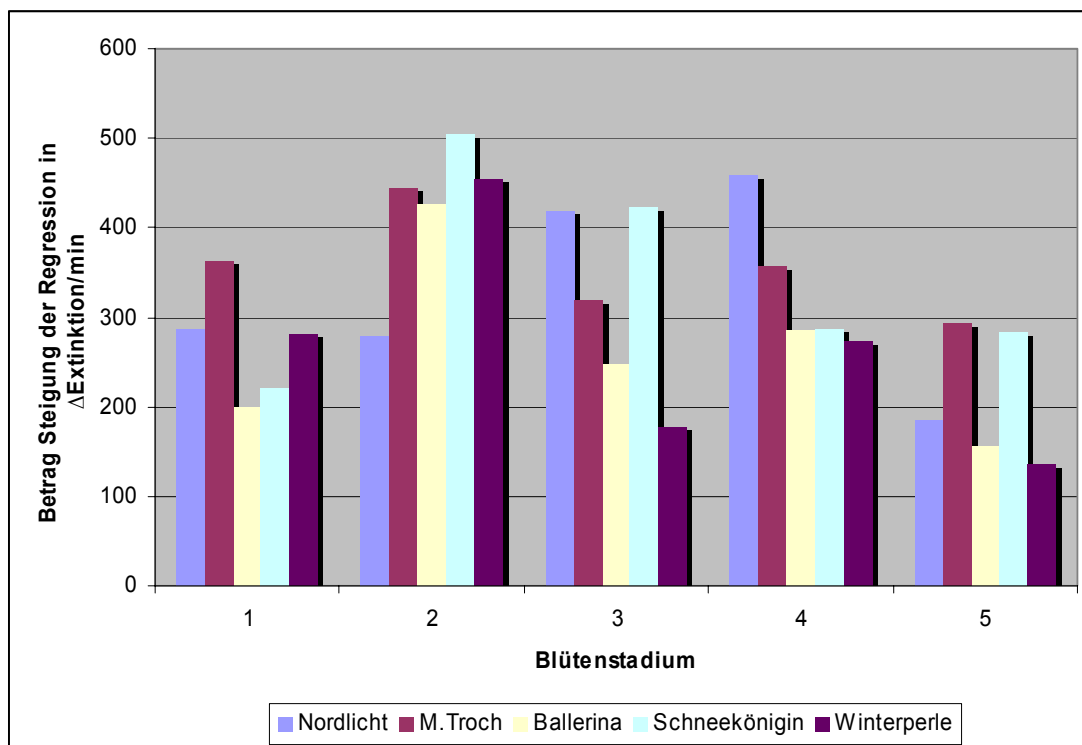


Abb. C.10: Quantitativer Vergleich der CHI-Aktivität;

Eine deutlich reduzierte CHI-Aktivität gegenüber der farbigen Referenzsorte konnte bei keiner der weißblühenden Sorten beobachtet werden. Da nach Zugabe von

Enzymextrakten anthocyanfreier Sorten die Reaktion von THC zu Naringenin der enzymatischen Umsatzreaktion der Sorte 'Nordlicht' entspricht bzw. übersteigt, kann nicht von einer reduzierten CHI-Aktivität bei weißblühenden Sorten ausgegangen werden.

C.1.3.3 Charakterisierung und quantitativer Vergleich der FHT

Zunächst wurde die FHT an der Sorte 'Nordlicht' charakterisiert. Bestimmt wurde die Proteinlinearität, die Zeitlinearität, sowie das pH- und das Temperaturoptimum. Die Untersuchungen erfolgten an einem Enzymgemisch aus den Blütenstadien 1 bis 4. Folgende Diagramme geben einen Überblick über die Ergebnisse (Abb. C.11):

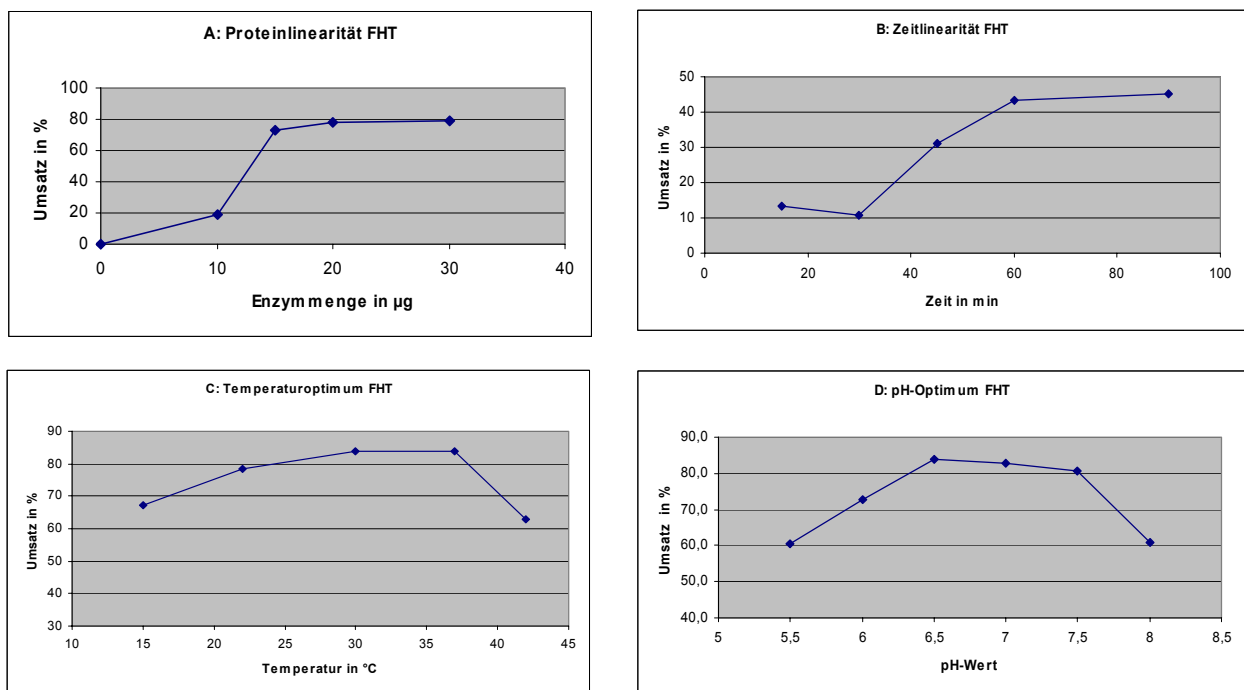


Abb. C.11: Charakterisierung der FHT: A: Proteinlinearität (Reaktionsbedingungen: 0 – 30 µg Enzym, 30 min, 37°C, pH 7,5); B: Zeitlinearität (Reaktionsbedingungen: 10 µg Enzym, 15 – 90 min, 37°C, pH 7,5); C: Temperaturoptimum (Reaktionsbedingungen: 10 µg Enzym, 30 min, 15 – 42°C, pH 7,5); D: pH-Optimum (Reaktionsbedingungen: 10 µg Enzym, 30 min, 37°C, pH 5,5 – 8,0); „Umsatz in %“ = Umsatz von [¹⁴C]-Nar zu [¹⁴C]-DHK in %

Aus den Ergebnissen zur Charakterisierung der FHT konnten die Standardbedingungen (10 µg Gesamtprotein, 30 min Inkubationszeit, 37°C Inkubationstemperatur, pH 6,5) für den quantitativen Vergleich der FHT-Aktivität abgeleitet werden. In Abb. C.12 sind die Mittelwerte der Untersuchungsergebnisse beider Versuchsjahre angegeben.

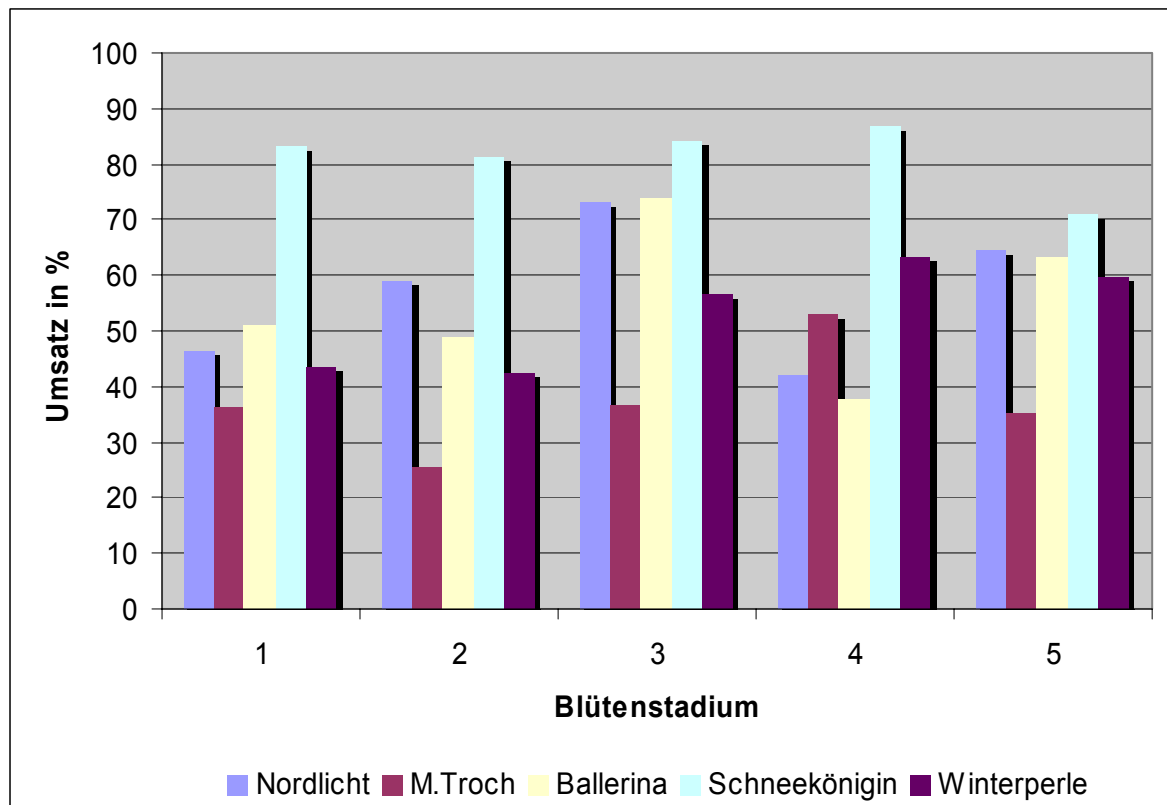


Abb. C.12: Quantitativer Vergleich der FHT; „Umsatz in %“ = Umsatz von $[^{14}\text{C}]$ -Nar zu $[^{14}\text{C}]$ -DHK in %

Auch bei den quantitativen Untersuchungen der FHT konnte keine generell stärkere Enzymaktivität der farbigen Referenzsorte gegenüber den weißblühenden Azaleen beobachtet werden. Auffällig ist ein hoher enzymatischer Umsatz von ca. 80 % der FHT aus 'Ballerina'.

C.1.3.4 Charakterisierung und quantitativer Vergleich der DFR

Zunächst wurde die DFR der Sorte 'Nordlicht' hinsichtlich der Proteinmengen- und Zeitlinearität untersucht. Weiter wurde das pH- und Temperaturoptimum bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Grafiken dargestellt (Abb. C.13):

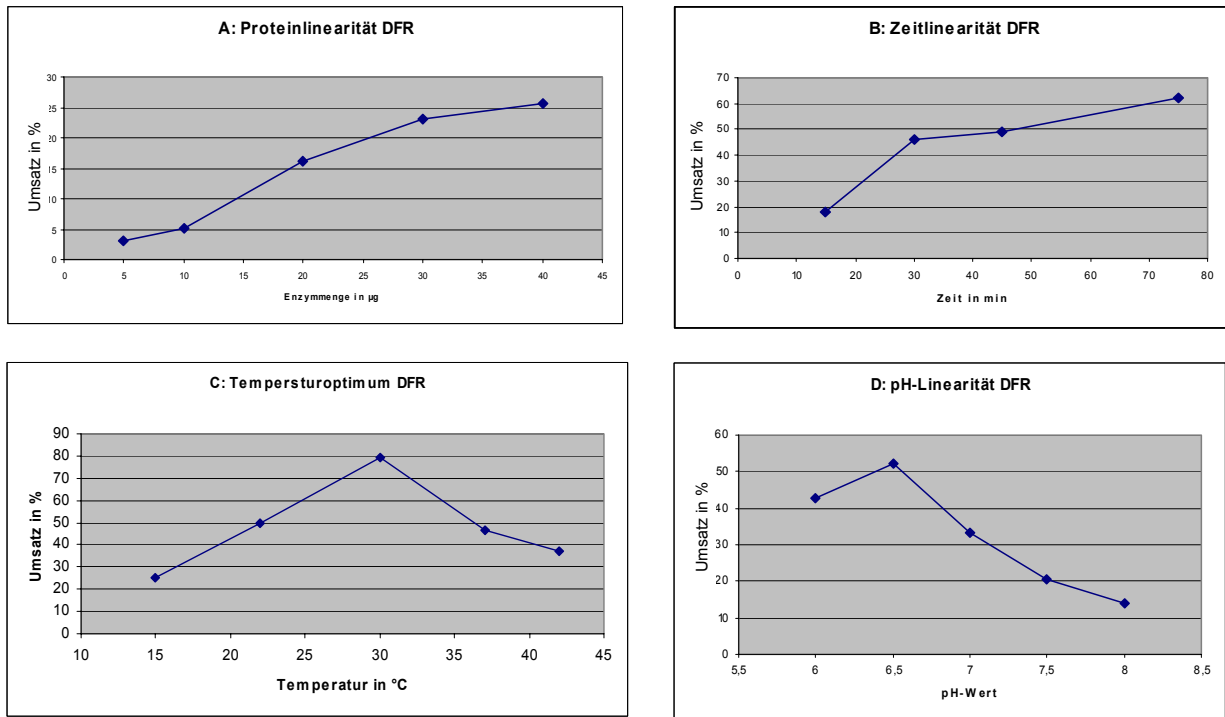


Abb. C.13: Charakterisierung der DFR: A: Proteinlinearität (Reaktionsbedingungen: 5–40 µg Enzym, 30 min, 30°C, pH 7,5); B: Zeitlinearität (Reaktionsbedingungen: 20 µg Enzym, 15–75 min, 30°C, pH 6,5); C: Temperaturoptimum (Reaktionsbedingungen: 20 µg Enzym, 30 min, 15–42°C, pH 6,5); D: pH-Linearität (Reaktionsbedingungen: 20 µg Enzym, 30 min, 30°C, pH 6,0–8,0); „Umsatz in %“ = Umsatz von [¹⁴C]-DHQ zu [¹⁴C]-LCy in %

Aufgrund der Charakterisierungen wurden als Standardbedingungen für den DFR-Test eine Gesamtproteinmenge von 20 µg, eine Inkubationszeit von 30 min, eine Inkubationstemperatur von 30°C und ein pH-Wert von 6,5 im Reaktionsansatz gewählt.

Die Aktivität der DFR wurde ähnlich wie bei den Untersuchungen der CHS und FHT unter Standardbedingungen quantitativ über die Blütenstadien 1–5 verglichen. Eine reduzierte DFR-Aktivität der weißblühenden Azaleen konnte gegenüber der farbigen Standardsorte nicht beobachtet werden. Die DFR der Sorte ‘Schneekönigin’ zeigt auch hier eine durchgehend hohe Aktivität (Abb. C.14).

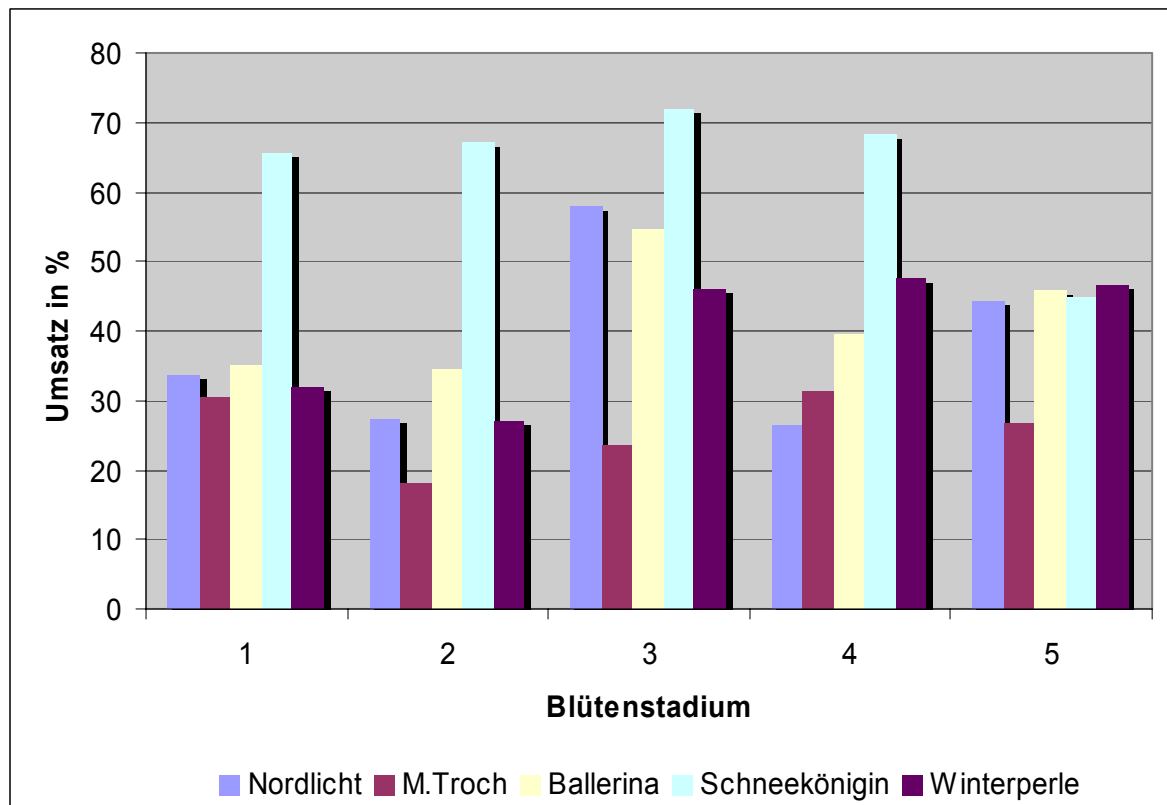


Abb. C.14: Quantitativer Vergleich der DFR; „Umsatz in %“ = Umsatz von [^{14}C]-DHQ zu [^{14}C]-LCy in %

C.1.3.5 Charakterisierung und quantitativer Vergleich der ANR

Die Charakterisierung der ANR erfolgte im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit (Helmich, 2005). Für den quantitativen Vergleich der ANR-Aktivität zwischen farbigen und weißblühenden Azaleen konnten Standardbedingungen (60 μg Gesamtprotein, 40 min Inkubationszeit, 45°C Inkubationstemperatur, 5,5 pH im Reaktionsansatz) abgeleitet werden. Da überprüft werden sollte, ob eine starke Enzymaktivität der ANR bei weißen Azaleenblüten gegenüber farbigen Blüten zu einem eventuellen Substratdefizit für die FGT führt, wurden für einen besseren Vergleich der quantitativen Untersuchungen zwei rotblühende Azaleensorten ('Nordlicht' und 'Friedhelm Scherrer') verwendet, die zusammen mit den weißblühenden Sorten 'Ballerina' und 'Winterperle' untersucht wurden.

Es konnte keine deutlich erhöhte ANR-Aktivität von weißblühenden gegenüber rotblühenden Sorten festgestellt werden (Abb. C15). Auch konnte kein unterschiedlicher Verlauf der Aktivität über die Blütenstadien zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden. Die Sorte 'Nordlicht' weist gegenüber den übrigen Sorten zudem die fast durchgehend höchste Aktivität auf, so dass nicht von einer stärkeren ANR-Aktivität bei weißblühenden Azaleen ausgegangen werden kann.

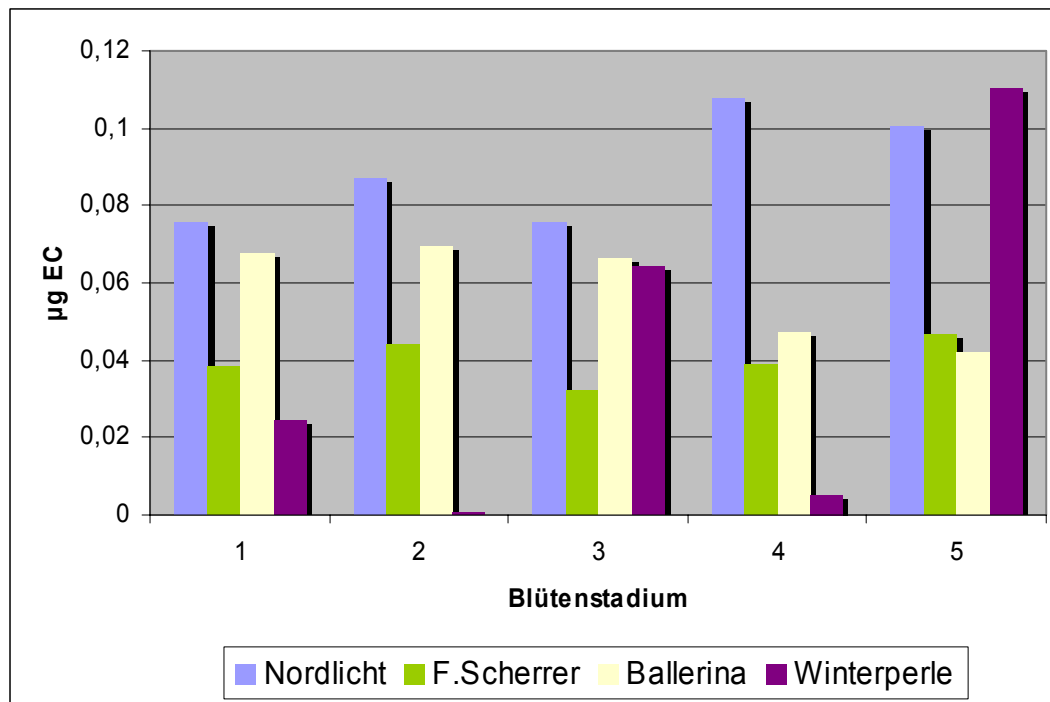


Abb. C15: Quantitativer Vergleich der ANR

C.1.4 Expressionsanalysen von Flavonoidgenen

In vorangegangenen Untersuchungen wurden die Enzymaktivitäten der CHS, CHI, FHT, DFR und ANR zwischen der rotblühenden Referenzsorte 'Nordlicht' und den vier weißblühenden Sorten über die Blütenentwicklung quantitativ verglichen. Da enzymatische Untersuchungen der ANS aus Blütenextrakten der Azaleen bisher nicht möglich sind, wurden Expressionsanalysen an *ans* mittels RT-PCR vorgenommen. Zum Vergleich wurden zusätzlich die Analysen für die Flavonoidgene *chs*, *chi*, *fht*, und *dfr* durchgeführt.

C.1.4.1 Klonierung von Flavonoidgenen

Da im Gegensatz zu *chs*, *chi* und *dfr* für *ans* und *fht* keine Sequenzinformationen für *R. simsii* vorlagen, wurde zunächst ein *full length* ANS cDNA-Klon isoliert und heterolog in Hefe exprimiert. Zudem wurde ein putatives *fht* cDNA Fragment kloniert. Die Isolierung der RNA erfolgte aus Petalen der Sorte 'Nordlicht' (Blütenstadien 2, 3 und 4), welche im Anschluss in cDNA umgeschrieben wurde. PCR-Fragmente wurden in den Klonierungsvektor TOPO pcR[®] 2.1 ligiert und in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Klone wurden mittels Colony-PCR gescreent. Die Plasmide positiver Klone wurden nach einer Übernacht-Kultur isoliert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit in der GenBank enthaltenen Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus verglichen.

C.1.4.1.1 Klonierung eines putativen *full-length* ANS cDNA-Klons

Im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit (Helmich, 2005) wurde ein 324 bp langes Fragment der ANS aus *R. simsii* kloniert. Dies wies die höchste Übereinstimmung mit der ANS Sequenz aus *Torenia fournieri* (Acc.: AB044091) mit 81 % auf Proteinebene auf. Durch den Vergleich der *full-length* Sequenz aus *Torenia* und des klonierten ANS-Fragments konnte auf ein Fehlen von ca. 340 bp zum 3'Ende und von 420 bp zum 5'Ende geschlossen werden. Ausgehend von der Sequenz des ANS-Fragments wurden genspezifische Primer für das 3'RACE (ANS1 und ANS2) und das 5'RACE (ANSrevA und ANSrevnested) abgeleitet (Abb. C.16).

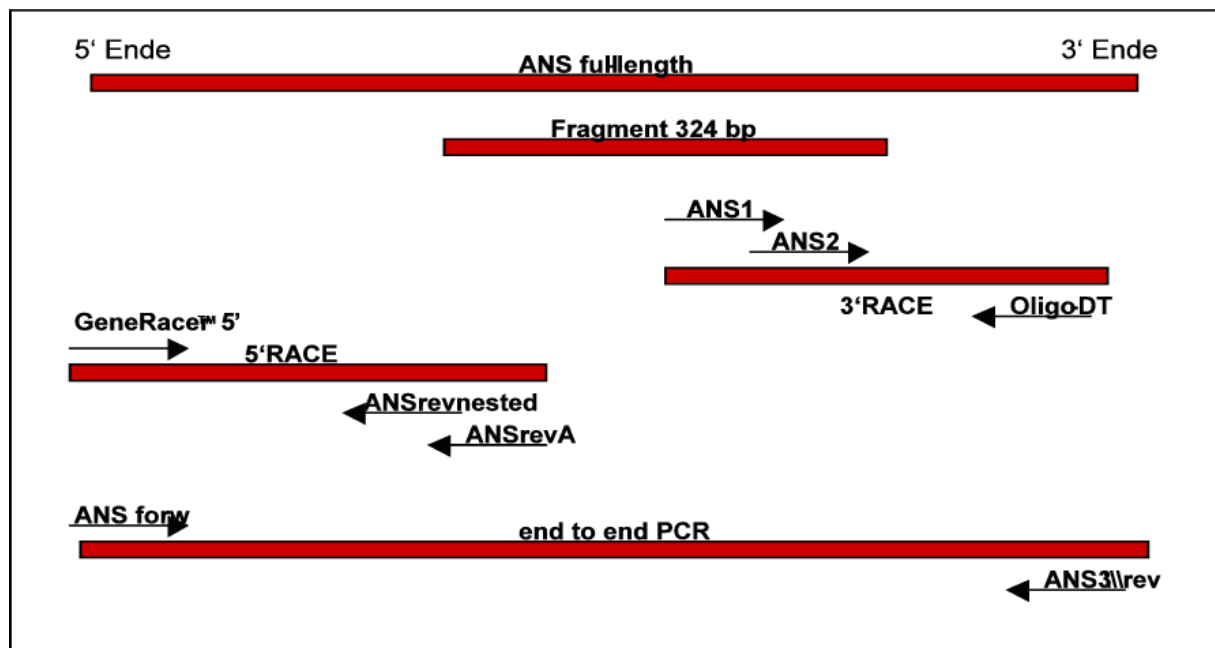


Abb. C.16: Darstellung der Klonierung eines ANS cDNA-Klons

Da nach der ersten 3'RACE mit den ANS1- und Oligo-dT-Anchor-Primern kein eindeutiges Amplifikat erzielt wurde, wurde eine *nested*-PCR mit dem 5'Reverse-Primer ANS2 durchgeführt. Das erhaltene Fragment enthielt 726 bp einschließlich Stopcodon und Poly-A-Schwanz.

Für die Amplifikation des 5'Endes wurde die nach dem Protokoll für das RLM-RACE behandelte mRNA in cDNA nach Standardprotokoll umgeschrieben. Da die erste 5'RACE mit dem genspezifischen reverse Primer ANSrevA nicht zu einem eindeutigem Amplifikat führte, wurde eine *nested*-PCR mit einem weiter *upstream* liegendem Primer (ANSrevnested) durchgeführt. Das erhaltene Fragment wies neben der bis zum ATG fehlenden Sequenz einen *leader* Bereich von 136 bp auf. Aufgrund der nun vorliegenden Sequenzinformationen konnten das außerhalb der codierenden Sequenz liegenden Primerpaar ANSforw und ANS\\rev für eine *end to*

end-PCR abgeleitet werden. Das daraus resultierende Fragment wies eine Länge von 1289 bp und einen offenen Leserahmen für 218 AS auf. Der Vergleich mit Sequenzen aus der GenBank erbrachte eine Homologie von 81 % und 83 % auf DNA- bzw. AS-Ebene mit der ANS aus *Vitis labrusca* x *Vitis vinifera* (Acc: BACO7545). Die zweithöchste Übereinstimmung wurde mit jeweils 80 % auf DNA- und AS-Ebene mit der ANS aus *Camellia sinensis* (Acc: AAV88087) gefunden. Mit Hilfe des Primerpaars ANSfor und ANSrev wurden 3 putative full length ANS cDNA-Klone aus der rotblühenden Sorte 'Nordlicht' und 5 aus der weißblühenden Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' amplifiziert. Alle erhaltenen putativen ANS Klone wiesen einen offenen Leserahmen auf, wobei die Aminosäuresequenz bei 7 von 8 Klonen identisch ist. Der Sequenzvergleich mit weiteren bekannten Sequenzen zeigte zudem die konservierten Regionen His-147, Asp-149 und His-183, die vermutlich für die Koordinierung des Eisens am katalytischen Zentrum der 2-Oxoglutarat-abhängigen Enzyme (Britsch et al., 1993; Prescott, 1993; De Carolis und De Luca, 1994; Prescott und John, 1996; Roach et al., 1997) verantwortlich sind. Weiter ist die spezifische Bindungsstelle Arg-191 in der Aminosäuresequenz der Azalee konserviert (Lukacin und Britsch, 1997) (Abb. C.17).

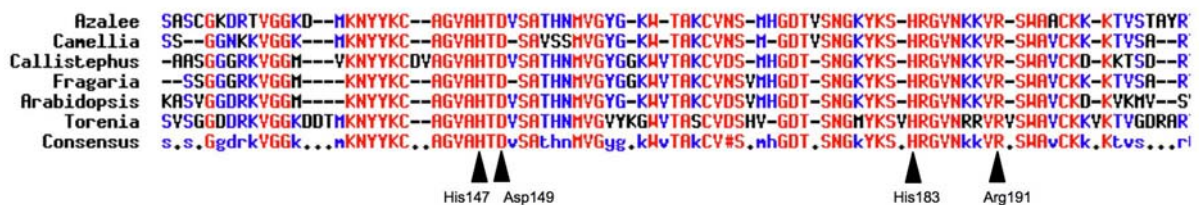


Abb. C.17: Alignment der Aminosäuresequenz der putativen ANS (Ausschnitt); Azalee (*Rhododendron simsii*); Camellia (*Camellia sinensis*, Acc.: AAV88087); Callistephus (*Callistephus chinensis*, Acc.: AAB66560); Fragaria (*Fragaria x ananassa*, Acc.: AAU12368); Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, Acc.:1GP6A); Sinningia (*Sinningia cardinalis*, Acc.: AAR01567); Torenia (*Torenia fournieri*, Acc.: BAB21477)

Pfeile zeigen die konservierten Bereiche His-147, Asp-149 und His-183, sowie Arg-191.

Das Alignment wurde mit dem Programm MultAlign erstellt

Der ANS-Klon aus der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' wurden in *Saccharomyces cerevisiae* im Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO[®] (Invitrogen) heterolog exprimiert. Die Hefeexpression und der nachfolgende Enzymtest wurden von Frau Anja Preuß am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Hierbei konnte die Reaktion von Leukopelargonidin zu Pelargonidin mit der in Hefe

exprimierten ANS aus der weißblühenden Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' gezeigt werden (Abb. C.18).

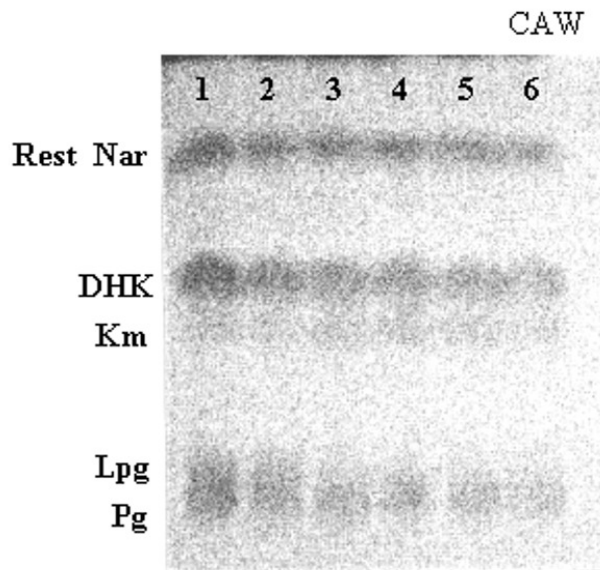


Abb. C.18: Nachweis der Aktivität der in Hefe exprimierten ANS aus Mevrouw 'Edmond Troch'; 1 u. 2: Azaleen ANS; 3 u. 4: Malus ANS; 5 u. 6: Pyrus ANS (Proteinmenge: 100µl; Temp: 30°C; Zeit: 30 min; zur Bildung des Substrats Lpg erfolgte eine Vorinkubation von DHK mit heterolog exprimierter DFR aus *Callistephus*; DC-Cellulose, Laufmittel: CAW), die Abbildung wurde von Anja Preuß, Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt

C.1.4.1.2 Klonierung eines putativen FHT cDNA-Fragmentes

Mit Hilfe des partiell degenerierten FHT5'1-Primer und des Oligo-dT-Anchor-Primers konnte ein putatives FHT cDNA-Fragment mit vollständigen 3'Ende kloniert werden. Das Fragment wies eine Länge von insgesamt 906 bp mit einem offenen Leserahmen für 263 Aminosäuren auf. Der Vergleich mit in der GenBank vorhandenen Sequenzen erbrachte eine Homologie von jeweils 91 % auf DNA- und Aminosäureebene mit *Camellia sinensis* (Acc: AAT68774).

C.1.4.2 Halbquantitative Expressionsstudien

Untersucht wurden die farbige Standardsorte 'Nordlicht' und die vier weißblühenden Sorten 'Mevrouw Edmond Troch', 'Ballerina', 'Schneekönigin' und 'Winterperle' über alle fünf Blütenstadien. Die Primerkombinationen für *chs* und *dfr* wurden von den in der GenBank enthaltenen Sequenzen für *R. simsii* abgeleitet (Acc.: AJ413277 und AJ413278, De Schepper, 2001). Für die CHI lag am Lehrstuhl die Sequenz für ein ca. 500 bp langes Fragment vor, von dem jeweils ein *forward* und *reverse* Primer synthetisiert wurde (Pedross, unveröffentlicht). Die Primerkombinationen von *ans*

und *fht* konnten aus Sequenzen der vorangegangenen Klonierung konstruiert werden (siehe C.1.4.1.1 und C.1.4.1.2).

Für die halbquantitativen Genexpressionsstudien wurde zunächst die optimale Annealingtemperatur für jede Primerkombination bestimmt. In der Regel findet nach ca. 30 PCR-Zyklen keine Verdopplung der Amplifikate mehr statt. Da diese Phase in den jeweiligen PCR-Systemen nach einer unterschiedlichen Anzahl von Zyklen erreicht werden kann, wurde der lineare Verlauf der Amplifikation der einzelnen PCR-Produkte bestimmt. Für die weiteren Expressionsstudien wurde die jeweilige Anzahl der Zyklen innerhalb des linearen Verlaufs gewählt. Als Template diente cDNA der Sorte 'Nordlicht' aus einem Gemisch der Blütenstadien 1 bis 4. Die Tab. C2 gibt einen Überblick über die ermittelten Annealingtemperaturen, die gewählten Zyklenzahlen und der zu erwartenden Fragmentlängen:

Tab. C2: Optimale Annealingtemperatur und Zyklenzahl der verwendeten Primerkombinationen

Gen	Primerkombination	Annealingtemperatur	Zyklenzahl	Fragmentlänge
<i>chs</i>	5'CHS1 und 3'CHS2	65°C	26	ca. 1050 bp
<i>chi</i>	CHI5'4 und CHI3'4	50°C	29	ca. 290 bp
<i>fht</i>	FHT5'3 und FHT3'4	55°C	29	ca. 450 bp
<i>dfr</i>	5'DFR1 und 3'DFR2	62°C	28	ca. 1200 bp
<i>ans</i>	ANSforw. und ANS\\rev.	55°C	26	ca. 1000 bp

Für die Analysen wurde für jede untersuchte Sorte und jedes Blütenstadium die gleiche Menge an Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt.

Die PCR-Amplifikate wurden als Banden nach Auftrennung in Agarosegele unter UV-Licht quantitativ abgeschätzt. Als Referenz für den Expressionsstatus der untersuchten Gene wurden RT-PCRs mit Primern für die konstitutiv exprimierte GAPDH (Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt. Eine Amplifikation der GAPDH fand in allen fünf Blütenstadien der untersuchten Sorten statt, wobei die Ausprägung der Banden durchgehend homogen war.

Die Expressionsstudien an *chs*, *chi*, *fht*, *dfr* und *ans* erbrachten eine Amplifikation der jeweiligen Gene in jeder untersuchten Sorte und in jedem Blütenstadium (Abb. C.26). Die Studien an der in Blütenextrakten enzymatisch nicht nachweisbaren *ans* zeigten, dass das Gen sowohl in der rotblühenden Referenzsorte als auch in den weißblühenden Sorten prinzipiell exprimiert werden. Es konnte zudem keine

allgemein geringere Expression weißer Blüten gegenüber farbiger Blüten festgestellt werden. Zwar wurden bei der ANS-Expressionsstudie im BS2 der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' und BS4 der Sorte 'Ballerina' eine geringere Amplifikation gegenüber 'Nordlicht' beobachtet, doch waren die Bandenstärken dieser Varianten auch bei den Expressionsstudien für *chs*, *chi*, *fht* und *dfr* schwächer, so dass bei diesen Blütenstadien generell eine geringe Amplifikation vorliegt. Die Bandenstärken der zwei weiteren weißblühenden Sorten entsprechen durchgehend der rotblühenden Referenz. Auch der Vergleich zwischen roten und weißen Blüten bei den Studien der *chs*, *chi*, *fht* und *dfr* erbrachte keine auffällig geringere oder höhere Expression der untersuchten Gene. Die Studien der *dfr* zeigten interessanterweise bei fast allen Sorten starke Banden im BS1 mit schwächeren Banden in den Blütenstadien 2, 3 und 4 und wiederum eine starke Expression im letzten Blütenstadium (BS5).

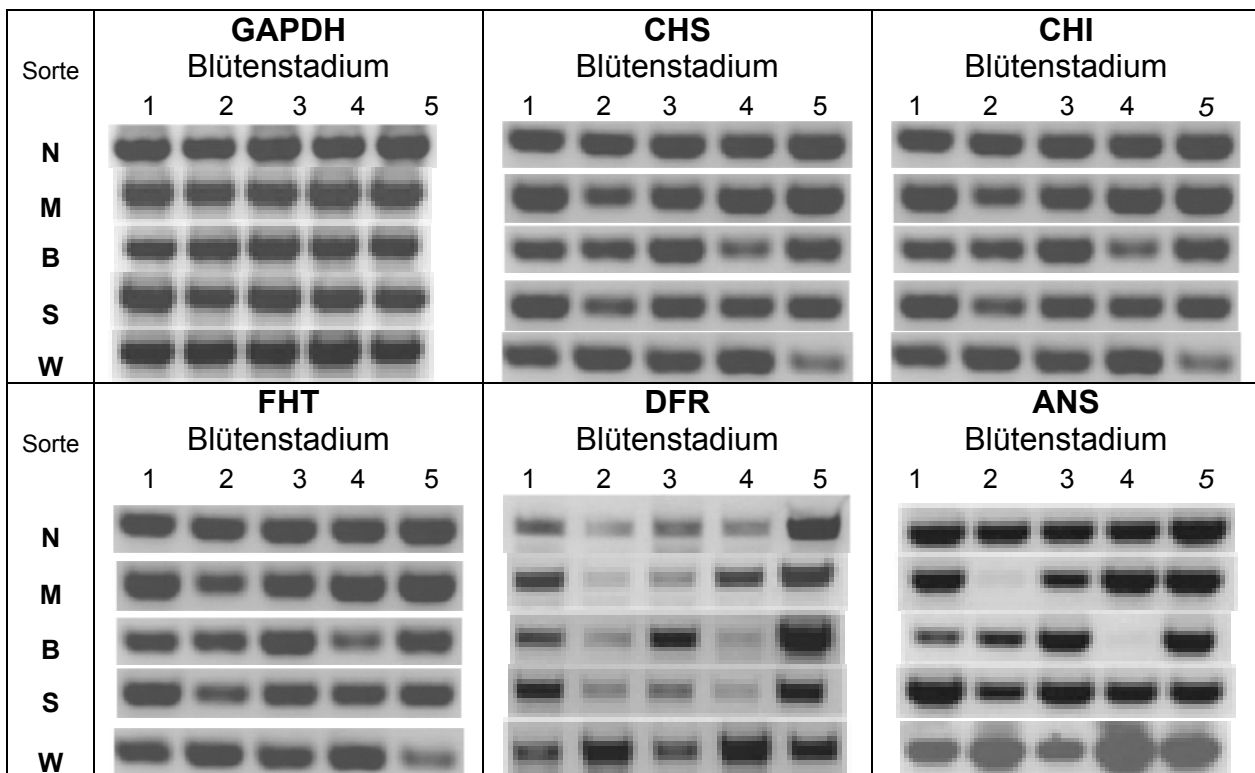


Abb. C.19: Expressionsstudien der *gapdh*, *chs*, *chi*, *fht*, *dfr* und *ans*,

Abkürzungen: N = 'Nordlicht'; M = 'Mevrouw Edmond Troch'; B = 'Ballerina'; S = 'Schneekönigin';

W = 'Winterperle'

C.2 Transformation von *Rhododendron simsii*

Für Transformationsexperimente an *R. simsii* mussten zunächst verschiedene Azaleensorten in Gewebekultur überführt und vermehrt werden. Die hierbei etablierten Sorten dienten im Anschluß als *in vitro*-Material für weiterführende Experimente. Voraussetzung für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist

die Regeneration adventiver Sprosse aus dem transformierten Gewebe. Für nachfolgende Transformationsexperimente war es daher unerlässlich, ein Regenerationssystem für Azaleen am Lehrstuhl zu etablieren. Zusätzlich wurden Bewurzelungsversuche an *in vitro*-Sprossen vorgenommen um, eine spätere Überführung von regenerierten und transgenen Sprossen *extra vitrum* zu erleichtern. Die Vorgehensweise zum Aufbau eines Systems für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist schematisch in Abb. C.20 dargestellt:

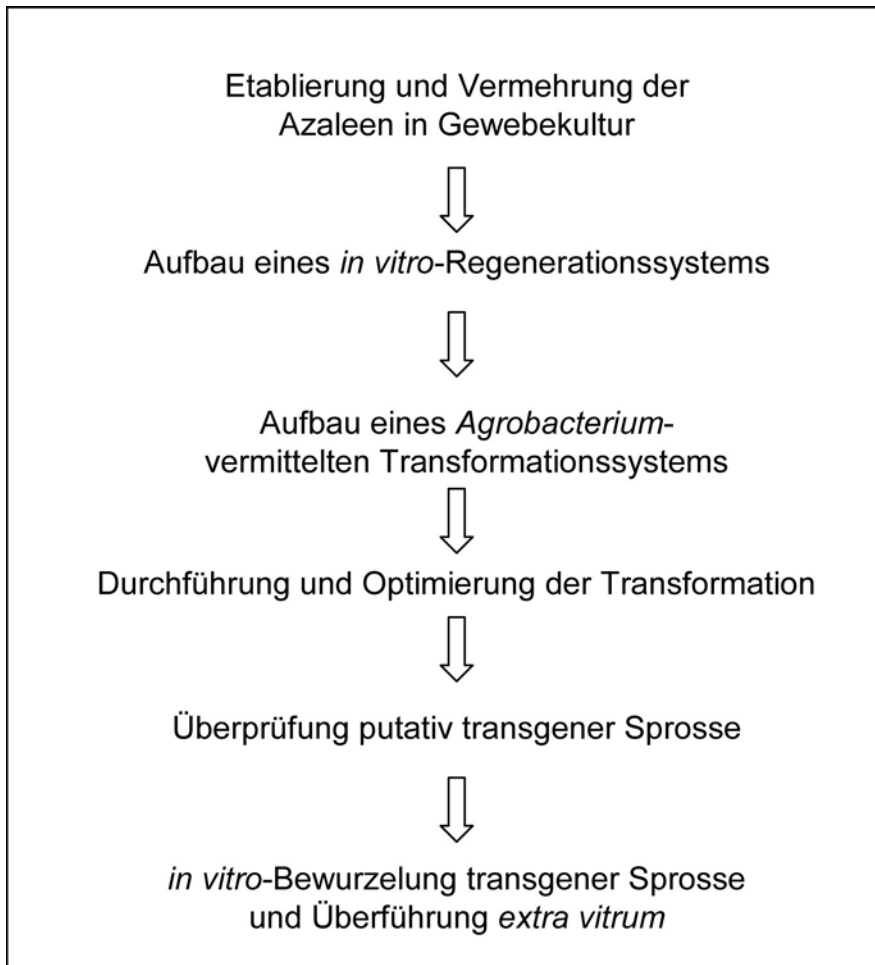


Abb. C.20: Vorgehensweise bei der Etablierung eines Transformationssystems für Azaleen

Eine tabellarische Auflistung der vorgenommenen Versuche ist im Anhang ab S. 154 dieser Arbeit beigefügt. Ein Teil der Versuche wurde im Rahmen zweier von mir betreuten Diplomarbeiten durchgeführt (Taubenböck, 2004; Pfeufer, 2006).

C.2.1 Etablierung von *Rhododendron simsii* in die Gewebekultur

In den ersten Versuchen zur Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur (Versuche E1 und E3*, Tab. G5 im Anhang, S. 154) wurden zwölf weißblühende Sorten bzw. Linien nach dem unter Punkt B.2.5.1 beschriebenen Verfahren oberflächensterilisiert

und präpariert. Als Ausgangsmaterial wurden Triebspitzen und das darunter liegende Stängelgewebe mit 1 bis 2 Nodi verwendet. Als Basalmedium diente bei allen verwendeten Sorten das Nährmedium nach Anderson (1984), sowie bei vier der zwölf Sorten zusätzlich das Woody Plant Medium (WPM) nach Lloyd und McCown (1980) und das ER-Medium nach Economou und Read (1984). Ca. 2 Monate nach Versuchsbeginn bildeten 70 bis 80 % der auf Andersonmedium angelegten Explantate einen Neuaustrieb sowohl aus den Triebspitzenexplantaten als auch aus den Achselknospen der Nodiexplantate (Versuch E1, siehe Tab. G5, S. 154). Die im Versuch E3* verwendeten Sorten zeigten eine höhere Austriebsrate auf den WPM- und ER-Medium im Vergleich zum Andersonmedium. Zudem bildeten 71 bis 100 % der auf WPM und ER angelegten Triebspitzen einen Neuaustrieb im Gegensatz zu den Nodiexplantaten mit einer Sprossbildungsrate von 0 bis 64 %.

Die aus den Triebspitzen und Achselknospen gebildeten Sprosse wurden zur Weiterkultur und Vermehrung auf Anderson-, ER- und WPM-Medium umgesetzt (Versuche E2 und E5*, Tab. G5 und Tab. G6, S. 154f). Nach ca. 4 bis 6 Wochen wiesen fast alle Sorten Blattchlorosen sowie Verbräunungen und Nekrotisierungen an der Schnittstelle des Stängels auf. Der Austrieb von neuen Sprossen geriet ins Stocken oder blieb gänzlich aus. Zwei Monate nach Versuchsbeginn starben bei ca. einem Drittel der verwendeten Sorten alle Sprosse ab.

Eine erfolgreiche Etablierung in die Gewebekultur konnte zunächst nur mit Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' erreicht werden (Versuche E4* und E5*, Tab. G6, S. 155,). Die Sprossbildung der aus dem Gewächshaus überführten Triebspitzen war bei allen drei verwendeten Basalmedien zu 100 % möglich. Die weitere *in vitro*-Kultivierung und Vermehrung verlief mit 80 - 90 % Sprossneubildung auf den Medien ER und WPM erfolgreich. Zusätzlich zeigte eine Verwendung von Reagenzgläsern mit Steristopfen aus gepresster Cellulose anstelle der sonst üblichen Reagenzgläser mit Glasdeckel eine erhöhte Sprossneubildung von etwa 10 %. Bei den fünf weiteren Sorten, die in diesem Versuch verwendet wurden, konnte aufgrund fehlender Neuaustriebe keine *in vitro*-Vermehrung erreicht werden.

In weiteren Versuchsreihen wurde zu einem späteren Zeitpunkt die Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' auf Andersonmedium in Weckgläsern *in vitro* etabliert (Versuch E6, Tab. G6, S. 155). Verwendet wurden Triebspitzen und Stängel explantate mit jeweils 4 bis 5 Nodi. An 48 % der angelegten Stängel explantaten wuchsen aus den Achselknospen Sprosse, 33 % der Triebspitzen explantate bildeten einen

Neuaustrieb aus (Abb. C.21). Die Sprosse konnten abgenommen und wie unter B.2.5.2 beschrieben kultiviert und vermehrt werden. Im weiteren Kulturverlauf wurde ausreichend *in vitro*-Material der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' für Versuche zur Etablierung des Regenerations- und Transformationssystems, sowie für Bewurzelungsversuche zur Verfügung gestellt.



Abb. C.21: Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur; links: Azaleenstängelkultur im Weckglas; mitte : Nahaufnahme der Stängel mit Neuaustrieben aus den Achselknospen; rechts: Kultur der *in vitro*-Sprosse in Petrischalen auf Vermehrungsmedium

C.2.2 Bewurzelung *in vitro*

Es wurden Sprosse von sechs Azaleensorten auf Anderson-Medium mit reduziertem NaFe-EDTA-Gehalt und 2 mg/l IAA in sterilen Weckgläsern und Babynahrungsgläser mit Filterdeckel kultiviert (Versuch B1*, Tab. G7 im Anhang, S. 156). Bei keiner der verwendeten Sorten konnte eine Wurzelbildung beobachtet werden.

In den darauf folgenden Versuchen wurde ausschließlich die Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' verwendet. In ersten Vorversuchen wurde die Eignung verschiedener Basalmedien, verschiedener IAA-Konzentrationen und die Zugabe von Aktivkohle (0,3 %) an jeweils 20 Sprossen je Versuchsvariante getestet (Versuche B2, Tab. G7, S. 156). Dabei konnte bei einer Kultivierung der Sprosse auf Anderson-Medium mit 2 mg/l IAA und 0,3 % Aktivkohle an 10 von 20 Explantaten eine Wurzelbildung *in vitro* erreicht werden. Die Wiederholung dieses *in vitro*-Bewurzelungsversuches (Versuch B3) ergab 19 bewurzelte Azaleensprosse von insgesamt 60.

C.2.3 Etablierung eines Regenerationssystems

Zur Etablierung eines Regenerationssystems von Adventivsprossen aus *in vitro*-Blattexplantaten wurde zunächst damit begonnen für *R. simsii* bestehende Verfahren nach Mertens et al. (1996) (Methode 1) und Samyn et al. (2002) (Methode 2) auf ihre Eignung für die zehn zur Verfügung gestellten Sorten zu testen (Versuche R1 und R2, Tab. G8 im Anhang, S. 157). Beide Methoden unterscheiden sich in der

Präparationsweise der *in vitro*-Blätter, in der Zusammensetzung der Basalmedien und in der Phytohormonkombination (Tab. C3).

Tab. C3: Vergleich der Regenerationsprotokolle für Azaleen nach Mertens et al. (1996) und Samyn et al. (2002)

	Präparations- methode	Nährmedium und Zusätze	Hormone
Methode1: Mertens et al. (1996)	<i>in vitro</i> -Blätter quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	Anderson (1984)	•Kallusinduktion in Woche 1 und 2: 2 mg/l 2,4-D 0,75 mg/l Zea •Sprossinduktion ab Woche 3 15 mg/l Zea oder 2 mg/l TDZ
Methode2: Samyn et al. (2002)	<i>in vitro</i> -Blätter ganz einschließlich der Petiole, abaxial auf das Medium gelegt	½ MS +25mg/ NaFeEDTA	0,375 mg/l NAA 2 mg/l TDZ

Bei keiner der getesteten zehn Sorten konnte mit diesen Verfahren eine Regeneration von Adventivsprossen erreicht werden. Bereits zwei Wochen nach Versuchsbeginn traten Verbräunungen und Nekrotisierungen an den Blattgeweben auf. Nach weiteren zwei Wochen wurden an sieben Sorten eine Zunahme der Blattfläche und eine leichte Kallusbildung an den Wundrändern bzw. an den Petiolen beobachtet. Ca. neun Wochen nach Anlage der Kultur starben die Explantate aller Varianten ab. Die folgende Abbildung zeigt die Sorte 'Ballerina' auf Regenerationsmedium (Methode1) zwei Wochen und neun Wochen nach Versuchsbeginn (Abb. C.22):



Abb. C.22: Blattexplantatkultur der Sorte 'Ballerina' nach dem Protokoll nach Mertens et al. (1996); links: 2 Wochen nach Versuchsbeginn; rechts: neun Wochen nach Versuchsbeginn

Aufgrund der erfolgreichen Etablierung der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' in die Gewebekultur wurde diese ebenfalls auf Eignung zur Adventivsprossregeneration mit den oben genannten Protokollen und einem dritten Protokoll nach Tomson und Gertner (2003) getestet (Versuche R3*, R4* und R5*, Tab. G8 und Tab. G9,

S. 157f). Zusätzlich wurden als Kulturgefäße Petrischalen und Babynahrungsgläser mit Filterdeckel verglichen. Bei keiner der getesteten Varianten konnte die Regeneration von Sprossen festgestellt werden. Auch bei der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' traten die schon zuvor beobachteten Verbräunungs- und Nekrotisierungserscheinungen auf.

Da zunächst keine weiteren Azaleensorten zur Verfügung standen, wurde mit der Entwicklung eines neuen *in vitro* Regenerationsprotokolls begonnen. Hierzu wurden verschiedene Phytohormonkombinationen mit Hilfe eines Hormonrasters, sowie die Eignung von *in vitro*- und *extra vitrum*-Blättern untersucht (Versuche R6*, R7* und R8*, Tab. G9 und Tab. G10, S. 158f). Eine Adventivsprossregeneration (Regenerationsrate: 20 %) konnte bei *extra vitrum*-Explantaten der Linie 2000/5 und der Hormonkombination 1,75 mg/l IAA und 4,4 mg/l TDZ erreicht werden.

Um die weiterhin auftretenden Verbräunungen an den Blattexplantaten zu reduzieren, wurde die Kultivierung der Explantate in den ersten zwei Wochen im Dunkeln (Versuche R9* und R11*, Tab. G10, S. 159), sowie die Zugabe von Aktivkohle, PVP, Ascorbinsäure, Zitronensäure und Na-Ascorbat (Versuche R12*, R13*, R14, R15 und R16, Tab. G11 und Tab. G12, S. 160f) getestet. Während des regelmäßigen Umsetzens auf frisches Nährmedium wurden nekrotische Gewebebereiche entfernt. Insbesondere durch die Zugabe von 50 mg/l Ascorbinsäure oder 50 mg/l Na-Ascorbat konnten die hohen Ausfälle durch Absterben der Explantate zwar reduziert werden, auch wurde eine höhere Kallusbildungsrate beobachtet, es konnte aber keine ausreichende Adventivsprossregeneration erreicht werden.

Nach erfolgreicher Etablierung der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' in die Gewebekultur (siehe C.2.1) wurde nun auch diese auf Eignung zur Sprossregeneration überprüft (Versuch R17-1 und R17-2, Tab. G12, S. 161). Getestet wurden die in Tab. C3 aufgeführten Methoden 1 und 2. Zur Sprossinduktion nach Mertens et al. (1996) wurde 2 mg/l TDZ verwendet. Variiert wurde zudem die Dauer der Kallusinduktion. Beide Regenerationsprotokolle wurden zusätzlich an der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' getestet (Versuch R17-3 und R17-4, Tab. G12, S. 161).



Abb. C.23: Adventivsprossregeneration an *in vitro*-Blattexplantaten: A: Kallussum am Wundrand eines Blattexplantats der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch'; B: Kallusbildung an der Petiole eines Blattexplantats der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint'; C: Regeneration an Blattexplantaten der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch'; D: Regeneration an Blattexplantaten der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint'

Zwei Wochen nach Versuchsbeginn bildeten die quer zur Mittelrippe geteilten Explantate einen Kallussum am Wundrand, an denen nach weiteren acht Wochen erste Adventivsprosse regenerierten. Die Petiolen der unverletzten Blätter schwellen zunächst auf und bildeten schließlich einen Kallus aus. Nach ebenfalls acht Wochen regenerierten die ersten Sprosse auch an diesen Explantaten (Abb. C.23). 10 Wochen nach Anlage der Versuche erfolgte die erste Bonitur der Regeneration. 50 % bzw. 54 % der Explantate der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' bildeten Adventivsprosse aus. Dagegen fiel bei gleicher Behandlung die Regeneration der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' sehr gering aus (Tab. C4)

Tab. C4: Regenerationsraten der Versuchsvarianten R17-1 bis R17-4 nach 10 Wochen;
Regenerationsrate in % = Anteil Explantate mit Adventivsprossregeneration; n = 516

Sorte	Methode		Einfluss Methode
	1	2	
	%	%	χ^2
'Mevrouw Edmond Troch'	50,3	54,0	ns
'Mevrouw Gerard Kint'	0,0	2,2	ns
Einfluss Sorte (χ^2)	***	***	

Zum Vergleich der Regenerationsraten unter Einfluss zwei verschiedener Sorten bei gleicher Methode, sowie unter Einfluss unterschiedlicher Protokolle bei gleicher Sorte, wurde der Chi²-Test angewendet.

ns = nicht signifikant

*** = signifikant ($\alpha = 0,01\%$)

Neben der Zählung der Explantate mit Adventivsprossregeneration erfolgte eine Bonitur der durchschnittlichen Größe der Sprosse am Explantat. Die Sprosse der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' wiesen hierbei keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der verwendeten Regenerationsverfahren auf. Die wenigen regenerierenden Explantate der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' auf Nährmedium nach Samyn et al. (2002) bildeten große, gut subkultivierbare Adventivsprosse aus (Tab. C5).

Tab. C5: Größe der regenerierten Adventivsprosse in Abhängigkeit der Sorte und Methode; n = 516

Sorte	Methode	
	1	2
'Mevrouw Edmond Troch'	A 2,1 a	A 1,9 a
'Mevrouw Gerard Kint'	B 1,0 a	B 1,1 a

Angabe der Adventivsprossgröße nach Boniturnoten (siehe B.2.5.4)

Mittelwerte mit gleichen Großbuchstaben in der Spalte und mit gleichen Kleinbuchstaben in der Zeile sind nicht signifikant unterschiedlich nach Tukey Test (P=0,05)

Nach Abnahme der regenerierten Sprosse wurden die verbliebenen Kalli weitere zehn Wochen kultiviert und die erneute Bildung von Sprossen beobachtet. In dieser Zeit blieben signifikant mehr Explantate der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' auf Sprossinduktionsmedium nach Mertens et al. (1996) als auf Medium nach Samyn et al. (2002) weiterhin regenerativ (Tab. C6).

Tab. C6: Regenerationsraten der Versuchsvarianten R17-1 bis R17-4 nach 20 Wochen;
Regenerationsrate in % = Anteil Explantate mit Adventivsprossregeneration; n = 418

Sorte	Methode		Einfluss Methode
	1	2	
	%	%	χ^2
'Mevrouw Edmond Troch'	72,6	48,1	***
'Mevrouw Gerard Kint'	2,0	55,1	***
Einfluss Sorte (χ^2)	***	ns	

Zum Vergleich der Regenerationsraten unter Einfluss zwei verschiedener Sorten bei gleicher Methode, sowie unter Einfluss unterschiedlicher Methoden bei gleicher Sorte, wurde der Chi²-Test angewendet.

ns = nicht signifikant

*** = signifikant ($\alpha = 0,01\%$)

C.2.3.1 Optimierung des Regenerationssystems

In weiterführenden Versuchen wurde das Verfahren zur Regeneration von Adventivsprossen an Blattexplantaten der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' optimiert. Als Ausgangspunkt diente das in Tab. C3 beschriebene Verfahren nach Mertens et al. (1996). In den Versuchen R18-1, R18-2 und R18-3 (Tab. G13 im Anhang, S. 162) wurde der Einfluss der Kallusinduktionsdauer (1, 2 oder 3 Wochen), sowie die Verwendung der Auxine NAA und 2,4-D untersucht, bei anschließender Sprossinduktion mit 2 mg/l TDZ (Tab. C7).

Tab. C7: Regenerationsrate von Blattexplantaten unter den Einfluss zweier Auxine und unterschiedlicher Dauer der Kallusinduktionsphase; Regenerationsrate in % = Anteil Explantate mit Adventivsprossregeneration; n = 221

Auxin	Kallusinduktionszeit			Einfluss Zeit
	1 Wo	2 Wo	3 Wo	
	%	%	%	χ^2
NAA	43,2	55,6	70,4	**
2,4-D	60,5	71,4	75,6	ns
Einfluss Auxin (χ^2)	*	*	ns	

Zum Vergleich der Regenerationsraten unter Einfluss zweier Auxine mit gleicher Kallusinduktionsdauer, sowie unter Einfluss unterschiedlicher Kallusinduktionszeiten bei gleichem Auxin, wurde der Chi²-Test angewendet.

ns = nicht signifikant

* = signifikant ($\alpha = 5\%$)

** = signifikant ($\alpha = 1\%$)

Die Dauer der Kallusinduktionsphase ist insbesondere unter Verwendung des Auxins NAA signifikant. Nach einer 3wöchigen Kallusinduktion regenerierten über 70 % der

angelegten Explantate, wobei hier die Verwendung von NAA und 2,4-D keinen Unterschied erbrachte. Die Verwendung des Auxins 2,4-D führt dagegen zu einer signifikant höheren Regenerationsrate bei einer 2wöchigen Kallusinduktion, die sich nicht vom Regenerationserfolg bei einer 3wöchigen Induktion unterscheidet.

Weiter wurde der Einfluss der Cytokinine Zeatin und Thidiazuron auf die Regenerationsrate und die Größe der Adventivsprosse während der Sprossinduktion untersucht (Versuch R19, Tab. G13, S. 162). Bei Verwendung des natürlichen Cytokinins ZEA bildeten 47 % der angelegten Blattexplantate Adventivsprosse aus. Die Regenerationsrate auf TDZ-haltigem Medium fiel mit 69 % höher aus, allerdings bildeten die Explantate zum Zeitpunkt der Bonitur kleinere Sprosse aus (Tab. C8).

Tab. C8: Regenerationsrate und Größe der Adventivsprosse in Abhängigkeit des verwendeten Cytokinins im Sprossinduktionsmedium; Regenerationsrate in % = Anteil Explantate mit Adventivsprossregeneration; n =213

Cytokinin	Regenerationsrate	Adventivsprossgröße
ZEA	47 %	1,9 A
TDZ	69 %	1,4 B

Angabe der Adventivsprossgröße nach Boniturnoten (siehe B.2.5.4)
Mittelwerte mit unterschiedlichen Großbuchstaben in der Spalte sind signifikant unterschiedlich nach Tukey Test (P=0,05)

C.2.4 Etablierung eines Transformationssystems

Alle Transformationsexperimente wurden an der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' durchgeführt. Da die von Mertens et al. (1997) beschriebene Methode zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von *R. simsii* nicht zu einem Regenerationserfolg führte, wurde zur Etablierung eines Transformationssystems die Eignung zweier *Agrobacterium*-Stämme, die Infektionsmethoden, die Dauer der Präkultur, die Stärke des Selektionsdrucks und die Eliminierung der Agrobakterien nach der Kokultur untersucht.

Verwendet wurden die *Agrobacterium*-Stämme EHA 105 bzw. LBA 4404 mit dem Binärvektor pBI121, welcher das *uidA* Gen für die β -Glucoronidase (GUS) und das *nptII* Gen für die Kanamycinresistenz enthält.

Zudem wurde ein Mannose-Selektionssystem für Azaleen als Ersatz für Antibiotikamarker etabliert. Hierzu wurde der Transformationsvektor pNOV2819 (Syngenta) verwendet, der durch das Einsetzen des Reportergens *uidA* in die *multiple cloning site* modifiziert wurde.

Auswertung der Transformationsexperimente

In den ersten Transformationsexperimenten (Versuche T1, T2 und T3) konnte keine Regeneration putativ transgener Adventivsprosse, vermutlich aufgrund zu hoher Kanamycinkonzentration im Nährmedium, erzielt werden. Zur Überprüfung der Transformation wurden bei diesen Versuchen jedoch die Hälfte der angelegten Explantate eine Woche nach der Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* einem histochemischen GUS-Test unterzogen. Aufgrund der Blaufärbung der transgenen Zellen konnte damit die GUS-Aktivität des *uidA*-Gens in transformierten Blattexplantaten nachgewiesen werden. Die Abb. C.24 zeigt beispielhaft die Blaufärbung am Kallussum eines Azaleenexplantates ca. eine Woche nach der Transformation mit dem Agrobakterium-Stamm EHA105 und dem Vektor pBI121.

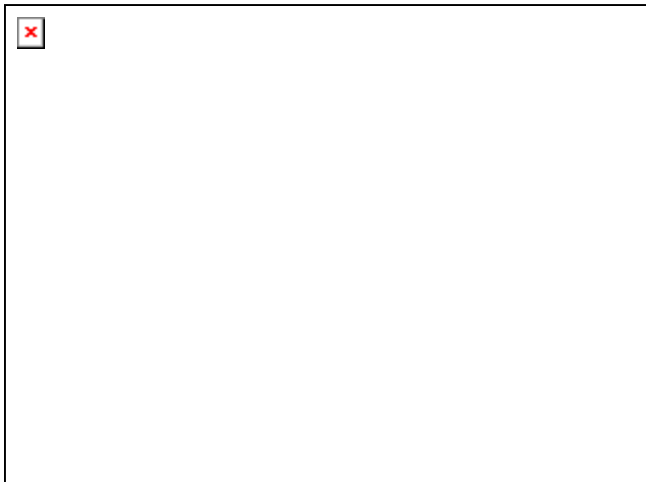


Abb. C.24: Blattexplantate mit GUS-Färbung am Kallussum

In späteren Transformationsversuchen (Versuche T4 bis T7 und M3) gelang die Regeneration von putativ transgenen Sprossen. Diese wurden vom Blattexplantat abgenommen und auf Vermehrungsmedium (Andersonmedium mit 1 mg/l IAA und 2 mg/l Zea) gesetzt. Adventivsprosse, die aus Azaleenblattexplantaten nach ca. 4 bis 5 Monaten gewonnen werden, sind in der Regel nur 2 bis 5 mm lang. Um eine ausreichende Menge genomischer DNA aus putativ transgenen *in vitro*-Sprossen für eine Überprüfung der Integration des transformierten Fremdgens mittels PCR-Methoden extrahieren zu können, sind daher mindestens ein bis zwei Vermehrungsphasen notwendig. Getestet wurde die Integration des für die Kanamycinresistenz codierenden Gens *nptII* und des für die β -Glucuronidase codierenden Reportergens *uidA*. Da nach Isolierung der Gesamt-DNA für einen Großteil der untersuchten *in vitro*-Sprosse nicht mehr genügend Material für die Extraktion der RNA zur Überprüfung der Genexpression mittels RT-PCR vorhanden

war, wurde lediglich die GUS-Aktivität mit Hilfe eines histochemischen Tests an einzelnen Sprossen oder den Sprossen entnommenen Blättern durchgeführt (Abb. C.25).



Abb. C.25: GUS-Färbung; links: GUS-Färbung eines transgenen *in vitro* Spross, rechts: GUS-Färbung an einem Blatt (entnommen von einem regenerierten transgenen *in vitro*-Spross)

C.2.4.1 Transformationsmethode

Die *Agrobacterium*-Stämme EHA 105 und LBA 4404 wurden auf Eignung zur Infektion von *R. simsii in vitro*-Blattexplantaten getestet. Verwendet wurde die *Leaf Disk*-Methode nach Horsch et al. (1985, siehe auch B.2.6.1, S. 49), sowie die Infektionsmethode nach Mertens et al. (1997), bei der die Agrosuspension direkt auf das Blattexplantat aufpipettiert wird (Versuche T1 und T2, Tab. G14 im Anhang, S. 163). Von jeder Variante wurde die Hälfte der angelegten Explantate für einen histochemischen Test zum Nachweis der GUS-Aktivität eingesetzt. Bei beiden Methoden wurden nach der Infektion mit dem *Agrobacterium*-Stamm EHA105 zwar eine höhere Anzahl Explantate mit GUS-Aktivität im Vergleich zum LBA4404-Stamm beobachtet, dieser Unterschied war jedoch bei Anwendung des χ^2 -Tests nicht signifikant. Dagegen konnte eine signifikante Verbesserung des Transformationserfolges bei Verwendung der *Leaf Disk*-Methode festgestellt werden (Tab. C9). Als besonders problematisch erwies sich bei der von Mertens et al. (1997) beschriebenen Infektionsmethode ein Überwachsen aller in der Kultur verbliebenen Explantate durch Agrobakterien ca. 3 Wochen nach der Infektion, trotz der Kultur auf Cefotaxim enthaltendem Nährmedium. Allerdings wurde dies auch bei knapp 50 % der Explantate der *Leaf Disk*-Methode beobachtet.

Tab. C9: GUS-Aktivität bei Verwendung zweier *Agrobacterium*-Stämme und zweier Infektionsmethoden; GUS-Aktivität in % = Anteil Explantate mit GUS-Aktivität 1 Woche nach Transformation; n = 163 (ohne Kontrolle)

Behandlung	<i>Agrobacterium</i> -Stamm		Einfluss <i>Agrobacterium</i>
	EHA105	LBA4404	
	%	%	χ^2
pipettieren der Agrosuspension	29,4	11,9	ns
<i>Leaf Disk</i>	72,5	57,5	ns
Einfluss Behandlung (χ^2)	***	***	

Zum Vergleich der GUS-Aktivität unter Einfluss zwei verschiedener *Agrobacterium*-Stämme bei gleicher Behandlung, sowie unter Einfluss unterschiedlicher Behandlungen bei gleichen *Agrobacterium*-Stämmen, wurde der Chi²-Test angewendet.

ns = nicht signifikant

*** = signifikant ($\alpha = 0,01\%$)

Um eine evtl. Steigerung der Transformationsrate zu erreichen, wurden 2 Wochen vorkultivierte Blattexplantate in der *Agrobacterium*-Suspension für 5 min einem Unterdruck von 10 mbar bzw. 20 mbar ausgesetzt, um eine Infiltration der Agrobakterien in das pflanzliche Gewebe zu erreichen (Versuch T2, Tab. G15, S. 164). Die Hälfte der Explantate jeder Variante wurde für den histochemischen GUS-Test eingesetzt. Keiner der durch Unterdruck mit Agrobakterien infiltrierten Explantate zeigte eine Woche später eine GUS-Färbung. Allerdings zeigten 73,9 % der nach der *Leaf Disk*-Methode transformierten Explantate eine GUS-Aktivität und damit eine ähnlich hohe Rate wie im Versuch T2. Von den in Gewebekultur verbliebenen Explantaten regenerierte keines Adventivsprosse, da die Explantate entweder abstarben oder durch *Agrobacterium*-Überwuchs ausfielen.

Für die weiteren Transformationsexperimente wurde die *Leaf Disk*-Methode und der EHA105-Stamm verwendet.

Zur Optimierung der Transformationsrate erfolgte in weiteren Versuchsreihen die Infektion direkt am Tag der Anlage der Blattexplantatkultur, nach 7 Tagen, nach 14 Tagen und nach 21 Tagen (Dauer der Präkultur, Versuch T3, Tab. G15, S. 164). Die Überprüfung der GUS-Aktivität wurde wie in den vorherigen Versuchen eine Woche nach Transformation an der Hälfte der Explantate je Variante durchgeführt. Die höchste Transformationsrate mit 78,1 % wurde nach einer 14tägigen Präkultur beobachtet. Sowohl eine Verlängerung als auch die Verkürzung der Vorkultur führte zu einer Verschlechterung der Transformationseffizienz (Abb. C.26). Eine

Regeneration von putativ transgenen Sprossen konnte auch bei diesem Versuch nicht erreicht werden.

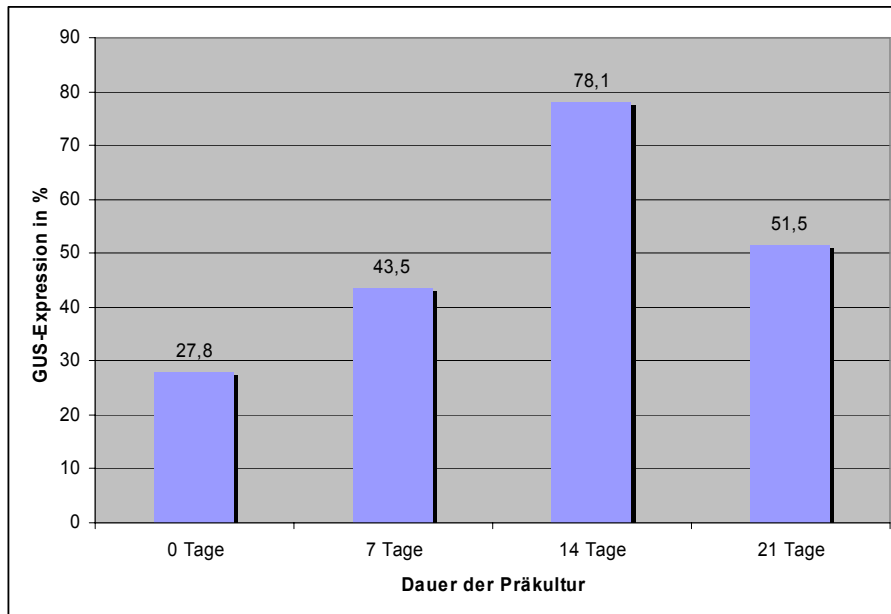


Abb. C.26: GUS-Aktivität bei unterschiedlicher Präkulturdauer; GUS-Aktivität in % = Anteil Explantate mit GUS-Aktivität 1 Woche nach Transformation; n = 129 (ohne Kontrolle)

C.2.4.2 Eliminierung der Agrobakterien

Da in allen bisherigen Versuchen ein Überwachsen an bis zu 30 % der Explantate durch Agrobakterien zu beobachten war, wurde die Verwendung verschiedener zur Abtötung gramnegativer Bakterien geeigneter Antibiotika untersucht. Getestet wurden die Antibiotika Timentin (Ticarcillin Clavulansäure), Carbenicillin und das bisher verwendete Cefotaxim bei Konzentrationen von 200 mg/l bzw. 500 mg/l (Versuch T4, Tab. G16, S. 165). Um den Einfluss dieser Antibiotika auf die Regenerationsfähigkeit zu untersuchen, wurde dem Medium kein Kanamycin zugegeben. Ein bis zwei Wochen nach der Transformation überzog alle transformierten und nicht mit Carbinicillin, Cefotaxim oder Timentin behandelten Blattexplantate ein Bakterien Schleim (Abb. C.27).

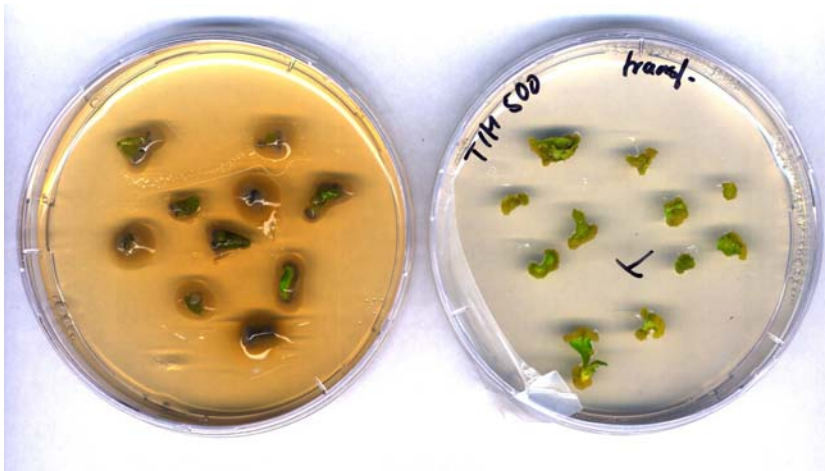


Abb. C.27: Azaleenexplantate 2 Wochen nach Transformation;

links:Medium ohne Antibiotikum, rechts: Medium mit 500 mg/l Timentin

Ein Wachstum von Bakterien wurde zudem an 33,3 % der Explantate mit einer 200 mg/l Cefotaxim-Behandlung und 9 % der Explantate mit einer 200 mg/l Carbenicillin-Behandlung beobachtet. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem Schleim um den verwendeten *Agrobacterium*-Stamm EHA105 handelt, wurde eine Probe auf Bakterienmedium mit 20 mg/l Rifampicin und einem weiteren Medium mit 50 mg/l Rifampicin und 30 mg/l Streptomycin ausgestrichen. EHA105 besitzt eine chromosomale Resistenz gegen das Antibiotikum Rifampicin, allerdings nicht gegen Streptomycin. Da ein Bakteriumwachstum nur auf Rifampicin enthaltendem Medium und nicht auf Streptomycin enthaltendem Medium stattfand, konnte davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Bakterien Schleim tatsächlich der verwendete *Agrobacterium*-Stamm war. Eine Unterdrückung des *Agrobacterium*-Wachstums konnte bei allen mit 500 mg/l behandelten Antibiotikavarianten erreicht werden, gleichzeitig aber wurde die Bildung adventiver Sprosse gehemmt. Die Regeneration war dagegen möglich bei jeweils 200 mg/l Cefotaxim und Timentin. Bei letzterer Behandlung konnte eine deutlich höhere Anzahl von Sprossen abgenommen werden. Eine spätere Überprüfung auf Transgenität mittels PCR ergab interessanterweise trotz fehlender Kanamycin-Selektion den Nachweis von fünf Sprossen mit *nptII*-Integration (Tab. C10).

Tab. C10: Eignung verschiedener Antibiotika zur Eliminierung der Agrobakterien und deren Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit

Variante	Anteil Explantate mit Agroüberwuchs in %	Anzahl regenerierte Sprosse	Nachweis der nptII-Integration
ohne Antibiotika, nicht transformiert	0	80	-
ohne Antibiotika, transformiert	100	0	-
200 mg/l Cefotaxim	33,3	13	0
500 mg/l Cefotaxim	0	0	-
200 mg/l Carbenicillin	9	0	-
500 mg/l Carbenicillin	0	0	-
200 mg/l Timentin	0	22	5
500 mg/l Timentin	0	0	-

Für alle folgenden Transformationsversuche (Versuch T5 bis T7, sowie M3-1 und M3-2) wurde zur Abtötung der an den Blattexplantaten anhaftenden Agrobakterien anstelle des Cefotaxims 200 mg/l Timentin verwendet.

C.2.4.3 Ermittlung des auf Antibiotika basierenden Selektionsdruck

In allen bisherigen Transformationsexperimenten bei denen die Explantate nach Mertens et al. (1997) mit 20 mg/l Kanamycin behandelt wurden, konnten keine Adventivsprossregeneration erreicht werden. In der Regel verbräunten die Explantate, bildeten keinen weiteren Kallus aus und starben 4 bis 6 Wochen nach Beginn der Antibiotikabehandlung ab. Im Folgenden wurde die zur Selektion transgener Zellen geeignete Kanamycinkonzentration für Azaleen neu ermittelt.

Im Versuch T5 (Tab. G16, S. 165) wurden die transformierten Explantate nach einer zweitägigen Kokultur auf Selektionsmedium mit 0 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l und 20 mg/l Kanamycin kultiviert. Jede Variante bestand aus 20 transformierten und 20 nicht transformierten Explantaten. Alle Explantate auf Medium ab einer Kanamycinkonzentration von 10 mg/l waren 6 Wochen nach Selektionsbeginn abgestorben. Ebenso die nicht transformierten Explantate der 5 mg/l-Variante. Dagegen bildeten 16 von 20 Blattexplantaten der transformierten Variante (Ausfall von 4 Explantaten durch Pathogenbefall) einen frisch grünen Kallus aus. Knapp 6 Monate nach der Transformation konnten von dieser Variante 11 Adventivsprosse abgenommen und auf Vermehrungsmedium weiterkultiviert werden. Nachdem nach weiteren 2 Monaten die Sprosse soweit vermehrt waren, dass ausreichend

Pflanzenmaterial zur Isolierung von genomischer DNA und für einen histochemischen Test zur Verfügung stand, wurde die Integration des *nptII*- und *uidA*-Gens und die GUS-Aktivität des *uidA*-Gens getestet. Hierbei konnten unter den 11 putativen transgenen Sprossen 4 *nptII*-positive und davon 2 mit GUS-Aktivität gefunden werden (Tab. C11)

Tab. C11: Selektion transformierter Azaleenexplantate bei 0 mg/l bzw. 5 mg/l Kanamycin

Kanamycin-Konzentration	transformiert	regenerierte Sprosse	<i>nptII</i> -Integration	<i>uidA</i> -Integration	GUS-Aktivität
0 mg/l	nein	> 100	-	-	-
0 mg/l	ja	52	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
5 mg/l	nein	0	-	-	-
5 mg/l	ja	11	4	3	2

Um die Selektionseffizienz zu verbessern, wurde im Versuch T6 (Tab. G16, S. 165) die Kanamycin-Konzentration ausgehend von 0 mg/l und 5 mg/l im 2wöchigen Rhythmus bis zu einer Endkonzentration von 5 mg/l bzw. 10 mg/l erhöht. Zur Kontrolle wurden auf jeder Selektionsvariante jeweils 26 transformierte und 26 nicht transformierte Explantate kultiviert. Die höchste Anzahl regenerierte Sprosse an transformierten Explantaten wurde bei einer verzögerten Selektion nach 2 Wochen mit zunächst 5 mg/l und im Anschluss 10 mg/l Kanamycin erzielt (Variante 0 → 5 → 10, Tab. C12). Von den 33 putativ transgenen Sprossen konnte die Integration des *nptII*-Gens bei 17 und die GUS-Aktivität bei 10 Sprossen festgestellt werden. Eine schwächere oder keine Selektion führte zwar zur Bildung adventiver Sprosse, diese waren allerdings nur zu einem geringen Anteil transgen. Die Selektion mit anfangs 5 mg/l Kanamycin und im Kulturverlauf steigenden Konzentrationen führte nicht zur Verbesserung der Transformationseffizienz.

Tab. C12: Ermittlung des auf Kanamycin basierenden Selektionsdrucks

Variante*	transformiert	regenerierte Sprosse	<i>nptII</i> -Integration	<i>uidA</i> -Integration	GUS-Aktivität
0 → 0 → 0	nein	>100	-	-	-
0 → 0 → 0	ja	54	2	2	0
0 → 5 → 10	nein	3	-	-	-
0 → 5 → 10	ja	33	17	16	10
0 → 5 → 5	nein	45	-	-	-
0 → 5 → 5	ja	30	6	5	3
5 → 5 → 10	nein	0	-	-	-
5 → 5 → 10	ja	2	1	1	0
5 → 10 → 10	nein	0	-	-	-
5 → 10 → 10	ja	0	-	-	-

* Angabe der Kanamycinkonzentration in mg/l

Da sowohl bei Versuch T4 als auch bei T6 transgene Sprosse auf Kanamycin-freien Medium auftraten, sollte in Versuch T7 (Tab. G16, S. 165) überprüft werden, ob prinzipiell eine Regeneration transgener Azaleensprosse auf selektionsfreien Medium möglich ist. Zum Vergleich wurde die Variante „0 mg/l → 5 mg/l → 10 mg/l“ aus Versuch T5 wiederholt. Wie schon in den Transformationsexperimenten zuvor, wurden von jeder Variante transformierte und nicht transformierte Explantate auf gleichem Nährmedium kultiviert. Es regenerierten auf Kanamycin-freien Medium erwartungsgemäß deutlich mehr Adventivsprosse als auf Selektionsmedium. Der PCR-gestützte Nachweis für die Integration von *nptII* wies ebenfalls erwartungsgemäß einen höheren Anteil transgener Pflanzen bei der selektierten Variante auf, wobei nur wenige Pflanzen eine GUS-Aktivität aufwiesen. Dennoch konnten unter 88 auf selektionsfreiem Medium entwickelten Sprossen 7 Transgene, darunter 3 mit GUS-Aktivität, nachgewiesen werden (Tab. C13).

Tab. C13: Azaleen-Transformation auf selektionsfreiem Medium

Variante*	transformiert	regenerierte Sprosse	<i>nptII</i> -Integration	<i>uidA</i> -Integration	GUS-Aktivität
0 → 0 → 0	nein	>100	-	-	-
0 → 0 → 0	ja	88	7	7	3
0 → 5 → 10	nein	11	-	-	-
0 → 5 → 10	ja	34	26	25	6

* Angabe der Kanamycinkonzentration in mg/l

C.2.5 Etablierung eines Mannose-Selektionssystems

Als Ersatz für Antibiotikamarker wurde ein auf Mannose basierendes Selektionssystem etabliert. Hierzu wurde der Transformationsvektor pNOV2819 (Syngenta) durch Einsetzen des für GUS codierenden *uidA*-Gens einschließlich eines Promoters und Terminators in die *multiple cloning site* modifiziert. Die für die Überprüfung der Eignung von Mannose als Selektionsagens notwendigen Vorversuche, sowie ein Teil der Transformationsexperimente wurden im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit durchgeführt (Pfeufer, 2006). Im Fall der Regeneration putativ transgener Adventivsprosse wurde ähnlich wie bei vorangegangenen Transformationsexperimenten die Integration des *uidA*-Gens und das für die 6-Phosphomannose-Isomerase codierende *manA*-Gen mittels PCR-Methoden überprüft. Da auch hier nicht genügend Pflanzenmaterial für die Überprüfung der Genexpression mittel RT-PCR zur Verfügung stand, wurde nur die GUS-Aktivität in Sprossen oder Blättern der transgenen Pflanzen getestet.

C.2.5.1 Klonierung einer GUS-Expressionskassette in pNOV2819

Aus dem binären Transformationsvektor pBI121 wurde mit den Primern 35S_for und NOSTer_rev mit *Pfu* Polymerase durch *sticky end* PCR die GUS-Expressionskassette samt 35S-Promoter und NOS-Terminator kloniert. Der pNOV2819-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *SpeI* verdaut. Nach Ligation in die *multiple cloning site* wurde der Vektor in *E. coli* transformiert. Erfolgreiche Ligationsprodukte wurden durch *Colony*-PCR und anschließenden Verdau mit *XbaI* und *SacI* bestätigt. Der neue Transformationsvektor wurde pNOVGUS genannt und in den *Agrobacterium*-Stamm EHA105 transformiert (Abb. C.28).

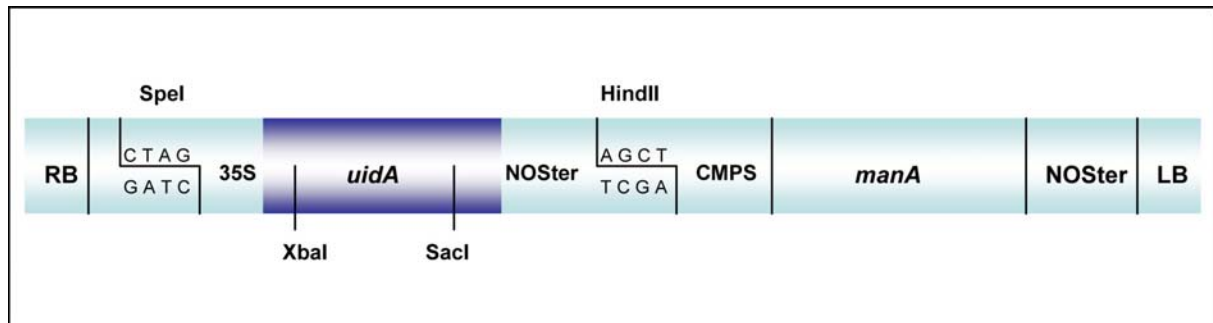


Abb. C.28: Schematische Darstellung der T-DNA des pNOVGUS-Konstrukts

Um die Funktionsfähigkeit der eingesetzten GUS-Expressionskassette zu prüfen, wurden *in vitro*-Blattexplantate von Azaleen mit pNOVGUS transformiert. Eine Woche nach Transformation wurden die Blattexplantate mit Hilfe des histochemischen Nachweisverfahren positiv auf GUS-Aktivität getestet. Die nicht transformierte Kontrolle wies keine Blaufärbung auf.

C.2.5.2 Ermittlung der Mannosekonzentration

Die Etablierung eines Mannose-Selektionssystems setzt Vorarbeiten im Bereich der Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Mannose zu Saccharose im Nährmedium voraus. Die ausschließliche Verwendung von Mannose als Kohlenstoffquelle im Selektionsmedium führt bei vielen Pflanzenarten zu einer vollständigen Inhibition der Regeneration des transformierten Gewebes. In der Regel wird durch die Zugabe einer bestimmten Menge an Saccharose in das Selektionsmedium die Regenerationsfähigkeit verbessert. Das optimale Mannose/Saccharose-Verhältnis ist für jede Pflanzenart individuell und muss daher in empirischen Untersuchungen ermittelt werden.

In Vorversuchen wurde die Mannosekonzentration, bei der eine Bildung adventiver Sprosse an untransformierten Azaleenexplantaten nicht mehr erfolgt, ermittelt (Versuch M1**, Tab. G17, S. 166). Hierbei konnte eine Regeneration bis zu einer Mannosekonzentration von 2 g/l und einer Saccharosekonzentration von 20 g/l beobachtet werden. Dagegen wurde die Regeneration bei diesem Versuch auf der nächst höheren Konzentrationsstufe von 5 g/l Mannose bereits gehemmt.

Um den optimalen Mannosegehalt zu bestimmen, bei der transformierte Blattexplantate adventive Sprosse ausbilden, es aber nicht zu einer Regeneration an untransformierten Explantaten kommt, wurde in einer zweiten Versuchsreihe die Hälfte der angelegten Explantate mit pNOVGUS transformiert (Versuche M2-1** und M2-2**, S. 166). Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurden

Mannosekonzentrationen von 0 g/l, 4 g/l und 5 g/l, bei zusätzlicher Saccharosegabe von 20 g/l untersucht. Erwartungsgemäß regenerierten die Blattexplantate auf Mannose-freiem Medium. Bei einer Konzentration von 4 g/l konnte zwar die Bildung von Sprossprimordien beobachtet werden, jedoch kam es weder bei der transformierten noch bei der untransformierten Variante zur Ausdifferenzierung der Sprosse.

In einer dritten Versuchsreihe wurden die Mannosekonzentrationen in 2 Wochen Abständen während des Kulturverlaufes gesteigert (Versuche M3-1 und M3-2, Abb. C15, S. 167). Der Saccharosegehalt blieb bei konstant 20 g/l. Wie im vorherigen Versuch wurde die Hälfte der Varianten mit pNOVGUS transformiert, die andere Hälfte blieb als Kontrolle untransformiert. Die höchste Anzahl an putativ transgenen regenerierten Sprossen wurde auf Selektionsmedium mit einer von 3 auf 5 g/l ansteigenden Mannosekonzentration (3 g/l → 4 g/l → 5 g/l) beobachtet. Von den 32 beobachteten Sprossen konnten aufgrund ihrer teilweise geringen Größe nur von 15 genomische DNA in ausreichenden Mengen extrahiert werden. Von diesen 15 wurde in 13 Sprossen die Integration des *manA*-Gens und des *uidA*-Gens nachgewiesen. Ein geringerer Selektionsdruck (3 g/l → 4 g/l → 4 g/l) führte nur zu 2 transgenen Sprossen von insgesamt 5 regenerierten Sprossen. Alle 6 Sprosse, die von Explantaten mit hohem Selektionsdruck (4 g/l → 5 g/l → 5g/l) abgenommen wurden, waren transgen. Allerdings konnte bei gleichem Selektionsdruck die Regeneration von 3 Sprossen der nicht transformierten Variante beobachtet werden. Obwohl mittels PCR-Methoden die Integration des *uidA* Gens bei allen transgenen Sprossen nachgewiesen wurde, konnte nur bei einem Spross der Variante „3 g/l → 4 g/l → 5 g/l“ die GUS-Aktivität nach dem Färbetest bestätigt werden (Tab. C14).

Tab. C14: Steigende Mannosekonzentration zur Selektion PMI-transgener Azaleen

Variante*	transformiert	regenerierte Sprosse	<i>manA</i>-Integration	<i>uidA</i>-Integration	GUS-Aktivität
3 → 4 → 4	nein	12	-	-	-
3 → 4 → 4	ja	5	2	2	0
3 → 4 → 5	nein	1	-	-	-
3 → 4 → 5	ja	32	13 von 15**	13	1
4 → 5 → 5	nein	3	-	-	-
4 → 5 → 5	ja	6	6	6	0
5 → 5 → 5	nein	-	-	-	-
5 → 5 → 5	ja	-	-	-	-

*Angabe der Mannosekonzentration in g/l, „→“ = 2 Wochen

**15 Sprosse getestet

D Diskussion

Die Topfazalee zählt in Deutschland zu den wirtschaftlich wichtigsten Zierpflanzenarten. Ihrer Bedeutung entsprechend werden regelmäßig neue Sorten gezüchtet und auf den Markt gebracht. Von Interesse sind hierbei verbesserte Wuchseigenschaften und Resistenzen, aber vor allem eine Erweiterung der Blütenfarbpalette. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das bestehende Sortiment hinsichtlich der Möglichkeit einer gezielten Veränderung der Blütenfarbe durch biotechnologische Modifikationen zu prüfen. Zunächst wurde die Flavonoidbiosynthese des Azaleensortiments untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Bildung der Blütenfarbe Weiß. Im zweiten Teil wurde am Lehrstuhl ein *in vitro*-Regenerationssystem und darauf aufbauend ein Transformationssystem für Azaleen etabliert. Durch die gewonnenen Erkenntnisse sollte die Grundlage für ein Eingreifen in den Flavonoidbiosyntheseweg mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers geschaffen werden.

D.1 Die Flavonoidbiosynthese der Azaleen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden inhaltsstoffliche Analysen der Azaleenblüten vorgenommen, um das für die Arbeit zur Verfügung stehende Sortiment auf das Vorkommen von Flavonoiden und Anthocyanen zu prüfen. Bereits in den 1960er und 70er Jahren wurden eingehende analytische Untersuchungen der Azaleenblüten veröffentlicht und damit die allgemeine Blütenfarbbildung bei Azaleen zum Teil aufgeklärt. Verantwortlich für die Blütenfarbe sind ausschließlich Flavonoide. Carotinoide kommen in Azaleenblüten nicht vor, auch Chlorophyll trägt aufgrund seines geringen Vorkommens nicht zur Blütenfarbe bei. De Loose (1969, 1970 und 1979) untersuchte ca. 100 Azaleensorten des damaligen *Rhododendron*-Simsii-Sortiments und weitere Azaleenarten, sowohl qualitativ wie quantitativ bezüglich ihres Flavonoidmusters. Verantwortlich für die hellrosa bis dunkelroten Farbtöne sind Anthocyane in entsprechend steigenden Konzentrationen. Zu den Hauptpigmenten zählen hierbei insbesondere Cyanidinderivate und in geringeren Konzentrationen Päonidinderivate. Aus wenigen violettblühenden Sorten konnte zudem ein 3,5-Diglukosid des Malvidins extrahiert werden. Weiter wurde in den untersuchten Sorten die Flavonole Quercetin und Azaleatin, ein Quercetin 5-Methylether (Wada, 1956), sowie in den violetten Blüten Myricetin in unterschiedlichen Konzentrationen

nachgewiesen. Flavonole tragen in hohen Konzentrationen zu einer „Verblauung“, z.B. von Rosa zu Pink oder von Ziegelrot zu Karminrot, der Anthocyan enthaltenen Sorten bei. So beruht die Farbausprägung der lachsfarbenen Azalee 'Red Wing' nicht auf der Bildung von Pelargonidinderivaten, sondern auf nur in geringen Mengen vorhandenen Flavonolen in Cyanidinderivaten enthaltenen Blüten (Asen et al., 1971). Auch die in dieser Arbeit untersuchten Azaleen des modernen Sortiments enthalten in hydrolysierten Extrakten insbesondere Cyanidin und in geringeren Konzentrationen Päonidin. Anders als bei De Loose (1969) wurde in hydrolysierten Extrakten der vom Azaleenmuseum bereitgestellten violettblühenden Sorten Delphinidin, aber nicht dessen Derivat Malvidin, nachgewiesen.

Nach saurer Hydrolyse konnten in allen weißen Azaleenblüten, wie schon zuvor bei Rhode (2003) und Helmich (2005), Cyanidin nachgewiesen werden. Cyanidinglykoside wurden dagegen in den Extrakten der weißen Blüten nicht beobachtet. Der Farbumschlag zu Rot von Blütenextrakten nach Aufkochen unter stark sauren Bedingungen ist ein klassisches Nachweisverfahren für Proanthocyanidine und wurde bereits für viele Pflanzenarten beschrieben (Zaprometov und Griesebach, 1973, Stafford et al., 1982; Sheridan und Mills, 1998), auch in der Azaleen verwandten *Calluna vulgaris* (Rhode, 2003). Das Vorkommen von Proanthocyanidinen in Azaleen ist damit wahrscheinlich.

Anthocyane liegen im Äquilibrium mit der farblosen Pseudobase vor. Eine Senkung des pH-Wertes führt zum roten Flavylium Kation mit Absorption bei 530 nm. Ein Nachweisverfahren hierfür ist die Extraktion der Blütenextrakte in einem sauren Lösungsmittel bei der im Anschluss ein Farbumschlag zu Rot zu beobachten ist, was auf die Abspaltung des Hydroxylanions zurückzuführen ist (Brouillard, 1983). Bei *am*-Mutanten von *Pisum sativum* konnte beispielsweise in den weißen Blütenpetalen mit einem Farbumschlag die Pseudobase für Malvidin 3-Rhamnosido-5-Glukosid nachgewiesen werden (Crowden, 1982). Eine Extraktion in sauren Lösungsmitteln von weißen Blütenblättern der Azaleen führte jedoch zu keinem Farbumschlag. Auch pH-Messungen des Zellsaftes ergaben keinen Unterschied des pH-Wertes zwischen weißen und roten Azaleen. Damit liegen keine Hinweise auf das Vorliegen der Pseudobase insbesondere bei der weißen Azalee vor.

Untersucht wurde auch das Vorkommen weiterer Flavonoide. Unabhängig davon, ob es sich bei der untersuchten Azalee um eine farbig- oder weißblühende Sorte handelte, wurden verschiedene Mengen an Quercetin mittels halbquantitativer

Methoden nachgewiesen. Auch De Loose (1969) wies in weißen *R. simsii*-Hybriden Flavonole ohne genaue Angabe deren Konzentration nach. Flavanone, Flavone und Dihydroflavonole konnten in dem untersuchten Sortiment nicht detektiert werden. Dagegen beschreibt De Loose (1979) aber die dünnschichtchromatographische Auftrennung verschiedener Flavanoglykoside. In allen untersuchten Sorten dieser Arbeit wurde das Flavan-3-ol Epicatechin und in einigen Sorten auch Catechin und Epigallocatechin nachgewiesen. Diese dünnschichtchromatographischen Ergebnisse konnten mittels HPLC Analysen bestätigt, sowie zusätzlich das Vorkommen verschiedener Proanthocyanidine in den Azaleenblüten nachgewiesen werden (Taubenböck, 2004).

D.1.1 Flavonoidenzyme der Azalee

In vielen verholzten Pflanzen ist die Enzymextraktion aufgrund hoher Polyphenolgehalte oftmals nur nach komplexen Methoden möglich (Loomis und Bataille, 1966; Anderson; 1968, Claudot und Drouet, 1992). Vermutlich insbesondere durch die Verwendung hoher Kalziumchloridkonzentrationen und der Zugabe von PEG gelang der Nachweis der Enzymaktivitäten der CHS, CHI, FHT, DFR, ANR und FGT aus Blütenmaterial von *Rhododendron simsii* nach der Extraktionsmethode von Dellus et al. (1997). Die Aktivität der F3'H konnte jedoch weder mit dieser Methode, noch nach Fällung der Mikrosomen nachgewiesen werden.

Die Chalkonsynthese aus Azaleen akzeptiert sowohl Cumaroyl-CoA als auch Kaffeoyl-CoA als Substrat, wobei bei gleichzeitigem Angebot beider Substrate ein deutlich höherer Umsatz von Cumaroyl-CoA zu Naringenin zu beobachten ist (Rathje, unveröffentlicht). Das pH-Optimum der CHS liegt ausgehend von Cumaroyl-CoA bei 7,5. Untersuchungen von De Cooman et al. (1993) an Enzymextrakten von *Rhododendron simsii* Blüten zeigten ebenfalls ein pH-Optimum bei der Reaktion von Cumaroyl-CoA zu Naringenin von 7,5, und bei der Reaktion von Kaffeoyl-CoA zu Eriodictyol von 6,5. Zudem wiesen De Cooman et al. (1993) eine 1,7fach höhere CHS-Aktivität mit Cumaroyl-CoA als Substrat gegenüber Kaffeoyl-CoA nach, wobei bei gleichzeitigem Angebot beider Substrate, sogar eine 10fach höhere Cumaroyl-CoA-Bildung beobachtet wurde. Ähnliche Resultate wurden bei der CHS von *Dianthus caryophyllus* (Spribille und Forkmann, 1982), *Sinningia cardinalis* (Stich und Forkmann, 1987), *Osteospermum eclonis* (Seitz, 2000), sowie der nah mit der Azalee verwandten *Erica carnea* (Rhode, 2003) erzielt. Dagegen wurde ein etwa gleich hoher Umsatz zu Naringenin und zu Eriodictyol in Blättern von Kartoffeln bei

pH 7,0 beobachtet (Knott, 2004). Proteinextrakte aus Rosenblüten zeigten bei niedrigen pH-Werten sogar eine Substratpräferenz für Kaffeoil-CoA (Elsherif, 2000). Es gibt allerdings nur wenige Fälle in denen *in vivo* eine CHS-Reaktion ausgehend von Kaffeoil-CoA zu Eriodictyol an der Synthese von Anthocyanen beteiligt sein könnte, so z.B. bei *Verbena hybrida* (Stotz et al., 1984) und *Silene dioica* (Kamsteeg et al., 1980). Bei *Rhododendron simsii* kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Hydroxylierung des B-Rings erst später auf Flavonoidebene stattfindet.

Eine F3'H-Aktivität in Blütenextrakten der Azalee wurde in dieser Arbeit zwar nicht direkt nachgewiesen, doch konnte nach Behandlung der farbigblühenden Azaleensorte 'Friedhelm Scherrer' mit dem für die F3'H bzw. F3'5'H Hemmstoffes Tetcyclacis eine deutliche Verringerung der Anthocyansynthese beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass in Azaleen die B-Ring-Hydroxylierung mit Beteiligung der F3'H bzw. F3'5'H erfolgt. De Cooman et al. (1993) gelang der indirekte Nachweis der F3'H-Aktivität durch „Fütterung“ von Azaleenpetalen früher Blütenstadien (vergleichbar mit Blütenstadien 1, 2 und 3 dieser Arbeit) mit [¹⁴C]-markierten Substraten. Sowohl nach Zugabe von [¹⁴C]-Naringenin, als auch [¹⁴C]-Dihydrokämpferol wurden in den Blütenblättern radioaktiv markierte 3'4'-hydroxylierte Anthocyane und Flavonole extrahiert, deren Bildung nur durch eine aktive F3'H erklärt werden kann. Zudem wurde beobachtet, dass die Bildung von Anthocyanen ausgehend von Naringenin als Substrat deutlich geringer gegenüber Dihydrokämpferol als Substrat war. Ein umgekehrtes Verhältnis wurde bei der Bildung der Kopigmente (Quercitrin und Azalein) beschrieben: eine 2fach bzw. 2,5fach höhere Menge konnte nach Zugabe von Naringenin im Vergleich zu der Verwendung von Dihydrokämpferol als Substrat extrahiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse folgerten De Cooman et al. (1993), dass evtl. *in vivo* die Bildung der 3'4'-hydroxylierten Flavonole in Azaleen über den Syntheseweg „Naringenin → Eriodictyol → Dihydroquercetin“ verläuft, während die Bildung der 3'4'-hydroxylierten Anthocyane über den Weg „Naringenin → Dihydrokämpferol → Dihydroquercetin“ erfolgt. Ausgehend von der Annahme, dass Kopigmente größtenteils in frühen und Anthocyane in späten Blütenstadien gebildet werden, könnte entsprechend die Substitution am B-Ring in Azaleen in frühen Stadien auf Flavanon- und in späten Stadien auf Dihydroflavonolebene stattfinden.

FHT-Aktivität konnte in dieser Arbeit sowohl mit Naringenin als auch mit Eriodictyol als Substrat gemessen werden, so dass die oben vermuteten Synthesewege zu den

Flavonolen und Anthocyanen auch hinsichtlich einer Substratazeptanz der FHT für Naringenin bzw. Eriodicyol möglich sind. Das pH-Optimum wurde bei pH 6,5 erreicht, und wich damit von dem von De Cooman et al. (1993) beschriebenen pH-Optimum von 7,0 ab. Auch in *Erica carnea* konnte für die FHT ein pH-Optimum von 6,5 festgestellt werden (Rhode, 2003).

Die DFR aus Azaleenblüten zeigte eine Substratspezifität für Dihydroquercetin und setzt Dihydrokämpferol nicht um, wodurch auch das Fehlen von Pelargonidinderivaten bedingt ist. Auch in weiteren Pflanzenarten der Familie *Ericaceae* ist die Abwesenheit von Pelargonidinderivaten zu beobachten, so z.B. in *Erica carnea* (Crowden und Jarman, 1974), *Calluna vulgaris* (Allais et al., 1995) oder *Vaccinium macrocarpon* (Hong und Wrolstad, 1990). Insbesondere auch bei *Solanaceae*-Arten, wie z.B. Petunien, tritt aufgrund einer DHK ausschließenden DFR-Substratspezifität das Fehlen der Pelargonidinderivaten auf (Forkmann und Heller, 1999; Martens et al., 2002).

Weiter konnte in den pflanzlichen Enzymextrakten die Glykosylierungsreaktion von Cyanidin zu Cyanidin-3-Glukosid und die ANR-Aktivität nachgewiesen werden. Letztere wurde von Helmich (2005) eingehend charakterisiert. Hierbei zeigte die Azaleen-DFR, wie die ANR aus *Camelia sinensis* und *Malus x domestica* (Duy, 2004), sowie aus *Arabidosis thaliana* und *Medicago truncatula* (Xie et al., 2004), ein niedriges pH-Optimum von pH 5,5 und ein Temperaturoptimum von 45°C auf. Zudem konnte eine Substratspezifität der Azaleen-ANR für Cyanidin, Delphinidin und Petunidin beobachtet werden. Pelargonidin, Päonidin und Malvidin werden nicht von der Azaleen-ANR umgesetzt.

Interessanterweise konnten in den Extrakten der weißen Azaleenblüte qualitativ die gleichen Enzymaktivitäten wie in der farbigen Blüte beobachtet werden. Insbesondere der Nachweis von Epicatechin und der ANR-Aktivität, sowie die *in vitro* Reaktion von Cyanidin zu Cyanidin 3-O-Glukosid in weißen Azaleenblüten bei gleichzeitigem Fehlen von Cyanidinglykosiden werfen Fragen über die Biosynthese in weißen Blüten auf.

D.1.2 Bildung der Blütenfarbe Weiß bei Azaleen

Weißblühende Azaleensorten wurde in dieser Arbeit insbesondere enzymologisch aber auch molekularbiologisch untersucht. Die Entstehung der phänotypischen Ausprägung der Blütenfarbe Weiß konnte hierbei nicht aufgeklärt werden. Im

folgendem sollen verschiedene Möglichkeiten für das Zustandekommen der weißen Petalenfarbe mit den vorliegenden Ergebnissen diskutiert werden.

D.1.2.1 Fehlende Aktivität von Enzymen der Flavonoidbiosynthese

Die Abwesenheit von Anthocyanen in weißen Blüten wird in vielen Pflanzenarten durch fehlende Enzymaktivität in einem oder mehreren Schritten der Anthocyanbiosynthese bedingt. Abhängig davon, ob die Mutationen in frühen oder späten Schritten der Flavonoidbiosynthese liegen, können in den Blüten farblose Copigmente wie Flavone und Flavonole vorliegen, die häufig auch zu einem creme- oder elfenbeinfarbenen Erscheinungsbild beitragen. In cremefarbenen Blüten von *Antirrhinum majus* (Martin et al., 1991), *Ipomoea nil* (Saito et al., 1994; Hoshino et al., 1997), *Dianthus caryophyllus* (Stich et al., 1992a) und *Eustoma grandiflorum* (Davies et al., 1993) liegen z.B. Mutationen in den Genen für die DFR oder ANS vor, so dass die Anthocyanbiosynthese hier erst in einem späten Schritt blockiert ist. Rein weiße Blüten entstehen beispielsweise durch das Fehlen der CHS-Aktivität wie bei der *niv*-Mutation in *Antirrhinum majus* (Spribille und Forkmann, 1982) oder *f*-Mutation in *Matthiola incana* (Spribille und Forkmann, 1981; Rall und Hemleben, 1984; Hemleben et al., 2004). In *Rhododendron simsii* dagegen schließt das Vorkommen von Flavonolen eine Blockierung in einem frühen Schritt der Biosynthese aus. Außerdem konnte die Aktivität der CHS, CHI und FHT in den weißen Blütenpetalen nachgewiesen werden. Da die Enzymextrakte weißer Blüten ebenfalls eine DFR-Aktivität aufweisen, müsste die Blockierung der Anthocyanbiosynthese in einem späteren Schritt stattfinden. Der Nachweis der ANS-Aktivität aus Blütenextrakten ist aufgrund der hohen Instabilität des Substrates, wie des Produktes, *in vitro* nicht möglich, dafür gelang jedoch der enzymatische ANS-Nachweis des heterolog exprimierten ANS-cDNA-Klons aus der weißblühenden Azaleensorte 'Mevrouw Edmond Troch'. Dies war erwartungsgemäß, da der Sequenzvergleich der cDNA-Klone auf Aminosäureebene keinen Unterschied zwischen der weißen und der farbigen Referenzsorte aufwies. Die cDNA-Klone der farbigen 'Nordlicht' und der weißblühenden 'Mevrouw Edmond Troch' besitzen zudem einen offenen Leserahmen und zeigen keine Abweichungen in den für Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen konservierten Regionen. Eine Blockierung der Anthocyanbiosynthese auf Ebene der ANS ist bei Azaleen somit nicht die Ursache für die weiße Blütenfarbe. Der letzte Schritt in der Anthocyanbiosynthese ist die Glykosylierung der Anthocyanidine durch die FGT. Da auch die Bildung von Cyanidin-3-Glukosid mit Enzymextrakten

aus weißen Azaleenpetalen zu beobachten war, ist dieser Schritt zumindest *in vitro* möglich.

Ein wichtiger Beitrag für die stabile Ausprägung der Blütenpigmentation ist der Transport der Anthocyane vom Cytosol in die Vakuole durch Glutathion S-Transferasen (GST). In Mais führt die Mutation für das *Bz2* Gen, welches die GST codiert, zu einer Akkumulation des Cyanidin 3-Glukosids im Cytosol. Diese Anreicherung gibt der Aleuronschicht der Körner und den Blättern eine bronzene Farbe (Marrs et al., 1995). Die transiente Genexpression des *Bz2* Gens und des ebenfalls für die GST codierende Gens *An9* aus Petunie (Alfenito et al., 1998) mittels Genkanone führte bei der Anthocyanmutante *fl3* von Dianthus zur Bildung von Anthocyanspots im exprimierenden Bereich (Larsen et al., 2003). Die Möglichkeit einer für Anthocyane defekten GST bei weißen Azaleenpetalen ist jedoch kritisch zu beurteilen, da in diesem Fall eine Anreicherung des Cyanidin 3-Glukosids im Cytosol erfolgen würde, das vermutlich nach Extraktion mit chromatographischen Mitteln nachweisbar wäre und, wie bei der *fl3* Mutante von Dianthus, zu einer schwachen rosa Blütenfarbe führen könnte.

D.1.2.2 Einfluss von Regulatorgenen auf die Flavonoidbiosynthese

Mato et al. (2000) konnte in weißen Blüten von *Dianthus caryophyllus* die Expression der Flavonoidgene *chs*, *fht*, *dfr* und *ans* nachweisen, doch zeigten alle vier Gene in späten Blütenstadien eine reduzierte Expression. Im Falle dieses Blütenports scheint nicht eine absolute Blockierung der Flavonoidbiosynthese vorzuliegen, sondern vielmehr ein quantitativ regulatives System, das zum Verlust der Anthocyanpigmentation führt. Da in frühen Blütenstadien dieser Mutante Flavonole gebildet werden, gibt es bei *Dianthus* zwei Phasen der Flavonoidbiosynthese: eine Phase während der frühen Blütenentwicklung, in der die Kopigmente synthetisiert werden und eine späte Phase in der durch Induktion von DFR und ANS Anthocyane gebildet werden (Stich et al., 1992b). Demnach ist zu vermuten, dass in der weißen Nelkenmutante ein Defekt des regulativen Systems, welches in späteren Blütenstadien die *chs*, *fht*, *dfr* und *ans* aktiviert, vorliegt. Die Möglichkeit verschiedener Phasen in der Flavonoidbiosynthese bei Azaleen wurde bereits unter D.1.1 diskutiert. Weiteres Beispiel für die Regulation der Flavonoid- und Anthocyanbildung sind die in den Loci *An1*, *An2* und *An11* mutierten Petunien. Die Expression der *pal*, *chs*, *chi*, *fht*, *dfr* und *fgt* ist bei diesen Mutanten verglichen mit dem anthocyanbildenden Wildtyp deutlich reduziert (Quattrocchio et al., 1993; Huits

et al., 1994). Die Gene *del*, *eluta* und *rosea* regulieren hauptsächlich in *Antirrhinum majus* die Strukturgene *fht*, *dfr*, *ans* und *fgt* (Almeida et al., 1989, Martin et al., 1991; Jackson et al., 1992). Bei weißen Enzianblüten (*Gentiana triflora*) konnte neben einer ANS-Mutante eine Sorte mit ebenfalls reduzierter Expression von Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese beschrieben werden. Letztere Sorte akkumuliert nach Stressinduktion Anthocyan, was gleichzeitig mit einer höheren Expression der Gene *chs*, *fht*, *f3'h* und *ans* einher geht (Nakatsuka et al., 2005).

Bei der Azalee wurde jedoch keine allgemeine *down regulation* der Enzymaktivitäten von CHS, CHI, FHT und DFR bei weißblühenden Sorten beobachtet. Zwar war die Enzymaktivität der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' im Vergleich zur farbigen Referenzsorte in der Regel schwächer, doch konnte dies nicht generell bei den drei weiteren weißblühenden Sorten bestätigt werden. Im Gegenteil dazu wies die Sorte 'Schneekönigin' durchschnittlich die höchsten enzymatischen Umsätze auf. Auch eine geringe oder fehlende Enzymaktivität in späten Blütenstadien der Azalee, die auf eine fehlende Regulierung der Anthocyanbiosynthese hindeuten könnten, wie von Mato et al. (2000) für *Dianthus* beschrieben, konnte mittels Enzymtest hier nicht beobachtet werden. Da der enzymatische ANS-Nachweis aus Blütenextrakten nicht möglich war, konnte nur die Expression halbquantitativ mittels RT-PCR gemessen werden. Auch bei diesen Untersuchungen wurden keine Hinweise auf eine *down regulation* der ANS-Expression gefunden. Allerdings können beim Vergleich der Expressionsstudien für *chs*, *chi*, *fht* und *dfr* mit den Enzymtests für die einzelnen Sorten und Blütenstadien nicht die Stärke der Banden mit der Stärke der Enzymaktivität gleichgesetzt werden. Dies mag zum einem an der Schwäche der gewählten halbquantitativen Expressionsstudie mittels RT-PCR gegenüber *Northernblot* oder *RealTime* PCR Analysen liegen, zum anderen ist nicht unbedingt die Stärke der Genexpression mit der tatsächlichen Enzymaktivität gleichzusetzen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die ANS in weißen Blüten exprimiert wird und dies zu Beginn des Knospenstadiums bis hin zur vollen Blüte.

D.1.2.3 Konkurrenz zwischen Enzymen der Flavonoidbiosynthese

Eine weitere Möglichkeit der Bildung der weißen Blütenfarbe, trotz der Expression aller für die Anthocyanbiosynthese beteiligten Gene, sind Konkurrenzsituationen z.B. zwischen der FLS und der DFR um das gemeinsam genutzte Substrat Dihydroquercetin oder auch zwischen der ANR und FGT um das Substrat Cyanidin. Gegen die erste Möglichkeit spricht, dass in weißen Blütenpetalen der Azaleen nicht

auffällig höhere Flavonolgehalte gegenüber farbigen Blüten beobachtet wurden. Auch weisen die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der Enzymaktivität nicht auf eine „schwache“ DFR in weißen Blüten hin. Dennoch wäre es interessant die Expression der *fls* durch Transformation beispielsweise mit einem RNAi-Konstrukt zu unterdrücken oder die Bildung von Leukocyanidin durch die Einführung einer „starken“ DFR mit einem konstitutiv exprimierenden Promoter (z.B. CaMV 35S Promoter) zu verstärken. Bei ähnlichen Versuchen konnten nach Transformationsexperimenten mit derartigen Konstrukten in der weißen, Flavonol akkumulierenden Petunienlinie 'Mitchel' die Anthocyanbildung erreicht werden (Davies et al., 2003). Auch in *Nicotiana tabacum* wurde die Bildung von Anthocyanen durch Transformation mit einem FLS-Antisensekonstrukt verstärkt (Holton et al., 1993b). Durch Einführung einer ANR wurde in transgenen Tabakpflanzen eine reduzierte Anthocyan synthese mit gleichzeitiger Bildung von Epicatechin beobachtet (Bogs et al., 2005). Eine Konkurrenzsituation mit einer „starken“ ANR, die Cyanidin zugunsten der Epicatechin- und im weiteren der Proanthocyanidinbildung vollständig umsetzt, und somit für die FGT kein Substrat für die Bildung von Anthocyan zur Verfügung steht, wäre auch in weißen Azaleenblüten denkbar. Allerdings zeigte die ANR der weißen Azaleenpetalen bei den quantitativen Untersuchungen keinen generell höheren Umsatz gegenüber den farbigen Varianten auf. Um genauere Informationen über eine eventuelle Konkurrenz zwischen ANR und FGT in Azaleenblüten zu erhalten wären enzymatische Konkurrenztest von Interesse. Da die optimalen Reaktionsbedingungen der ANR mit pH 5,5 und einem Temperaturoptimum von 45°C außerhalb der für Flavonoidenzyme wie der FGT üblichen Bedingungen liegen, würde sich die Gestaltung der Standardbedingungen für einen solchen Konkurrenztest vermutlich schwierig erweisen. Auch in diesem Fall könnte evtl. das Ausschalten der ANR beispielsweise mittels Transformation eines RNAi-Konstruktes Aufschluss über die Flavonoidbiosynthese bei weißen Azaleen geben.

D.1.2.4 Blütenmutationen bei Azaleen

Das Auftreten von Blütenmutationen bei Azaleen ist mit einer Häufigkeit von 10^{-6} bemerkenswert hoch (Mertens, 2001, und darin enthaltene Referenzen). Hierbei treten sowohl gefleckte wie auch sternförmig gemusterte Blüten, also rote Petalen mit weißem Rand oder umgekehrt, auf. Die Anthocyanpigmentierung scheint bei einfarbigen Blüten auf die Epidermis beschränkt zu sein (Plaschil, 1997;

De Schepper, 2001). Auch bei der einfarbigen Sorte 'Nordlicht' wurde die Anthocyanverteilung lediglich in den Epidermiszellen beobachtet. In Azaleen findet folglich die Anthocyanbiosynthese in separierten Gewebebereichen statt. Denkbar wäre daher auch eine Kompartimentierung der Flavonoidbiosynthese in weißen Blütenpetalen. In diesem theoretischen Modell könnte beispielsweise in einzelnen Gewebebereichen die Flavonoidbiosynthese bis zum Cyanidin erfolgen, das schließlich von der ANR zu Epicatechin gebildet wird. Da in diesen Bereichen keine Anthocyanpigmentation auftritt, würde keine Glykosylierung des Cyanidins aufgrund fehlender FGT-Aktivität stattfinden. In weiteren Kompartimenten der gleichen Blütenpetalen könnte eine FGT-Reaktion zwar möglich sein, weshalb diese Reaktion enzymologisch nachgewiesen wurde, aber der Flavonoidbiosyntheseweg zum Cyanidin wäre blockiert, so dass auch hier keine Anthocyanbiosynthese stattfinden könnte. Da für die enzymologischen und molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit komplette Blütenpetalen verwendet wurden, könnte dieses Modell eine Erklärung für den Nachweis fast aller an der Anthocyanbildung beteiligten Enzyme bieten. Fraglich ist aber auch, ob es bei derartigen Kompartimentierungen an den Grenzen der zwei biosynthetisch unterschiedlichen Gewebebereichen nicht zu Partnerinduktionen kommen könnte, wie von Plaschil (1997) bei Azaleenblüten mit Sternmuster (roter Petaleninnenbereich mit weißem Rand) beobachtet wurde. Als Partnerinduktionen werden hierbei interzelluläre Genwirkungen verstanden, die auftreten können, wenn genetisch unterschiedliche Gewebe in direktem Kontakt stehen. Hierbei kann es bei der Merkmalsausbildung zu Hemmwirkungen des genetisch defekten Partners bzw. zu Kompensationswirkungen des genetisch intakten Partners gegenüber dem anderen Partner kommen (Plaschil, 1997, und darin enthaltene Referenzen). Im Fall einer Partnerinduktion zweier genetisch verschiedener weißer Bereiche, wie oben beschrieben, könnte also Anthocyanbiosynthese im Grenzbereich stattfinden. Möglich wäre in diesem Fall eine phänotypische Ausprägung wie bei der schwach rosa blühenden Azaleensorten 'Paloma' oder 'Rosa'. Um eventuell Flavan-3-ol enthaltende und freie Gewebebereiche in weißen Blüten identifizieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit DMAZA-Färbetests an Azaleenpetalen vorgenommen. Das Reagenz färbte bei den Sorten 'Nordlicht', 'Mevrouw Gerard Kint' und 'Mevrouw Edmond Troch' sowohl die Epidermis als auch die darunter liegenden Mesophyllzellen. Hinsichtlich der Epicatechinbildung konnten mit dieser Methode

keine biosynthetisch verschiedenen Gewebebereiche identifiziert werden. Da DMAZA sowohl mit 2,3-*cis*-Flavan-3-ole als auch 2,3-*trans*-Flavan-3-ole reagiert, hätten allerdings Bereiche, bei denen theoretisch eine fehlende ANS-Aktivität vorliegt, nicht identifiziert werden können.

Blütenmutanten können jede bei der Azalee mögliche Blütenfarbe annehmen. Bei Kreuzungen verhalten sich diese Sports phänotypisch wie die Sorte von der sie abstammen, was bedeutet, dass ihr generatives Gewebe genetisch identisch mit dem der Ausgangssorte ist und eine gametische Mutation damit ausgeschlossen ist (Horn, 1968, 1973). Anders verhält es sich bei komplett weißen Sports. Hier ist die Vererbung häufig stabil, so dass die Mutation auch die LII-Schicht einschließt (De Schepper, 2001). Genetisch verschiedene LI- und LII-Schichten wären damit bei den meisten weißen Blütenmutanten nicht möglich.

De Schepper (2001) untersuchte die Sportinduktion verschiedener Azaleensorten auf molekularer Ebene. Die Mechanismen, denen die Sport-Phänotypen hierbei unterliegen, sind sowohl auf genetischer Ebene, z.B. durch Transposition, Polyploidie und Chimärenbildung, als auch auf epigenetischer Ebene, z.B. durch DNA-Methylierung, bedingt. Interessant ist das Auftreten tetraploider weißer Blütenränder um ein diploides gefärbtes Petalenbinnenfeld. Der Ploidiegrad kann hierbei eine Schlüsselrolle in der epigenetischen Regulation der Genexpression einnehmen (Mittelsten-Scheid et al., 1996; Matzke et al., 1999; Wolffe und Matzke, 1999). So genannte *transcript turnover* bei denen ab einer bestimmten Schwellenkonzentration RNA-Moleküle degradiert werden, wurden für viele Loci beschrieben (De Carvalho et al., 1992, Flavel et al., 1994; Van Blokland et al., 1994; Jorgensen et al., 1996,) und könnten eine Erklärung für die weißen tetraploiden Blütenränder liefern. Das *chs*-Gen scheint besonders sensitiv für diese Form der epigenetischen Genregulation zu sein, vermutlich da es in vielen Pflanzenarten in mehreren Kopien auftritt (Depicker und Van Montagau, 1997). Auch bei *Rhododendron simsii* konnten in *Southern* Analysen vier *chs*-Kopien identifiziert werden (De Schepper, 2001). De Schepper et al. (2001) beobachteten das spontane Auftreten einer komplett weißen Blütenmutante an der Sorte 'Gerda Keessen nr.2', welche rote Blüten mit weißem Rand besitzt. Wie der Rand der gemusterten Ausgangspflanze war der Blütensport tetraploid. Da der Großteil des Azaleensortimentes diploid ist (Schepper, 2001), kann Polyploidie aber nur für einen Teil des weißblühenden Azaleensortiments eine Erklärung liefern. Zudem beschrieben De Schepper et al. (2001) ebenfalls eine komplett weißblühende

diploide Mutante der Sorte 'Queen Fabiola', deren Blüten üblicherweise einen diploiden weißen Binnenbereich mit einem tetraploiden roten Rand besitzen. Erklärung für dieses Farbmuster könnte eine *down regulation* der Flavonoidbiosynthese im weißen diploiden Blütenteil mit einer wiederum verstärkten Genexpression im tetraploiden Gewebebereich bieten. In diesem Fall ist die weiße Blütenfarbe vermutlich durch schwache Genexpression bzw. schwache Enzymaktivität für einen oder mehrere Gene der Flavonoidbiosynthese bedingt.

Vermutlich ist das phänotypische Erscheinungsbild der weißen Blüte nicht für alle Azaleensorten in einer Ursache zu suchen. Da aber in allen weißen Sorten, einschließlich im reichhaltigen Sortiment des Azaleenmuseums in Bremen, Epicatechin bzw. Epigallocatechin nachgewiesen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass kein absoluter Block in der Flavonoidbiosynthese, zumindest vor der Synthese des Cyanidins bei Azaleen, vorliegt. Ausgehend von der Hypothese, dass die Flavonoidenzyme in Metabolons, also Multienzymkomplexen, angeordnet sind, ist anzunehmen, dass in weißblühenden Azaleen die Biosynthese über ein Metabolon direkt in die Proanthocyanidinbildung mündet und somit die Anthocyaninsynthese nicht vorgesehen ist. Ein weiterer Multienzymkomplex in farbigblühenden Azaleen führt zu den Anthocyanen. Interessant ist hierzu auch die Beobachtung der halbquantitativen Expressionsanalysen, bei denen für alle Sorten eine hohe Expression der DFR im Blütenstadium 1, also einem Stadium in der noch keine Anthocyane gebildet werden, beobachtet wurde. Da die DFR zu diesem Zeitpunkt nicht für die Anthocyaninsynthese „benötigt“ wird, steht die starke Expression eventuell mit der Bildung von Proanthocyanidinen im Zusammenhang.

Bei einigen weißen Sorten mag ein allgemeines regulatorisches System, das zu einer geringen Expression der Flavonoidgene führt, für die weiße Blütenfarbe verantwortlich sein. Auch bei Sorten mit einem leicht rosafarbenen Ton wie 'Paloma' könnte evtl. eine *down regulation* der Genexpression, die die Anthocyaninsynthese nicht vollständig unterbindet, ursächlich sein. Eine schwache allgemeine Flavonoidgenexpression in Kombination mit einer Konkurrenzsituation, beispielsweise um das Substrat Cyanidin (ANR vs. FGT), ist im Einzelfall möglich. So vielfältig wie die Formen und Musterungen der Sports bei Azaleen auftreten, so vielfältig und unterschiedlich mag auch die Ursache für die weiße Blütenfarbe sein. Zur Untersuchung des Einflusses der Polyploidie auf die epigenetische Genregulierung wäre es interessant an den von De Schepper et al. (2001)

beschriebenen weißen tetraploiden Blütensorten enzymologische Tests durchzuführen.

D.1.3 Möglichkeiten des Eingreifens in die Flavonoidbiosynthese bei Azaleen

Das Blütenfarbspektrum von *Rhododendron simsii* umfasst laut Beschreibende Sortenliste des Bundessortenamtes Weiß, Lachsrosa, Rosa, Rotrosa, Rot, Blaurosa und Purpur. Gelbe und blaue Blütenfarben fehlen in dem Sortiment. Zwar gibt es Lachsrosa blühende Sorten, diese Farbe ist aber aufgrund der fehlenden Substratazeptanz der Azaleen-DFR für Dihydrokämpferol nicht auf Pelargonidinderivate zurückzuführen, sondern auf einen geringen Flavonolgehalt in Cyanidinderivaten enthaltenden Blüten. Die Einführung einer DFR aus Mais in einer Dihydrokämpferol akkumulierenden Petunienlinie ist ein bekanntes Beispiel für die Pelargonidinsynthese mittels Methoden des *molecular engineering* (Meyer et al., 1987). Die alleinige Transformation mit einer Dihydrokämpferol akzeptierenden DFR führt allerdings bei Cyanidin- und/oder Delphinidinderivaten bildenden Blüten häufig nicht zu einer Pelargonidinsynthese. So konnte in Cyanidinderivaten akkumulierenden Petunien (Tsuda et al., 2004) und in Delphinidinderivaten bildenden *Osteospermum* Blüten (Seitz et al., 2007) erst durch Suppression der F3'H bzw. F3'5'H bei gleichzeitiger Expression einer Dihydrokämpferol umsetzenden DFR die Pelargonidinsynthese erreicht werden. Auch bei Azaleen wäre eine ähnliche Strategie für die Schaffung auf Pelargonidin basierenden orangeroter Blüten denkbar.

Die meisten blauen Blüten enthalten aromatisch acylierte Delphinidinderivate. In Tabak und Petunie (Holton et al., 1993a; Shimada et al., 1999) konnte z.B. die Delphinidinsynthese durch Einführung einer F3'5'H erreicht werden. Auch bei den transgenen Nelkensorten 'Moondust'TM und 'Moonshadow'TM der Firmen Florigene Ltd. und Suntory Ltd. wurde eine violette Blütenfärbung durch Transformation mit F3'5'H und DFR jeweils aus *Petunia* erzielt (siehe Forkmann und Martens, 2001). Rein blaue Nelken oder Rosen konnten aufgrund vakuolärer pH-Bedingungen und gleichzeitiger Bildung von Pelargonidin- und/oder Cyanidinderivaten nicht geschaffen werden (Mol et al., 1998). Auch einige Azaleensorten synthetisieren Delphinidin, welches den Blüten eine purpurne, aber nicht blaue Farbe verleiht. Kopigmentation mit Flavonen und Flavonolen können zu einer Verschiebung der Absorption zu Blau führen. So beobachtete Aida et al. (1999), dass die Blüten von mit Antisense *dfr*-Gen transformierten Torenen „blauer“ als die mit Antisense *chs*-Gen transformierten

Vergleichspflanzen waren, da die nicht komplette *down regulation* der DFR zu einer Akkumulation von Flavonen führte. Die Verstärkung der Kopigmentation könnte bei einigen Pflanzen, so auch bei Azaleen, eine Strategie zur „Verblauung“ der Blütenfarbe sein, wobei zu bedenken ist, dass in der Regel die Kopigmentmenge, aufgrund der Verwendung gemeinsamer Vorstufen, negativ mit der Anthocyanmenge korreliert (Holton et al., 1993a,b). Eine Verstärkung der Kopigmentierung könnte also zu einer Verminderung der Anthocyan synthese führen.

Von größerem Interesse bei Azaleen ist jedoch sicherlich die Schaffung gelber Blüten. In vielen Pflanzenarten tragen Chalkone und Aurone zur gelben Blütenfarbe bei. Das gemeinsam genutzte 2'4'6'4-Tetrahydroxychalkon (THC) ist gelb, wird aber *in vivo* durch die CHI isomerisiert. Gelbe Dianthus-Blüten akkumulieren THC als 2'-O-Glukosid (Isosalipurposid) aufgrund eines Defektes der CHI-Aktivität. Auch die hellgelbe Blütenfarbe von Cyclamen ist auf die Bildung von Isosalipurposid durch fehlende CHI-Aktivität bei gleichzeitiger Anwesenheit einer 2'-O-Glukosyltransferase (C2'GT) zurückzuführen. cDNA-Klone für die C2'GT wurden in den letzten Jahren aus *Dianthus* isoliert (Ogata et al., 2004; Yoshida et al., 2004) und könnten in Azaleen transformiert werden. Evtl. wäre zusätzlich eine Suppression der CHI notwendig. Denkbar ist auch eine bereits vorhandene C2'GT in Azaleen, der aber aufgrund einer aktiven CHI kein THC als Substrat zur Verfügung steht. In diesem Fall könnte bereits die Inaktivierung der CHI, z.B. durch Transformation mit einem RNAi-Konstrukt, zur Isosalipurposidbildung führen.

Aurone sind hellgelbe Flavonoide, die z.B. in *Antirrhinum* und *Dahlia* vorkommen. Ihre Biosynthese war lange Zeit ungeklärt. Erst durch die Identifizierung der Aureusidinsynthase (AS) und Klonierung der entsprechenden cDNA aus *Antirrhinum majus* (Nakayama et al., 2000; Sato et al., 2001; Nakayama, 2002) stehen die Möglichkeiten zur Auronbildung mittels *molecular engineering* in weiteren Zierpflanzenarten zur Verfügung. Ausgehend von THC oder PHC zyklisiert (2', α -Dehydrogenation) die sauerstoffabhängige AS das Chalkon zu den Auronen Aureusidin bzw. Bracteatin. Allerdings konnten Ono et al. (2006) eine Auronbildung in Torenen durch alleinige Transformation einer AS nicht erreichen. Erst durch Koexpression der AS mit einer 4'-O-Glukosyltransferase (4'CGT) wurde das Auron in den Vakuolen akkumuliert. Zunächst wird hierbei das THC durch die 4'CGT im Cytosol glukosyliert. Das dabei gebildete THC 4-O-Glukosid wird in die Vakuole transportiert und durch die AS zum Aureusidin 6-O-Glukosids konvertiert (die 4-

Position des Chalkons entspricht hierbei der 6-Position des Aurons). Die Ausbildung der gelben Blütenfarbe wurde jedoch bei der ursprünglich malvidinbildenden Toreniablüte erst durch zusätzliche Hemmung der Anthocyansynthese mittels RNA Interferenz für *fht* bzw. *dfr* erreicht. Eine ähnliche Strategie könnte, ausgehend von weißen Blüten, eventuell auch ohne RNAi-Konstrukt zum Ausschalten der CHI, bei Azaleen zur gelben Blütenfarbe führen.

In einigen Asteraceaeen-Arten, wie *Cosmos* oder *Dahlia*, bilden 6'-Deoxychalkone die Hauptpigmente (Davies et al., 1998). Die Polyketidreduktase (PKR, früher auch Chalkonreduktase) deoxyliert in Ko-Aktion mit der Chalkonsynthase die 6'-Position des Tetrahydroxychalkons, was zu einer Stabilisierung des Chalkons und zur gelben Blütenfarbe führt. Die CHI aus Pflanzen, die natürlicherweise keine 6'-Deoxychalkone besitzen, akzeptiert diese nicht als Substrat. Durch Transformation einer weißen Petunienlinie mit einer PKR aus *Medicago sativa* wurde die Synthese der Chalkone Butein 3-O-Glukosid und Butein 4-O-Glukosid erreicht, wobei die Petunienblüten aber nur eine schwache Gelbfärbung aufwiesen. Trotzdem wäre die Einführung einer PKR auch in Azaleen vorstellbar.

Bei allen diskutierten Strategien zur Schaffung einer gelben Blütenfarbe, stellt das 2'4'6'4-Tetrahydroxychalkon das Ausgangssubstrat dar. Für diesen Zweck wäre daher eine Azaleensorte mit einer starken CHS-Aktivität, zur Bereitstellung des THC, bei gleichzeitig schwacher CHI-Aktivität, zur Unterbindung des THC-Abflusses in Richtung Naringenin, als Ausgangsorte interessant. Eine auffällig hohe CHS-Aktivität konnte in dieser Arbeit bei der Sorte 'Schneekönigin' gemessen werden, allerdings ist die CHI-Aktivität in allen untersuchten Sorten in etwa gleich hoch zu bewerten. Frühere Versuche die CHI-Aktivität durch Antisense- oder Sense-Suppression in Petunien und Lisianthus zu hemmen scheiterten vermutlich aufgrund der spontanen Reaktion von Chalkon zu Flavanon (Davies et al., 1998, und darin enthaltene Referenzen). Mit Hilfe der RNA Interferenz gelang zunächst erstmalig in Tabak eine effektive Suppression der CHI, wobei auch hier die Bildung geringer Flavonolmengen, entweder aufgrund nicht vollständiger Hemmung oder aufgrund spontaner Isomerisierung, zu beobachten war (Nishihara et al., 2005). Für die Verfolgung einer Strategie Richtung gelber Blütenfarbe bei Azaleen ist vermutlich die Hemmung der CHI-Aktivität durch RNAi-Technik unerlässlich, auch wenn eventuell mit einer nicht vollständigen Suppression gerechnet werden muss.

D.2 Transformation von Azaleen

Für nachfolgende Transformationsexperimente mussten zunächst Azaleen in die Gewebekultur überführt und ein effektives *in vitro*-Regenerationssystem am Lehrstuhl etabliert werden. Hierbei taten sich zu Beginn dieser Arbeit Schwierigkeiten auf, da das verwendete Azaleensortiment sich für diese Zwecke als ungeeignet erwies. Erst nach Etablierung der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' in die Gewebekultur und erfolgreicher Mikrovermehrung konnten weiterführende Versuche hinsichtlich eines Regenerations- und Transformationssystems vorgenommen werden.

D.2.1 Überführung der Azaleen in die Gewebekultur, Mikrovermehrung und *in vitro*-Bewurzelung

Obwohl *Rhododendron* mit in Deutschland über eine Million kommerziell produzierten Pflanzen im Jahr 2004 zu den häufigsten mikrovermehrten Gehölzpflanzen zählt (Winkelmann et al., 2006), gibt es nur wenige aktuelle Veröffentlichungen speziell über die *in vitro*-Kultur von Topfazaleen (*Rhododendron simsii*). Die für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Sorten wurden daher zunächst auf Vermehrungsmedium für *Rhododendron* nach Anderson (1984) kultiviert. Eine Sprossbildung konnte aus den Achselknospen der Nodiexplantate von jungen unverholzten Stängel explantate bzw. aus Triebspitzen von Gewächshauspflanzen nach Überführung *in vitro* erreicht werden. Allerdings scheiterte eine Weitervermehrung der abgenommenen Sprosse. Auch nach Versuchen mit verschiedenen Basalmedien und Hormonkombinationen konnte lediglich die Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' in die Gewebekultur etabliert werden (Taubenböck, 2004). Durch Verwendung von Triebspitzen und Stängel explantaten mit ca. fünf Nodi auf Nährmedium nach Anderson (1984) mit einer Phytohormonkombination aus Indolessigsäure und Zeatin (Preil, persönliche Mitteilung) konnte die Sorte 'Mevrouw Edmond Troch', die auch für spätere Experimente verwendet wurde, erfolgreich etabliert und mikrovermehrt werden.

Eine generelle Übertragung von speziell für einzelne Sorten- oder Sortengruppen entwickelten Gewebekulturprotokollen insbesondere hinsichtlich des Basalmediums aber auch der Phytohormonkombination auf andere Azaleensorten scheint nicht möglich zu sein. So konnte die Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' erfolgreich auf Medium nach Economou und Read (1984) und auf *Woody Plant Medium* nach Lloyd und

McCown (1980), aber nicht auf *Rhododendron*-Medium nach Anderson (1984), etabliert werden. Auch Dabin und Bourharmont (1983) konnten keine erfolgreiche Mikrovermehrung der *Rhododendron*-Simsii-Hybriden 'Mme de Loose' und 'Ambrosiana' nach einem Protokoll von Preil und Engelhardt (1977) erzielen. Prinzipiell ist aber bei *Rhododendron* ssp., wie auch bei anderen verholzenden Pflanzen, die Verwendung von Basalmedien mit geringen Salzkonzentrationen notwendig (Pierik, 1997). Auch die optimale Phytohormonkombination und -konzentration scheint bei *Rhododendron* ssp. stark sortenabhängig zu sein, wobei im Allgemeinen die Verwendung des Auxins IAA in Kombination mit einem Cytokinin wie Zeatin, 2-Isopentenylaminopurin oder Thidiazuron sich förderlich auf die Sprossbildung auswirkt (McCown und Lloyd, 1983; Anderson 1984; Economou und Read, 1984).

Die *in vitro*-Bewurzelung bei Azaleen ist ebenfalls sortenabhängig (Dabin und Bourharmont, 1983). Eine Kultivierung der Azaleensprosse auf Bewurzelungsmedium mit 1/10 der Makro- und Mikronährstoffe des MS-Mediums mit 2 mg/l IAA (Preil und Engelhardt, 1977), sowie eine Steigerung der IAA-Konzentration bis zu 5 mg/l führte bei der in dieser Arbeit verwendeten Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' nur zu einem mäßigem Bewurzelungserfolg. Die höchste Bewurzelungsrate wurde bei dieser Sorte auf Medium nach Anderson (1984) mit Zugabe von Aktivkohle erreicht. Bisherige Erfahrungen bei der Etablierung von *in vitro*-Azaleensprossen *extra vitrum* haben gezeigt, dass eine vorherige *in vitro*-Bewurzelung förderlich ist und die Ausfallquote reduziert (Rannacher, persönliche Mitteilung). Im Hinblick auf eine spätere Überführung von transgenen Azaleensprossen in das Gewächshaus sind daher weitere Versuche zur Optimierung der Bewurzelung sinnvoll. Generell ist die *in vitro*-Bewurzelung bei verholzenden gegenüber krautigen Pflanzen schwieriger (Pierik, 1997). Neben äußeren Faktoren wie Licht, Temperatur, Zuckerkonzentration oder pH-Wert, kann auch das Alter der verwendeten Pflanze einen Einfluss besitzen. Bei der schwierig zu bewurzelnden Apfelsorte 'Jonathan' konnte durch häufige, vorangegangene Subkultivierungsschritte die Bewurzelungsrate deutlich verbessert werden (Noiten et al., 1986). Auch bei Azaleen ist der Bewurzelungserfolg abhängig von der Anzahl der Subkultivierungsschritte (Dabin und Bourharmont, 1983). Pierik und Steegmans (1975) erreichten zudem eine verbesserte Bewurzelung bei *Rhododendron* durch Erhöhung des osmotischen Drucks im Nährmedium von 2,5 zu 6,0 bar. In

Kombination mit weiterführenden Versuchen zur Überführung der Azaleen *extra vitrum* ist auch die Dauer der *in vitro*-Bewurzelung von Interesse. Schneider (2005) beobachtete z.B. bei Rosen eine signifikant geringere Mortalitätsrate *extra vitrum* nach verlängerter Bewurzelungsdauer *in vitro*.

D.2.2 Etablierung eines Regenerationssystems von Blattexplantaten

Ähnlich wie schon zuvor bei der Mikrovermehrung traten bei den anschließenden Regenerationsversuchen Schwierigkeiten auf. Trotz einer Reihe von Versuchen wurde keine oder nur geringe Adventivsprossregeneration ausgehend von Blattexplantaten erreicht. Samyn et al. (2002) entwickelten für schwierig zu regenerierende Sorten ein Protokoll basierend auf modifiziertem Medium nach Murashige und Skoog (1962). Auch bei diesen Versuchen wurden einige der Sorten zu keiner Adventivsprossregeneration angeregt. Andere Azaleensorten bildeten deutlich weniger Sprosse im Vergleich zur Sorte 'Helmut Vogel' auf Regenerationsmedium nach Mertens et al. (1996) aus. Ob die zu Beginn dieser Arbeit verwendeten Sorten generell nicht zur Adventivsprossregeneration fähig sind, oder ob die vorangegangenen Schwierigkeiten während der Mikrovermehrung dieser Sorten zu schlechtem pflanzlichen Ausgangsmaterial für die Regenerationsexperimente geführt haben, bleibt offen. Samyn et al. (2002) konnten zumindest für die auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sorte 'Sachsenstern' eine geringe Adventivsprossbildung erreichen. Für nachfolgende Transformationsexperimente ist eine gute Regeneration jedoch unerlässlich. Hohe Sprossbildungsraten konnten in dieser Arbeit bei der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch', einer Blütenmutante der Sortengruppe 'Helmut Vogel', auf Regenerationsmedium nach Mertens et al. (1996) und bei der Sorte 'Mevrouw Gerard Kint' auf Medium nach Samyn et al. (2002) erreicht werden. Da die Adventivsprosse der Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' sich signifikant schneller und größer entwickelten, und deren weiße Blütenfarbe vorteilhaft für ein Eingreifen in die Flavonoidbiosynthese mittels *genetic engineering* ist, wurde die Regeneration für diese Sorte in weiteren Versuchen optimiert.

Bei Verwendung der in ihrer Wirkungsweise eher stark zu bezeichnenden 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure konnte eine Regenerationsrate von ca. 70 % bereits nach einer zweiwöchigen Kallusinduktion erreicht werden. Eine ähnlich hohe Regenerationsrate ist unter dem Einfluss der „schwächeren“ Naphtylessigsäure erst nach dreiwöchiger Kallusinduktion möglich. Da bei Transformationsexperimenten

eine zweiwöchige Vorkultur zu hohen Transformationsraten führt, bietet sich an, ebenfalls eine zweiwöchige Kallusinduktionsphase unter dem Einfluss von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure zu wählen, da so das Umsetzen der Explantate auf Sprossinduktions- bzw. Selektionsmedium synchronisiert werden kann. Allerdings kann 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure Mutationen auslösen und die Photosynthese unterdrücken. Eine längere Kulturdauer auf 2,4-D enthaltendem Medium sollte daher vermieden werden (Pierik, 1997).

Zeatin im Sprossinduktionsmedium fördert die Entwicklung langer und gut entwickelter Adventivsprosse, während sich unter Thidiazuroneinfluss kleinere Sprosse bilden, die jedoch in größerer Anzahl am Explantat erscheinen. Ähnliche Beobachtungen konnten auch Mertens et al. (1996) für die Sorte 'Helmut Vogel' beschreiben. Hinsichtlich der Verwendung des Regenerationsprotokolls für Transformationszwecke ist der Einsatz von Thidiazuron evtl. vorzuziehen, da bei Bildung vieler, wenn auch kleinerer Sprosse die Wahrscheinlichkeit für den Erhalt transgener Sprosse steigt.

D.2.3 Etablierung eines Transformationssystems

Obwohl bis zum heutigen Zeitpunkt die erfolgreiche Transformation einer Vielzahl von Pflanzenarten publiziert wurde, sind Transformationsprotokolle in Abhängigkeit verschiedener Faktoren für jede Pflanzenspezies individuell zu entwickeln. Häufig ist zudem eine weitere Anpassung des Protokolls für einzelne Sorten und Linien notwendig. Maßgeblich für die Wahl der Methode und den Erfolg sind in der Regel die Regenerationsfähigkeiten und Selektionsmöglichkeiten verschiedener Gewebearten. Ausgehend von *in vitro*-Stänglexplantaten wurde an *Rhododendron yakushimanum* Hybriden (Ueno et al., 1996) und an *Rhododendron catawbiense* Hybriden (Pavingerová, 1996) die erfolgreiche stabile Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* gezeigt. Knapp et al. (2001) regenerierten transgene Sprosse aus Blattexplantaten von *Rhododendron catawbiense* nach biolistischer Transformation. Auch durch direkte Infektion mit *Agrobacterium* von Adventivsprossen, die nach vorangegangener sechs- bis achtwöchiger Blattexplantatkultur geerntet wurden, konnten transgene Rhododendren mit Kalktoleranz erzielt werden (Dunemann et al., 2002). Zu den aber wohl häufigsten Transformationsmethoden zählt die *Leaf Disk*-Methode nach Horsch et al. (1985). Als Ausgangspunkt für die Etablierung eines Transformationssystems für *Rhododendron simsii* am Lehrstuhl diente das von Mertens et al. (1997) entwickelte

Protokoll, bei der die *Agrobacterium*-Suspension auf zwei Wochen vorkultivierte Blattexplantate pipettiert wird. Mit dieser Methode, die durch Aufpipettieren der *Agrobacterium*-Kultur die Handhabung der 4 bis 6 mm² kleinen Blattexplantaten erleichtert, konnten jedoch im Vergleich zu der *Leaf Disk*-Methode, bei der die Explantate in die Suspension eingetaucht werden, ein deutlich geringerer Transformationserfolg erreicht werden. Da zum Teil unterschiedliche Voraussetzungen z.B. hinsichtlich des verwendeten *Agrobacterium*-Stamms, des eingesetzten binären Plasmids und der Azaleensorte gegeben waren, können allerdings einzelne Größen wie die Häufigkeit der GUS-Aktivität der vorliegenden Arbeit nicht direkt mit den Ergebnissen von Mertens et al. (1997) und Mertens et al. (2000) verglichen werden.

Die Vakuuminfiltration verbessert das Eindringen der Agrobakterien in das pflanzliche Gewebe und erhöht die Zahl der Zellen, in denen die T-DNA übertragen wird (Kapila et al., 1997). In zahlreichen Beispielen wie *Brassica rapa* (Qing et al., 2000), *Lens culinaris* (Mahmoudian et al., 2002) und *Pinus radiata* (Charity et al., 2002) konnte durch Vakuuminfiltration der Agrobakterien die Transformationshäufigkeit gesteigert werden. Bei *Ginkgo biloba* erhöht diese Methode zwar die Zahl der transgenen Zellen, doch werden hierbei auch viele Pflanzenzellen zerstört (Dupré et al., 2000). Evtl. ist dies ursächlich für das Scheitern der Vakuuminfiltrationsmethode bei Azaleen. Andererseits korreliert die Integration der T-DNA in der Wirtszelle mit der Anwesenheit von DNA-Reparaturenzymen, die in verletzten Gewebebereichen stärker exprimiert werden (Köhler et al., 1989; Mysore et al., 2000; Friesner und Britt, 2003). *In vitro*-Blattexplantate der Azaleen zeigten eine deutlich häufigere GUS-Aktivität nach Verletzung des Gewebes durch Reibung mit sterilem Quarzsand oder nach Nadeleinstichen (Pfeufer, 2005), was vermutlich mit einer verbesserten Infiltration des Gewebes durch Agrobakterien zu erklären ist, aber auch mit der Induktion von Reparaturmechanismen der Wirtszellen und damit verbesserten Integration der T-DNA. Prinzipiell problematisch bei diesen Methoden an Azaleen ist, dass die Agrobakterien anschließend schlecht vom pflanzlichen Gewebe entfernt bzw. abgetötet werden können, so dass häufig im weiteren Kulturverlauf mit einem Verlust der Explantate durch Überwachsen mit Bakterien Schleim zu rechnen ist.

Ein weiterer wesentlicher Faktor für den Transformationserfolg kann die Wahl des verwendeten *Agrobacterium*-Stammes sein. Die Unterschiede der Infektiosität liegen

hierbei insbesondere in Strukturunterschieden der außerhalb der T-DNA positionierten *vir* Gene (Hansen et al., 1994, Gelvin, 2000). Erfolgreiche Transformationsexperimente an *Rhododendron* wurden mit dem Octopin-Typ LBA4404 (Ueno et al., 1996) und dem Nopalin-Typ GV3101 (Dunemann et al., 2002) durchgeführt. Mertens et al. (1997) verwendeten für *Rhododendron simsii* den *Agrobacterium*-Stamm AGLO, einem Agropin-Typ. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Eignung des LBA4404-Stammes und des supervirulenten EHA105-Stammes (Succinamopin-Typ) gezeigt werden. *Rhododendron* ssp. scheint daher einen weiten Wirtsbereich für das Agrobakterium zu besitzen.

Auch die optimale Präkulturdauer kann zwischen verschiedenen Pflanzenarten schwanken. Entscheidend ist hierbei der Zyklus der zu transformierenden Zellen, da besonders während der DNA-Replikation (S-Phase) die Integration der T-DNA stattfindet. Durch 2tägige Behandlung auf hormonhaltigem Medium werden die normalerweise bis zu 98 % in der G0 und G1-Phase befindlichen Mesophyllzellen von *Petunia hybrida* in die S-G2-M-Phase verschoben (Villemont et al., 1997). Dadurch können wesentlich höhere Transformationsraten erreicht werden. Bei vielen Pflanzenarten wird vor der Kokultur mit *Agrobacterium* eine mehrtägige Präkultur vorgenommen. Interessant sind hierzu auch Versuche von Imani et al. (2002) an *Daucus carota*. Hier konnte deutlich eine höhere Transformationseffizienz durch Synchronisation des Zellzyklus nach Behandlung mit Fluordesoxyuridin und Thymidin erreicht werden. Fluordesoxyuridin ist ein Inhibitor der Thymidinsynthese. Durch die Abwesenheit von Thymidin werden die Zellen am Eintritt in die S-Phase gehindert, so dass eine Anreicherung von Zellen in der G1-Phase am Übergang zur S-Phase erfolgt. Nach Zugabe von Thymidin treten dann die Zellen gleichzeitig in die S-Phase über (Blaschke et al., 1978). An *Daucus carota* wurde bei auf diese Weise synchronisierten Suspensionskulturen eine viermal höhere GUS-Aktivität als bei der nicht synchronisierten Kontrolle erreicht.

Bei Azaleen erfolgt die häufigste GUS-Aktivität der transformierten Explantate nach 14tägiger Präkultur. Zu diesem Zeitpunkt ist an den Wundrändern der Explantate bereits ein Kallussum ausgebildet und bietet somit keine offene Wundstelle, die das Eindringen der Agrobakterien erleichtern könnte. Andererseits scheint die mitotische Zellphase während der Kallusbildung die Integration der T-DNA zu verbessern. Nachträgliche Verletzungen der Kalli wirken sich im weiteren Kulturverlauf ungünstig auf die Eliminierung der Agrobakterien aus, so dass auch im Hinblick auf die relativ

hohe Transformationsrate der Explantate von knapp 80 % darauf verzichtet werden kann.

Problematisch in allen Versuchen zur Etablierung eines Transformationssystems für Azaleen am Lehrstuhl war u.a. ein Überwachsen der Explantate mit *Agrobacterium*-Schleim bei Verwendung von Cefotaxim zum Abtöten der Bakterien. Ein Antibiotikum zur Hemmung von *Agrobacterium* sollte idealerweise hoch effektiv sein ohne gleichzeitig einen negativen Effekt auf das Wachstum oder die Regenerationsfähigkeit des pflanzlichen Gewebes zu besitzen. Die am häufigsten für diesen Zweck verwendeten Antibiotika sind Cefotaxim und Carbenicillin. Für einige Pflanzenarten können beide Antibiotika aufgrund der auxinähnlichen Struktur ihrer Abbauprodukte sogar einen positiven Effekt auf die Regenerationsfähigkeit besitzen (Nauerby et al., 1997, und darin enthaltene Referenzen). In hohen Konzentrationen üben sie jedoch bei vielen Arten einen hemmenden Einfluss aus, wie beispielsweise bei *Antirrhinum majus* (Holford und Newbury, 1992), *Arabidopsis thaliana* (Patton und Meinke, 1988), *Malus x domestica* (Yepes und Aldwinkle, 1994), *Delphinium* (Leifert et al., 1992). Auch bei Azaleen unterdrückt eine Konzentration von 500 mg/l Cefotaxim, und sogar ab 200 mg/l Carbenicillin, die Regeneration adventiver Sprosse.

Timentin besteht aus Ticarcillin, ein halbsynthetisches Penicillin, dass durch β -Lactamase produzierenden Bakterien inaktiviert werden kann und daher mit Clavulansäure, einem β -Lactamase-Inhibitor, im Verhältnis 50:1 gemischt wird. Timentin bzw. Ticarcillin unterdrückt in human- und veterinärklinischen Studien das Wachstum gram-positiver und gram-negativer Bakterien und ist auch zur Kontrolle des *Agrobacterium*-Wachstums nach Transformationsexperimenten einsetzbar (Schröder et al., 1993; Zimmerman, 1995), so auch bei *Rhododendron* ssp. (Pavingerová et al., 1997; Dunemann et al., 2002). In vergleichenden Studien mit Cefotaxim und/oder Carbenicillin führte die Behandlung mit Timentin nach Transformation von *Artemisia annua* (Vergauwe et al., 1996), *Lycopersicon esculentum* (Ling et al., 1998), *Nicotiana tabacum* (Nauerby et al., 1997) und *Ulmus pumila* (Cheng et al., 1998) zu einem verbesserten Transformationserfolg und guter Kontrolle des *Agrobacterium*-Wachstums. Auch bei Behandlung der Azaleenblattexplantate mit Timentin konnten die Agrobakterien vollständig unterdrückt werden, während bei gleicher Cefotaximkonzentration weniger Explantate regenerierten und einige von Agrobakterien überwuchert wurden. In

hohen Konzentrationen zeigt Timentin zudem bei Blattexplantaten von *Echinacea purpurea* keine Toxizität, sondern vielmehr einen stimulierenden Einfluß auf die Adventivsprossinduktion (Wang und To, 2004). Bei *in vitro*-Kotyledonen von Tomaten führten hohe Timentinkonzentrationen zu einer verstärkten Morphogenese (Costa et al., 2000). Eine Konzentration von 500 mg/l Timentin unterdrückt bei Azaleen die Adventivsprossregeneration. Evtl. wäre es dennoch interessant, den Einfluss von Timentin in weiteren empirischen Untersuchungen mit niedrigeren Konzentrationen zu überprüfen. Prinzipiell unterdrückt das vergleichsweise kostengünstige Timentin ab 200 mg/l bei Azaleen die Agrobakterien und führt zu einer leicht verbesserten Regenerationsrate im Vergleich zur Behandlung mit dem vormals verwendeten Cefotaxim.

D.2.4 Selektion der transgenen Zellen

Die Azaleenexplantate zeigten bei Versuchen zur Etablierung eines auf Kanamycin basierenden Selektionssystems eine starke Sensibilität gegenüber dem Antibiotikum. Bereits ab 10 mg/l Kanamycin konnte keine Regeneration transgener Sprosse erzielt werden. Eine Reduzierung der Konzentration führte zwar zu Adventivsprossregeneration, allerdings mit einer großen Anzahl von *Escapes*, also nicht transgenen Sprossen. Ein deutlicherer Selektionseffekt wurde erst mit im Kulturverlauf steigenden Kanamycinkonzentrationen erreicht, wobei ein verzögerter Selektionsbeginn um 14 Tage sich positiv auf die absolute Anzahl transgener Sprosse auswirkt. Diese starke Sensibilität gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin scheint sich innerhalb der Gattung *Rhododendron* auf die *Rhododendron-Simsii*-Hybriden zu beschränken. Mit dem *nptII* Gen transformierte *Rhododendron* spp. konnten erfolgreich bei der Kanamycinkonzentration von 100 mg/l selektiert werden (Pavingerová et al., 1997; Knapp et al., 2001; Dunemann et al., 2002). Transformationsexperimente der *Rhododendron-Simsii*-Sorte 'Helmut Vogel' führten dagegen nur bei deutlich geringeren Konzentrationen von 10 bzw. 20 mg/l zur Regeneration transgener Sprosse (Mertens et al., 1997).

Im Hinblick auf eine eventuelle Kommerzialisierung und damit verbundener Zulassung transgener Azaleen innerhalb der EU wurde ein auf Mannose basierendes Selektionssystem entwickelt. *manA* transgenes Gewebe kann in einigen Pflanzenarten mit Hilfe des pH-Indikators Chlorphenolrot nachgewiesen werden, so z.B. bei *Citrus sinensis* (Boscariol et al. 2003), *Oryza sativa* (Lucca et al., 2001), *Zea mays* und *Triticum aestivum* (Wright et al., 2001). Vorversuche von Pfeufer (2006)

konnten jedoch zeigen, dass der Chlorphenolrot Test zum Nachweis von *manA* transformierten Azaleengewebe ungeeignet ist. Zur Unterstützung der Etablierung des Mannoseselektionssystems wurde daher aus dem Binärenvektor pBI121 die GUS-Expressionskassette einschließlich des Promotors und Terminators kloniert und in die *multiple cloning site* des pNOV2819 Vektors eingesetzt.

In Vorversuchen konnte von Pfeufer (2006) gezeigt werden, dass Mannose als Selektionsagens für Transformationsexperimente bei Azaleen geeignet ist. Hier zeigte sich ebenfalls bei der Ermittlung der geeigneten Mannose- und Saccharosekonzentration, dass bei *Rhododendron simsii* eine Regeneration transgener Sprosse nur durch einen steigenden Selektionsdruck während des Kulturverlaufs möglich ist. Auch bei Apfel konnte die Bildung von *manA* transgenen Sprossen an Blattexplantaten erst durch eine Anpassung des Selektionsdrucks während der Regeneration, durch steigender Mannosekonzentration bei sinkender Sorbitolkonzentration, erreicht werden (Degenhardt et al., 2006). Während die Bildung von *Escapes* bei Apfel komplett vermieden wurde, ist dies bei Azaleen nur bei einer sehr „strengen“ Selektion möglich, die aber zur Bildung nur weniger transgener Sprossen führt. Bei einem etwas schwächeren Selektionsdruck wird eine größere absolute Anzahl transgener Sprossen erzielt, jedoch muss hier mit der Regeneration von *Escapes* gerechnet werden. Eine erfolgreiche Transformation mit dem Phosphomannose-Isomerase System ist jedoch gut bei Azaleen durchführbar, wobei eine weitere Anpassung des Protokolls, z.B. durch Reduktion des Saccharosegehaltes im Medium, die Selektionseffizienz evtl. verbessern könnte.

D.2.5 Zeitlicher Umfang bei der Gewinnung putativ transgener Azaleen und Überprüfung des Materials

Die Regeneration von nicht transformierten Adventivsprossen aus Azaleen-Blattexplantaten *in vitro* ist im Vergleich zu vielen krautigen Pflanzen langwierig. So können die ersten Adventivsprosse nach ca. 10 bis 12 Wochen beobachtet werden, wobei diese aufgrund ihrer geringen Größe in der Regel erst nach weiteren 4 bis 6 Wochen abgenommen und auf Vermehrungsmedium umgesetzt werden. Eine *Agrobacterium*-vermittelte Transformation erzeugt hierbei einen zusätzlichen Stress, so dass die Regeneration adventiver Sprosse häufig erst später zu beobachten ist. Zusätzlich verzögert die notwendige Selektionsbehandlung die Regeneration. Die Abnahme putativ transgener Sprosse ist oftmals erst nach fünf Monaten oder länger möglich. Die Länge dieser Sprosse variiert hierbei zwischen 2 bis 5 mm.

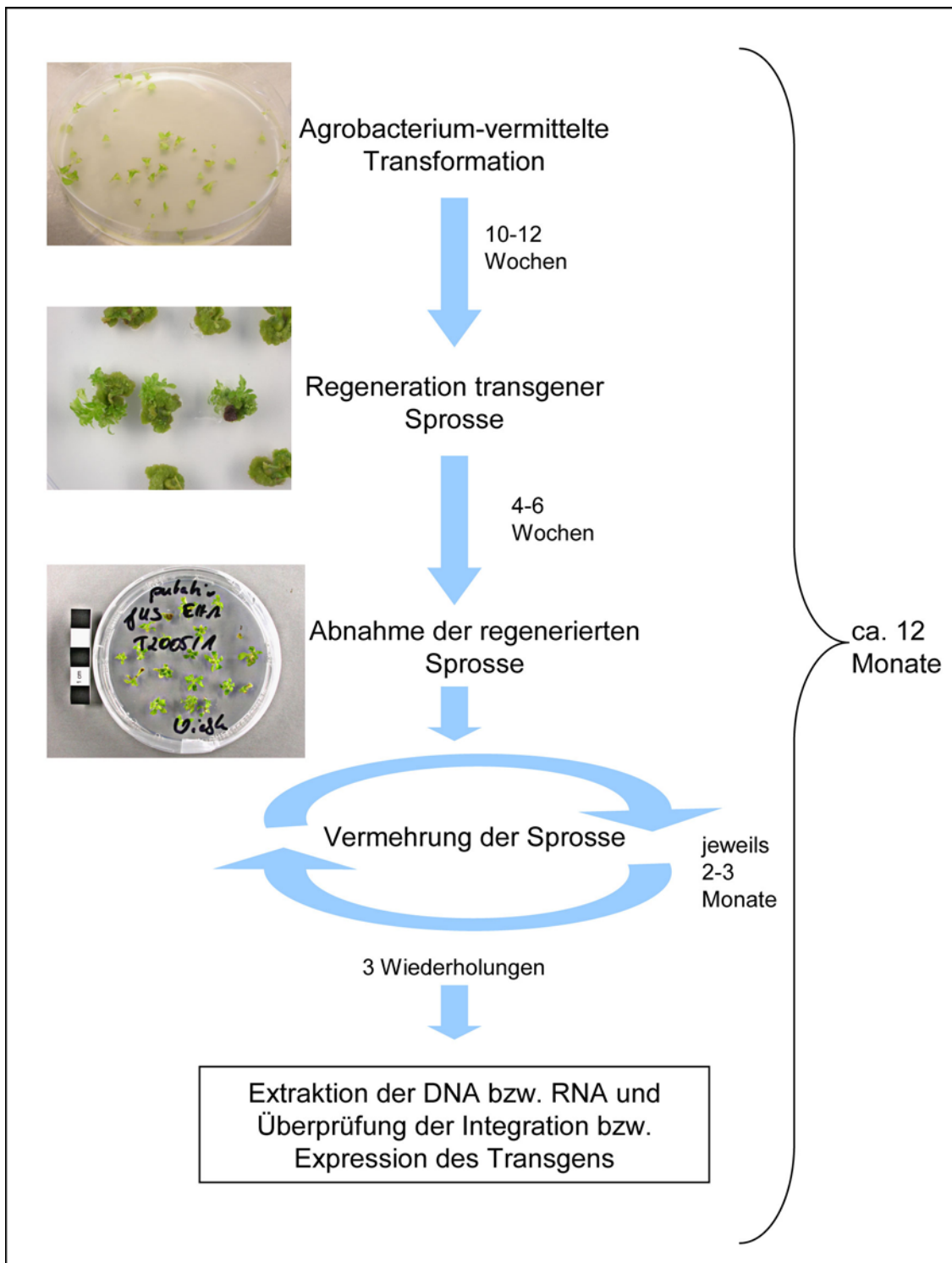


Abb. D.1: Zeitlicher Umfang der Gewinnung putativ transgener Azaleen und der Überprüfung des Materials

Um eine ausreichende Menge genomischer DNA für eine Überprüfung der Transgenität aus den Sprossen zu isolieren ist eine vorgeschaltete Vermehrungsphase der Sprosse unbedingt notwendig. Hierbei ist mit wenigstens weiteren 2 bis 3 Monaten zu rechnen. Da bei einer Transformation mit einem wirtschaftlich bedeutenden Zielgen (z.B. Flavonoidgen) die Vermehrung und

Erhaltung der putativ transgenen Sprosse von vorrangiger Bedeutung ist, sind in der Regel ein bis zwei weitere Vermehrungsphasen notwendig, bevor ausreichend Pflanzenmaterial zur Gewinnung genomischer DNA oder RNA zur Verfügung steht. Insgesamt ist daher vom Tag der Transformation eines Azaleen-Explantates bis zur Überprüfung der Integration und Expression des Selektions- und Zielgens mit wenigstens einem Jahr zu rechnen. Es musste daher aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit auf die Überprüfung der Genexpression mittels RT-PCR verzichtet werden. Stattdessen wurde lediglich die Aktivität des *uidA* Gens mittels der GUS-Farbreaktion getestet. In der Abb. D.1 S. 116 ist schematisch der zeitliche Ablauf vom Tag der Transformation bis zu der Extraktion der DNA und RNA dargestellt.

Bei der Überprüfung des putativ transgenen Materials wiesen einige mit pBI121 transformierte Sprosse zwar die Integration des *nptII* aber nicht des *uidA* Gens auf. Begründet liegt dies vermutlich an der Position des Markergens innerhalb der T-DNA, der bei dem pBI121 Vektor hinter der rechten Bordersequenz liegt, an der die DNA-Übertragung in das pflanzliche Genom beginnt. Bei einem Abbruch der Übertragung ist, anders bei Vektoren wie dem pNOV2819 mit dem Selektionsgen an der linken Bordersequenz, dadurch die Integration des Zielgens nicht gewährleistet.

Deutlich abweichende Ergebnisse wurden bei der Transformation mit beiden Konstrukten zwischen dem Nachweis der *uidA* Integration und der GUS-Färbereaktion beobachtet. Vermutlich wird das *manA* Gen dennoch exprimiert und die Färbereaktion mittels GUS-Assay ist evtl. an regenerierten *in vitro*-Azaleenpflanzen als Nachweisverfahren ungeeignet. Um die GUS-Aktivität dennoch nachweisen zu können ist evtl. auch ein Enzymtest möglich, für den aber ausreichend pflanzliches Material zur Verfügung stehen muss.

Bei vielen Transformationsexperimenten wurde eine positive wie auch eine negative Korrelation zwischen der Kopienzahl des eingeführten Gens und dessen Ausprägung beobachtet. Unterhalb eines genspezifischen Schwellenwertes steigt die Stärke der Expression proportional, während die Überschreitung des Schwellenwertes eine Ausschaltung aller Genkopien auslöst (Ko-Suppression) (Hobbs et al., 1993). Allerdings führt die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation eher zu *single-copy* oder *low-copy* Integration, insbesondere im Vergleich zu Methoden des direkten Gentransfers (Hansen et al., 1997). Bei transgenen Kartoffeln wurde aber z.B. eine stabile und starke Ausprägung des Reportergens erst bei Linien mit mehr als vier

Transgenkopien nachgewiesen, wobei das Auftreten von multiplen Genkopien in Abhängigkeit des verwendeten Binärvektors stattfand (Nadolska-Orczyk, 2007).

Die Inaktivierung (*Silencing*) eingeführter Gene in transgenen Pflanzen wird seit Ende der 1980er Jahre beschrieben. Während dieses Phänomen für die angewandte Gentechnik zunächst eher ein hinderliches Problem darstellte, wurden intensive Grundlagenforschungen in diesem Gebiet betrieben, was zahlreiche Publikationen und *Review*-Artikel der letzten 10 bis 15 Jahre belegen (Hobbs et al., 1990; Stam et al., 1997; Mittelsten-Scheid und Paszowski, 2000; Matzke et al., 2001; Bleys et al., 2006). Hierbei konnten zwei generell verschiedene Arten des *transgene silencing* beschrieben werden. Zum einen kann eine Inaktivierung aufgrund eines klassischen Positionseffektes erfolgen, bei der die flankierende Pflanzen-DNA und/oder die chromosomale Lokalisierung einen negativen Effekt auf die Expression des *single copy* transgenen Loci ausüben. Zum anderen ist eine epigenetische Inaktivierung durch das Vorkommen multipler Kopien der gleichen Sequenz im pflanzlichen Genom möglich. Da dieser Typ des *silencing* Phänomens aufgrund einer Interaktion zwischen homologer oder komplementärer DNA-Sequenzen auftritt, wird es auch als *Homology Dependent Gene Silencing* (HDGS) bezeichnet (Meyer und Saedler, 1996). Es wird charakterisiert durch eine negative Korrelation zwischen der Genkopienanzahl und der Genexpression (Matzke et al., 2000). Und auch hier kann die Klassifikation des HDGS in zwei Kategorien erfolgen: in das transkriptionale *Gene Silencing* (TGS), aufgrund von Promotersequenzhomologien, und in das posttranskriptionale *Gene Silencing* (PTGS), verursacht durch Sequenzhomologien innerhalb der transkribierenden Region. Während bei TGS eine geringe Transkription aufgrund Hypermethylierung der Promotersequenz stattfindet, ist bei PTGS eine cytoplasmatische sequenzspezifische RNA-Degradierung ursächlich. Hierbei spielen doppelsträngige RNA-Moleküle eine zweifache Rolle: sie sind beteiligt bei der so genannten RNA-vermittelten DNA-Methylierung und als Signal für die *silencing*-Induktion des PTGS (Kooter et al., 1999, und darin enthaltene Referenzen). Dieser Mechanismus der ds-RNA induzierten Inaktivierung, auch RNA Interferenz (RNAi) genannt, ist heute größtenteils aufgeklärt, in einer Vielzahl von Publikationen wiedergegeben und wird unter anderem zum Ausschalten von Genen in Transformationsexperimenten genutzt (Hannon, 2002; Mansour et al., 2006; Small, 2007).

Leider konnten bisher aufgrund des geringen Pflanzenmaterials keine Expressionsstudien mittels RT-PCR oder *Southernblot* Analysen zur Ermittlung der Kopienzahl durchgeführt werden, so dass die Ursache für die teils fehlende GUS-Reaktion noch nicht geklärt werden konnte. Da hierzu entsprechend ausreichende Mengen an genomischer DNA oder RNA isoliert werden müssen, können diese Versuche erst nach einer Vermehrungsphase der transgenen *in vitro*-Pflanzen erfolgen.

D.3 Ausblick

Es konnte in dieser Arbeit unter der Verwendung der weißblühenden Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' ein effektives Regenerationssystem am Lehrstuhl etabliert werden, von dem ausgehend Transformationsexperimente sowohl mit einem Antibiotikamarker als auch einem alternativen Marker erfolgreich vorgenommen wurden. Die etablierten Transformationsprotokolle mit Kanamycin-Marker, sowie mit PMI-Marker eignen sich gut für die Regenerierung transgener Azaleensprosse. Vor allem die Verwendung des Phosphomannose-Isomerase Markers ist hierbei im Hinblick der Zulassungsbedingungen von GVOs innerhalb der EU von wirtschaftlichem Interesse. Besonders auffällig war bei den Untersuchungen zur Ermittlung der Selektionsgrenzen das Auftreten von transgenen Azaleensprossen auf antibiotika- bzw. mannosefreien Medien. Der gänzliche Verzicht auf die Selektion könnte eine gute Alternative zu den bisher entwickelten Selektionssystemen bieten. Zwar wäre der Aufwand zur Überprüfung des putativ transgenen Materials beispielsweise über die PCR höher, doch könnten die erheblichen Vorteile einer selektionsfreien Transformation diesen Nachteil aufwiegen. So würden zum Beispiel die zum Teil beobachteten Wuchsdepressionen aufgrund der Selektionsbehandlung wegfallen. Eventuell könnte die allgemeine Regeneration auch etwas beschleunigt werden. Das schlagkräftigste Argument für die markerfreie Selektion wäre aber natürlich die vermutlich höhere Akzeptanz der Öffentlichkeit, was die Einführung einer transgenen Azalee auf den europäischen Markt erleichtern könnte. Weitere Untersuchungen zu einer selektionsfreien Transformation sind auf jeden Fall sinnvoll. Auch die Methodik zur Überprüfung von putativ transgenen Material sollte in diesem Zuge verbessert bzw. vereinfacht werden. So bieten einige Firmen beispielsweise Kits an, bei denen pflanzliche Gewebeproben direkt in das Reaktionsgefäß gegeben und nach einer unkomplizierten Aufarbeitung die PCR durchgeführt werden kann.

In weiteren Untersuchungen müssen noch die Expression der eingeführten Gene mittels RT-PCR und die Anzahl der Genkopien durch *Southernblot*-Anaylsen überprüft werden. Prinzipiell ist aber mit dem bestehenden System die Transformation mit Zielgenen, wie z.B. Genen der Flavonoidbiosynthese, möglich (siehe auch D.1.3). Die weißblühende Sorte 'Mevrouw Edmond Troch' bildet hierzu eine gute Ausgangssorte, da sie zum einen eine gute Regenerationsfähigkeit besitzt und zum anderen das 2'4'6'4-Tetrahydroxychalkon in ihren Blütenpetalen bildet, von dem ausgehend durch *molecular engineering* stabile gelbe Chalkone oder Aurone gebildet werden können. Entsprechende Konstrukte wurden in den letzten Jahren am Lehrstuhl zum Teil kreiert, erfolgreich in *Petunia*, *Osteospermum* und *Torenia* transformiert und können für *Rhododendron simsii* eingesetzt werden (Pedross, 2006; Stenzer, unveröffentlicht).

E Zusammenfassung

Die Azalee zählt zu den wirtschaftlich bedeutendsten Zierpflanzenarten auf dem europäischen Markt. Das Interesse an der Schaffung von Neuheiten insbesondere hinsichtlich der Blütenfarbe ist dementsprechend groß. Die Methoden der Biotechnologie und Molekularbiologie haben innerhalb der modernen Pflanzenzüchtung an Bedeutung gewonnen und führten bereits bei zahlreichen Pflanzenarten zu einer erfolgreichen Veränderung der Blütenfarbe. An der Farbausprägung von Blütenblättern der Azalee sind die Cyanidin-, Päonidin- und Delphinidinderivate beteiligt. Zudem führen Kopigmentationen mit Flavonolen zu Farbnuancen. Um die Voraussetzungen für ein *genetic engineering* bei Azaleen zu schaffen, wurden Untersuchungen hinsichtlich der Flavonoidbiosynthese vorgenommen und ein Transformationssystem etabliert.

Die an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme Chalkonsynthase (CHS), Chalkonisomerase (CHI), Flavanon 3-Hydroxylase (FHT), Dihydroflavonol 4-reduktase, Anthocyanidinreduktase (ANR) und Flavonoid 3-O-glukosyltransferase (FGT) wurden in Blütenextrakten der Azalee nachgewiesen und teils charakterisiert. Die Aktivitäten aller untersuchten Flavonoidenzyme konnten sowohl in anthocyanhaltigen, wie auch in anthocyanfreien Blütenblättern gemessen werden. Da die ANS in Blütenextrakten bisher nicht nachweisbar ist, wurde die cDNA der ANS aus Azaleen kloniert und heterolog in Hefe exprimiert. Der Enzymtest des rekombinanten Proteins erbrachte den Nachweis einer funktionsfähigen ANS in weißblühenden Azaleen. In halbquantitativen Analysen wurde zudem die Expression der *chs*, *chi*, *fht*, *dfr* und *ans* Gene über die gesamte Blütenentwicklung sowohl bei einer Azaleensorte mit roten Blüten als auch bei anthocyanfreien Sorten gezeigt. In weißen Azaleenblüten liegt damit keine Blockierung der Anthocyanbiosynthese vor.

Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer, basierend auf der *Leaf Disk*-Technik, wurde ein *in vitro*-Regenerationssystem am Lehrstuhl etabliert. Von zwölf untersuchten Sorten wiesen nur zwei eine ausreichend hohe Adventivsprossrate auf. Für die weißblühende Azalee 'Mevrouw Edmond Troch' wurde im Anschluss ein effektives Transformationsprotokoll hinsichtlich der Eignung zweier *Agrobacterium*-Stämme, der Infektionsmethode, der Dauer der Präkultur, der Stärke des Selektionsdrucks und der Eliminierung der Agrobakterien nach der Kokultur entwickelt. Die Azaleen zeigten sich dabei besonders sensitiv gegenüber dem zur

Selektion transgener Zellen eingesetztem Antibiotikum Kanamycin. Zusätzlich wurde ein Selektionssystem mit der Phosphomannose-Isomerase (PMI) für die Selektion mit Mannose als alternativen Marker getestet. Ein Transformationserfolg konnte sowohl bei Verwendung des *nptII* Gens (Kanamycin-Resistenz) als auch des *manA* Gens (PMI-Marker) nur mit steigenden Selektionsdrücken während der Regeneration der Adventivsprossen erreicht werden. Bei den zur Kontrolle auf kanamycin- bzw. mannosefreien Nährmedien kultivierten und transformierten Azaleenexplantaten wurde das Auftreten von transgenen Adventivsprossen beobachtet. Eventuell ist die Gewinnung von gentechnisch veränderten Azaleen ohne die Verwendung eines Selektionssystems eine interessante Alternative im Hinblick auf eine Kommerzialisierung und die damit verbundene Zulassungsbedingungen innerhalb der EU.

E.1 Summary

The azalea is one of most economically important ornamental plant of the european floriculture market. Therefore the azalea industry is particularly interested in creation of novelty regarding flower colour. In modern plant breeding, new technologies of biotechnology and molecular biology have resulted in successful flower colour modifications in many plant species. The flower colour of azalea is due to derivatives of the anthocyanidins cyanidin, peonidin and delphinidin. Copigmentations with flavonols contribute to various hues. Investigations on flavonoid biosynthesis were performed to obtain the precondition of genetic engineering of azalea. Additionally, a transformation system was established.

The enzymes involved in flavonoid biosynthesis chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavonoid 3-hydroxylase (FHT), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidin reductase (ANR) and flavonoid 3-O-glucosyltransferase (FGT) have been demonstrated in protein extracts of petals and partly characterised. Interestingly, the activity of all enzymes was shown in cyanic and acyanic petals. Additionally, a *ans* cDNA clone was generated and heterologously expressed in yeast. Testing the recombinant protein demonstrated a functional ANS in the white flowered azalea. Half quantitative analysis of *chs*, *chi*, *fht*, *dfr* and *ans* showed their expression during the flower development in one cyanic as well as several acyanic cultivars. The evidence of all enzyme activities and gene expression suggests that no block in the flavonoid biosynthesis is present in white flowering petals. For

Agrobacterium-mediated transformation of azalea, the leaf disk method was used. As a requirement, a regeneration system had to be established first. Only two of twelve tested cultivars showed a high enough rate of adventive shoot formation. The white flowering cultivar 'Mevrouw Edmond Troch' was selected for developing a transformation protocol. Investigations were performed regarding the eligibility of the *agrobacterium* strain, the method of the inoculation, the duration of the preculture, the selection pressure and the elimination of the *agrobacterium* after coculture. Azalea was shown to be very sensitive to kanamycin, an antibiotic used for selection of transgenic cells. Furthermore, an alternative system with a phosphomannose isomerase marker (*pmi*) was tested. With both, the *nptII* gene (kanamycin resistance) and the *manA* gene (*pmi*-marker), a successful transformation was only possible by increasing antibiotic or mannose concentrations during regeneration. As a control, transformed azalea explants were cultivated on media free of kanamycin and mannose, respectively. Regeneration of transgenic shoots was possible without selection with kanamycin or mannose. Consequently, the marker-free transformation could be an interesting alternative for generating genetic modified azalea, especially in regard to concession and commercialisation in the European community.

F Literaturverzeichnis

Aida R, Yoshida K, Kondo T, Kishimoto S und Shibata M (1999) Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Sci.* 160, 49-56

Alfenito M, Souer E, Goodman C, Buell R, Mol J, Koes R und Walbot V (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathion S-transferase. *The Plant Cell* 10, 1135-1149

Allais D, Chulia A, Kaouadji M, Simon A und Delage C (1995) 3-Deoxycallunin and 2'- Acetylcallunin, two minor 2,3-Dihydroflavonoid glucosides from *Calluna vulgaris*. *Phytochem.* 39, 427-430

Almeida J, Carpenter R, Robbins T, Martin C und Coen E (1989) Genetic interactions underlying flower color patterns in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev.* 3, 1785-1765

Amrhein N und Zenk (1971) Untersuchungen zur Rolle der Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) bei der Regulation der Flavonoidsynthese in Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Z. Pflanzenphysiol.* 64, 145-168

Anderson J (1968) Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochem.* 7, 1973-1988

Anderson W (1984) A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109, 343-347

Asen S, Stewart R und Norris (1971) Co-pigmentation effect of quercetin glycosides on absorption characteristics of cyanidin glycosides and color of red wing azalea. *Phytochem.* 10, 171-175

Blaschke J, Forche E und Neumann K-H (1978) Investigations on the cell cycle of haploid and diploid tissue culture of *Datura innoxia* Mill. and its synchronization. *Planta* 144, 7-12

Bleys A, Van Houdt H und Depicker A (2006) Down-regulation of endogenous mediated by transitive silencing signal. *RNA* 12, 1633-1639

Bock R (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J. Mol. Biol. 312, 425-438

Bogs J, Downey M, Harvey J Ashton A, Tanner G und Robinson S (2005) Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. Plant Physiol. 139, 652-663

Boscariol R, Almeida W, Derbyshire M, Mourao, Filho F und Mendes B (2003) The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck); Plant Cell Rep. 22, 122-128

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

Bradley L, Kim J und Matthyse A (1997) Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and Arabidopsis wound sites is correlated with the presence of a cell-associated, acidic polysaccharide. J. Bact. 179, 5372-5379

Braun A (1958) A physiological basis for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 344-349

Britsch L, Heller W und Griesbach H (1981) Conversion of flavanone to flavon, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. Z. Naturforsch. 36c, 742-750

Britsch L und Griesbach H (1985) Improved preparation and assay of chalcone synthase. Phytochem. 24, 1975-1976

Britsch L und Grisebach H (1986) Purification and characterisation of 2S-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. Eur. J. Biochem. 156, 569-577

Britsch L, Ruhnau-Brich B und Forkmann G (1992) Molecular cloning, sequencing analysis, and in vitro expression of flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*. J. Biol. Chem., 267, 5380-5387

Britsch L, Dedio J, Saedler H und Forkmann G (1993) Molecular characterization of flavanone 3 β -hydroxylase. Eur. J. Biochem. 217, 745-754

Brouillard R (1983) The *in vivo* expression of anthocyanin colour in plants. *Phytochem.* 22, 1311-1323

Bundessortenamt, Hrsg. (2000) Beschreibende Sortenliste Topfazalee, Landbuch Verlag, Hannover

Chandler S (2003) Commercialization of genetically modified ornamental plants. *J. Plant Biotech.* 5, 69-77

Charity J, Holland L, Donaldson S, Grace L und Walter C (2002) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum-infiltration. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 70, 51-60

Cheng Z-M, Schnurr J und Kapaun J (1998) Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports* 17, 646-649

Chilton M-D, Drummond M, Merlo D und Sciaky D (1978) Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature* 275, 147-149

Chilton M, Drummond M, Merlo M, Sciaky D, Montoya A, Gordon M und Nester E (1977) Stable incorporation of plasmids DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11, 263-271

Cloudot A und Drouet A (1992) Preparation and assay of chalcone synthase from walnut tree tissue. *Phytochem.* 32, 3377-3380

Costa M, Nogueira F, Figueira M, Otoni W, Brommonschenkel S und Cecon P (2000) Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports* 19, 327-332

Crowden R (1982) Pseudobase of malvidin 3-rhamnoside-5-glucoside in am mutants of *Pisum sativum*. *Phytochem.* 21, 2989-2990

Crowden R und Jarman S (1976) Anthocynins in the genus *Erica*. *Phytochem* 15, 1796-1797

Cunningham F und Gantt E (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 557-583

- Dabin P und Bouharmont J (1983)** Application of in vitro cultures in azalea (*Rhododendron simsii* Planch.). Acta Hort. 131, 89-93
- Dale E und Ow D (1991)** Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 23, 10558-10562
- Davies K, Bloor S, Spiller G und Deroles S (1998)** Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*. Plant J. 13, 259-266
- Davies K, Bradley J, Schwimm K, Markham K und Podivinsky E (1993)** Flavonoid biosynthesis in flower petals of five lines of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Grise.) Plant Sci. 95, 67-77
- Davies K, Schwinn K, Deroles S, Manson D, Lewis D, Bloor S und Bradley J (2003)** Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. Euphytica 131, 259-268
- De Carolis E und De Luca V (1994)** 2-Oxoglutarate-depent dioxygenase and related enzymes: biochemical characterization. Phytochem. 36, 1093-1107
- De Carvalho F, Gheysen F, Kushir S, Van Montagu M, Inzé D und Castresna C (1992)** Suppression of β -1,-glucanase transgene expression in homozygous plants. EMBO J 11, 2595-2602
- De Cooman L, Everaert E, Faché P, Vande Castele K und Van Sumere C (1993)** Flavonoid biosynthesis in petals of *Rhododendron simsii*. Phytochem. 33, 1419-1426
- Degenhardt J, Poppe A, Montag J und Szankowski I (2006)** The use of phosphomannose-isomerase selection system to recover transgenic apple plants. Plant Cell Rep. 25, 1149-1156
- Dellus V, Heller W, Sandermann H und Scalbert A (1997)** Dihydroflavonol 4-reductase activity in lignocellulosic tissues. Phytochem. 45, 1415-1418
- Depicker A und Van Montagu M (1997)** Post-transcriptional gene silencing in plants. Curr. Opin. Cell Biol. 9, 373-382
- Depicker A, Van Montagu M und Schell J (1978)** Homologous sequences in different Ti plasmids are essential for oncogenicity. Nature 275, 150-152

De Loose R (1969) The flower pigments of the belgian hybrids of *Rhododendron simsii* and other species and varieties from *Rhododendron* subseries obtusum. *Phytochem.* 8, 253-259

De Loose R (1970) Flavonoid glycosides in the petals of some *Rhododendron* species and hybrids. *Phytochem.* 9, 875-879

De Loose R (1979) Characterisation of *Rhododendron simsii* Planch. cultivars by flavonoid and isoenzyme markers. *Scientia Horticulturae* 11, 175-182

De Schepper S (2001) Molecular analysis of the induction of sports in azalea (*Rhododendron simsii*). PhD-thesis, Universiteit Gent

De Schepper S, Leus L, Mertens M, Depergh P, Van Bockstaele E und De Loose M (2001) Somatic polyploidy and its consequences for flower coloration and flower morphology in azalea. *Plant Cell Rep.* 20, 583-590

De Vlaming p, Schram A und Wiering H (1983) Genes affecting flower colour and pH of flower limb homogenates in *Petunia hybrida*. *Theor. Appl. Genet.* 66, 271-278

Dixon R, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy M und Wang L. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Mol. Plant Path.* 3, 371-390

Dixon R, Xie D-Y und Sharma S (2005) Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* 165,9-28

Droog F, Hooykaas P und Van der Zaal B (1995) 2,4-Dichlorphenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxon-regulated type III tobacco glutathione S-Transferases. *Plant Physiol.* 107, 1139-1146

Dunemann F, Illgner R und Stange I (2002) Transformation of *Rhododendron* with genes for abiotic stress tolerance. *Acta Hort.* 572, 113-118

Duprè P, Lacoux J, Neutelings G, Mattar-Laurrain D, Fliniaux M-A, David A und Jacquin-Dubreuil A (2000) Genetic transformation of *Ginkgo biloba* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiologia Plantarum* 108, 413-419

Dürrenberger F, Crameri A, Hohn B und Koukolikova-Nicola Z (1989) Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9154-9158

Duy D (2004) Anthocyanidin-Reduktase – Enzymatische Untersuchungen beim Tee, Apfel und weiteren Nutzpflanzen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU München/Weißenstephan

De Vlaming P, Schram A und Wiering H (1983) Genes affecting flower colour and pH of flower limb homogenates in *Petunia hybrida*. Theor. Appl. Genet. 66, 271-278

Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E und Yamakado M (1997) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2117-2121

Economou A und Read P (1984) *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas. Hortscience 19 (1), 60-61

Eckhaut T, De Keyser E, Van Huylenbroeck J, De Riek J und Van Bockstaele E (2007) Application of embryo rescue after interspecific crosses in the genus *Rhododendron*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. online DOI 10.1007/s11240-007-9209-4

Elsherif T (2000) Genetik und Enzymologie der Bildung außergewöhnlicher Anthocyanidin-Muster in Blüten höherer Pflanzen. Dissertation TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

Feucht W, Treutter D und Polster J (2004) Flavanol binding of nuclei from tree species. Plant Cell Rep. 22, 430-436

Flavell R, Parce S und Kumar A (1994) Plant transposable elements and genome. Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 838-844

Forkmann G, Heller W und Grisebach H (1980) Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*, flavanone 3 and 3'-hydroxylase. Z. Naturforsch. 35c, 691-695

Forkmann G (1991) Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. Plant Breed. 106, 1-26

Forkmann G und Heller W (1999) Biosynthese of flavonoids. In: Comprehensive Natural Products Chemistry (U. Sankawa). Elsevier, Amsterdam, 714-748

Forkmann G, Heller W und Grisebach H (1980) Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*, flavanone 3 and 3'-hydroxylase. Z. Naturforsch. 35c, 691-695

Forkmann G und Martens S (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoid. Curr. Opin. Biotech. 12, 155-166

Forkmann G und Strotz G (1981) Genetic control of flavanone 3-hydroxylase and flavonoid 3'-hydroxylase in *Antirrhinum majus*. Z. Naturforsch. 36c, 411-416

Fraser P und Bramley P (2004) The biosynthesis and nutritional use of carotenoids. Progress in Lipid Research 43, 228-265

Friesner J und Britt A (2003) Ku80 and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. Plant J. 34, 427-440

Fritsch H und Grisebach (1975) Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Phytochem. 14, 2437-2442

Froemel S, de Vlaming P, Stock G, Wiering H, Forkmann G und Schram A (1985) Genetic and biochemical studies on the conversion of the flavanones to dihydroflavonols in flowers of *Petunia hybrida*. Theor. Appl. Genet. 70, 561-568

Gelvin S (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 51, 223-256

Gensheimer M und Mushegian A (2004) Chalcone isomerase family and fold: no longer unique to plants. Protein Sci. 13, 540-544

Goldsbrough A, Lastrella C und Yoder J (1993) Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. Biotechn. 11, 1286-1292

Gorbunova V und Levy A (1999) How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. Trends Plant Sci. 4, 263-269

Gorbunova V und Levy A (2000) Analysis of extrachromosomal Ac/Dc transposable elements. *Genet.* 155, 349-359

Goto T und Kondo T (1991) Struktur und molekulare Stapelung von Anthocyanen-Variation der Blütenfarben. *Angew. Chem. Int. Ed.* 30, 17-33

Griesbach R (1984) Effects of carotnoid-anthocyanin combinations on flower color. *The Journal of Heredity* 75, 145-147

Grotewold E (2006) The Genetics and Biochemistry of floral Pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 761-780

Hagmann M-L, Heller W und Grisebach H (1983) Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3'-hydroxylase from parsley cell cultures. *Eur. J. Biochem.* 134, 547-554

Hahlbrock K, Wong E, Schill L und Griesbach H (1970) Comparison of chalcon-flavone isomerase heterozymes and isoenzymes. *Phytochem.* 9, 949-958

Haldrup A, Petersen S und Okkels F (1998) The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* allows effective selection of transgenic plant cell using D-xylose as the selective agent. *Plant Mol. Biol.* 37, 287-296

Hannon G (2002) RNAinterference. *Nature* 418, 244-251

Hansen G, Das A und Chilton M-D (1994) Constitutive expression of the virulence genes in improves efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7603-7607

Hansen G, Shillito R und Chilton M-D (1997) T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 11726-11730

Hanson B, Eagler D, Moy Y, Newman B, Ralston E und Guterson N (1999) A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J.* 19, 727-734

Harborne J (1967) Comparative biochemistry of flavonoid – IV. *Phytochem.* 6, 1415-1428

Harborne J (1976) Function of flavonoids in plants. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments (T.W. Goodwin) Academic Press, New York, 736-778

Harborne J (1978) the rare flavone isoetin as a yellow flower pigment in *Heywoodiella oligocephala* and in other chichorieae*. Phytochem. 17, 915-917

Heller W., Britsch L., Forkmann G und Grisebach H (1985b) Leucoanthocyanidins as intermediates in anthocyanidin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana* R. BR..Planta 163, 191-196

Heller W, Forkmann G, Britsch L und Grisebach I (1985a) Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to flavan-3,4-cis-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis. Planta 165, 284-287

Helmich S (2005) Konkurrierende Schritte in der Flavonoidbiosynthese der Azaleen (*Rhododendron simsii*). Masterarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU München/Weißenstephan

Hemleben V, Dressel A, Epping B, Lukacin R, Martens S und Austin M (2004) Characterization and structural features of chalcone synthase mutation in white-flowering line of *Matthiola incana* R. Br. (Brassicaceae) Plant Mol. Biol. 55, 455-465

Herles C, Braune A und Blaut M (2004) First bacterial chalcone isomerase isolated from *Eubacterium ramulus*. Arch. Microbiol. 181, 428-434

Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Curr. Opin. Plant Biol. 4, 210-218

Hobbs S, Kpodar P und DeLong C (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. Plant Mol. Biol. 15, 851-864

Hobbs S, Warkentin T und DeLong C (1993) Transgene copy number can positively or negatively associated with transgene expression. Plant Mol. Biol. 21, 17-26

Holford P und Newbury (1992) The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. Plant Cell Rep. 11, 93-96

Holton T, Brugliera F, Lester D, Tanaka Y, Hyland C, Menting J, Lu C-Y, Farcey E, Stevenson T und Cornish E (1993a) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366, 276-279

Holton T, Brugliera F und Tanaka Y (1993b) Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J* 4, 1003-1010

Holton T und Cornish E (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7, 1071-1083

Hong V und Wrolstad E (1990) Use of HPLC separation / photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J Agr. Food Chem.* 38, 708-715

Horn W (1968) Genetische Ursachen der Variation bei Zierpflanzen. *Gartenbauwissenschaften* 33, 317-333

Horn W (1973) Sports bei Azaleen. *Gartenwelt* 73, 80

Horn W (1996) Zierpflanzenbau. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien

Horsch R, Frey J, Hoffman N, Eichholtz D, Rogers S und Fraley R (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231

Hoshino A, Abe Y, Saito N, Inagaki Y und Iida S (1997) The gene encoding flavanone 3-hydroxylase is expressed normally in the pale yellow flowers of the Japanese morning glory carrying the *speckled* mutation which produce neither flavonol nor anthocyanin but accumulate chalcone, aurone and flavanone. *Plant Cell Physiol.* 38, 970-974

Hrazdina G, Wagner G Siegelmann H (1978) Subcellular localization of enzymes of anthocyanin biosynthesis in protoplasts. *Phytochem.* 17, 53-56

Huits H, Gerats A, Kleilke M, Mol J und Koes R (1994) Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *Plant J.* 6, 295-310

Imani J, Berting A, Nitsche S, Schaefer S, Gerlich W und Neumann K-H (2002) The integration of major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell

suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 71, 157-164

Jackson D, Roberts K und Martin C (1992) Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 2, 425-434

Jefferson R, Kavanagh T und Bevan M (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6, 3901-3907

Jez J, Bowman M, Dixon R und Noel R (2000) Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature structural biology* 7, 786-791

Joersbo M, Donaldson I, Kreibrg J, Petersen S, Brunstedt J und Okkels F (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.* 4, 111-117

Jorgensen R, Cluster P, English J, Que Q und Napoli C (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.* 31, 957-973

Junghans H, Dlakín K und Dixon R (1993) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) and expression patterns of members of a subset of the chalcone synthase multigene family. *Plant Mol. Biol.* 22, 239-253

Kamsteeg J, Brederode J und Nigtevecht G (1980) Genetical and biochemical evidence that the hydroxylation pattern of the anthocyanin B-ring in *Silene dioica* is determined at the p-coumaroyl-coenzyme A stage. *Phytochem.* 19, 1459-1462

Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M und Angenon G (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122, 101-108

Kilby N, Davies G und Snaith M (1995) FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *Plant J.* 8, 637-652

Knapp J, Kausch A, Auer C und Brand M (2001) Transformation of *Rhododendron* through microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 20, 749-754

Knott J (2004) Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rosen und Kartoffeln. Dissertation TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

Koes R, Quattocchio R und Mol J (1994) The flavonoid biosynthesis pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* 16, 123-132

Köhler F, Cardon G, Pöhlman M, Gill R und Schieder O (1989) Enhancement of transformation rates in higher plants by low dose irradiation: are DNA repair system involved in the incorporation of exogenous DNA into plant genome? *Plant Mol. Biol.* 12, 189-199

Kooter J, Matzke M und Meyer P (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* 4, 166-171

Kreuzaler F und Hahlbrock K. (1972) Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5,7,4'-Trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A, *FEBS Letters* 28, 69-72

Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E, Kuhn D und Hahlbrock K (1983) UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80, 2591-2593

Kuhn B, Forkman G und Seyfert W (1978) Genetic control of chalcon-flavanon isomerase activity in *Callistephus chinensis*. *Planta* 1978, 199-203

Kunze I, Ebner M, Heim U, Geiger M, Sonnewald U und Herbers K (2001) 2-Deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. *Mol. Breed.* 7, 221-227

Larsen E, Alfenito M, Briggs W und Walbot V (2003) A carnation anthocyanin mutant is complemented by glutathione S-transferases encoded by maize *Bz2* and petunia *An9*. *Plant Cell Rep.* 21, 900-904

Larson R und Coe E (1968) Enzymatic action of the Bz anthocyanin factor in maize. *Proc. XII Int. Congr. Genet., Tokyo, Japan*

- Leifert C, Camotta H und Waites W (1992)** Effects of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 29, 153-160
- Li H (2003)** Tissue culture and genetic transformation of *Torenia*; Masterarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU München/ Weihenstephan
- Ling H-Q, Kriseleit D und Ganai M (1998)** Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Reports* 17, 843-847
- Lloyd G und McCown (1980)** Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int. Plant. Prop. Soc. Proc.* 30, 421-427
- Loomis W und Battaille J (1966)** Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.* 5, 433-438
- Lucca P, Ye X und Potrykus I (2001)** Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent; *Mol. Breed.* 7, 43-49
- Lukacin R und Britsch L (1997)** Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 249, 748-757
- Lutz K und Maliga P (2007)** Construction of marker-free transplatic plants. *Curr. Opin. Biotech.* 18, 1-8
- Mahmoudian M, Yücel M und Öktem H (2002)** Transformation of Lentil (*Lens culinaris* M) cotyledonary nodes by vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20, 251-257
- Maliga P (2001)** Engineering the plastid genome of higher plants, *Curr. Opin. Plant Biotech.* 5, 164-172
- Mansour S, Amin I, Hussain M, Zafar Y und Briddon R (2006)** Engineering novel traits in plants through RNA interference. *Trends Plant Sci.* 11, 559-565

Marrs K (1996) The function and regulation of glutathione S-transferase in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158

Marrs K, Alfenito M Lloyd A und Walbot V (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375, 397-4000

Martens S, Teeri T, Forkmann G (2002) Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductase from various plants. *FEBS* 531, 453-458

Martin C, Prescott A, Mackay J, Bartlett E und Vrijlandt E (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1, 37-49

Mato M, Onozaki T, Ozeki Y, Higeta D, Itoh Y, Yoshimoto Y, Ikeda H, Yoshida H und Shibata M (2000) Flavonoid biosynthesis in white-flowered Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Scientia Horticulturae* 84, 333-347

Matzke M, Matzke A und Kooter J (2001) RNA guide gene silencing. *Science* 293, 1080-1083

Matzke M, Mette M und Matzke A (2000) Transgenic silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanism in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.*, 43, 401-415

Matzke M, Mittelsten-Scheid O und Matzke A (1999) Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *BioEssays* 21, 761-767

McCown B und Lloyd G (1983) A survey of the response of *Rhododendron* to *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2, 77-85

Mertens M, Heursel J und De Loose (1997) Genetic transformation of *Rhododendron simsii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 62/4a, 1483-1485

Mertens M, Heursel J, Van Bockstaele E und De Loose M (2000) Inheritance of foreign genes in transgenic azalea plants generated by agrobacterium-mediated transformation. *Acta Hort.* 521, 127-130

Mertens M, Werebrouck G, Samyn H, Botelho dos Santos Moreira da Silva H und Depergh P (1996) In vitro regeneration of evergreen azalea from leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45, 231-236

Meyer P, Heidmann I, Forkmann G und Saedler H (1987) A new *Petunia* flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330, 667-678

Meyer P und Saedler H (1996) Homology-dependent gene silencing in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 23-48

Mittelsten-Scheid O, Jakovleva L, Afsar K, Maluszynska J und Paszkowski J (1996) A change of ploidy can modify epigenetic silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7114-7119

Mittelsten-Scheid O und Paszkowski J (2000) Transcriptional gene silencing mutants. *Plant Mol. Biol.* 43, 235-241

Mol J, Grotewold E und Koes R (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends in plant science* 3, 212-217

Moustafa E und Wong E (1967) Purification and properties of chalcone-flavanone isomerise from soybean seed. *Phytochem* 6, 625-632

Murashige T und Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15, 473-497

Mysore K, Nam J und Gelvin S (2000) An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 948-953

Nadolsky-Orczyk A, Pietrusinska A, Binka-Wyrwa A, Kuc D und Orczyk W (2007) Diploid potato (*Solanum tuberosum* L.) as a model crop to study transgene expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 12, 206-219

Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K und Yamamura (2005) Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. *Plant Science* 169, 949-958

Nakayama T (2002) Enzymology of aurone biosynthesis. *J. Bioscience Bioengineering* 94, 487-491

Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Sato T, Kikuchi S, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Ueda T, Nakao M, Tanaka Y, Kusumi T und Nishino T (2000) Aureisidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* 290, 1163-1166

Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M und Kazuki Saito (2001) Reaction mechanism from leucoanthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 25797-25803

Nauerby B, Billing K und Wyndale R (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 123, 169-177

Negretto D, Jolley M, Beer S, Wenck S und Hansen G (2000) The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19, 798-803

Nishihara M, Nakatsuka T und Yamamura S (2005) Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. *FEBS Letters* 579, 6074-6078

Noiten D, Vine J und Mullins M (1986) Endogenous IAA and ABA in apple microcuttings in relation to adventitious root formation. *HortScience* 21, 706

Ogata J, Itoh Y, Ishida M, Yoshida H und Ozeki Y (2004) Cloning and heterologous expression of cDNAs encoding flavonoid glucosyltransferases from *Dianthus caryophyllus*. *Plant Biotech.* 21, 367-375

Omura T und Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2385

Ono E, Fukuchi-Mizutani M, Nakamura N, Fukui Y, Yonekura-Sakakibara K, Yamaguchi M, Nakayama T, Tanaka T, Kusumi T und Tanaka Y (2006) Yellow

flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. PNAS 103, 11075-11080

Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, Machida Y und Machida C (1995) Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 247, 653-660

Patton D und Meinke D (1988) High-frequency of plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep. 7, 233-237

Pavingerová D, Briza J, Kodytek K und Niedermeierová (1997) Transformation of *Rhododendron* spp. using *Agrobacterium tumefaciens* with a GUS-intron chimeric gene. Plant Sci. 122, 165-171

Pelletier M, Murrel J und Shirley B (1997) *Arabidopsis* flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase: further evidence for distinct regulation of "early" and "late" flavonoid biosynthetic genes. Plant Physiol. 113, 1437-1445

Pfeufer S (2006) Untersuchungen zur Optimierung des Transformationssystems bei *Rhododendron simsii*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU München / Weihenstephan

Pierik R (1997) *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande

Pierik R und Steegmans H (1975) Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. Scientia Hort. 3, 1-20

Plaschil S (1997) Vergleichende Untersuchungen zur histogenetisch bedingten Sternmusterbildung in der Petalenfärbung bei *Camellia* L., *Myosotis* L., *Pelargonium* L'HERIT., *Phlox* L., *Rhododendron* L., *Saintpaulia* H. WENDL., *Verbena* L. Vergleichende Untersuchungen zur histogenetisch bedingten Sternmusterbildung in der Petalenfärbung bei *Camellia* L., *Myosotis* L., *Pelargonium* L'HERIT., *Phlox* L., *Rhododendron* L., *Saintpaulia* H. WENDL., *Verbena* L. Dissertation an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät an der Humboldt-Universität zu Berlin

Pompon D, Louerat B, Bronne A und Urban P (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology* 272, 51-64

Preil W und Engelhardt M (1977) Meristem culture of azaleas (*Rhododendron simsii*). *Acta Hort.* 78, 203-208

Prescott A (1993) A dilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet). *J. Exp. Bot.* 44, 849-861

Prescott A und John P (1996) Dioxygenases: Molecular structure and role in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 245-271

Privalle L, Wright M, Reed J, Hansen G, Dawson J, Dunder E, Chang Y, Powell M und Meghji M (2000) Phosphomannose Isomerase, A Novel Selectable Plant Selection System: Mode of Action and Safety Assessment; In: Proceedings of the 6th International Symposium on The Biosafety of Genetically Modified Organisms, Saskatoon, Canada, University Extension Press, Univ. Saskatchewan, 171 – 178

Puchta H (2003) Marker-free transgenic plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74, 123-134

Qing C, Fan L, Lei Y, Bouchez D, Tourneur C, Yan L und Robaglia C (2000) Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. *Mol. Breed.* 6, 67-72

Quattrocchio F, Wing J, Leppen H, Mol J, und Koes R (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell* 5, 1497-1512

Rall S und Hemleben V (1984) Characterization and expression of chalcone synthase in different genotypes of *Matthiola incana*. *Plant Mol Biol.* 3 (1984) 137-145

Rhode B (2003) Chemische und biochemische Untersuchungen der Flavonoidbiosynthese bei verschiedenen Arten der *Ericaceae*n. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau TU München/ Weihenstephan

Richardson K, Maher D, McGibbon L, Sheridan R, Khan A und Ellison (2007) Cisgenic[®] approach to genetic transformation of forage. Beitrag auf der *International Conference Plant Transformation Technologies* vom 4-7 Februar 2007 in Wien, Österreich

Roach P, Clifton I, Hensgens C, Shibita N, Schofield C, Hajdo J und Baldwin J (1997) Structure of isopenicillinN synthase complexed with substrate and mechanism of penicillin formation. *Nature* 387, 827-830

Rommens C (2004) All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends Plant Sci.* 9, 457-464

Rommens C, Bougri O, Yan H, Humara J, Owen J, Swords K und Ye J (2005) Plant derived transfer DNAs. *Plant Physiol.* 139, 1338-1349

Saito K, Kobayashi M, Gong Z, Tanaka Y und Yamazaki M (1999) Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red form of *Perilla frutescens*. *Plant J.* 17, 181-189

Saito N, Cheng M, Ichimura M, Yokoi M, Abe Y und Honda T (1994) Flavonoid in the acyanic flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochem.* 35, 687-691

Sambrook J, Fritsche E und Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Samyn G, De Schepper S und Van Bockstaele E (2002) Adventitious shoot regeneration and appearance of sports in several azalea cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70, 223-227

Sato T, Nakayama T, Kikuchi S, Fukui Y, Yonekura-Sakakibara K, Ueda T, Nishino T, Tanaka Y und Kusumi T (2001) Enzymatic formation of aurones in the extracts of yellow snapdragon flowers. *Plant Sci.* 160, 229-236

Schilperoort R, Veldstra H, Warnaar S, Mulder G und Cohen J (1967) Formation of complexes from tobacco crown gall tumours and complementary to *Agrobacterium tumefaciens* DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 145, 523-525

Schneider F (2005) Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa sp.* L.) and globe artichoke (*Cyanara scolymus* L.). Dissertation TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

Schröder H, Schotz A, Wardley-Ricardson T, Spencer D und Higgins T (1993) Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) Plant Physiol. 101, 751-757

Seitz C (2000) Blütenfarben bei *Osteospermum* und Möglichkeiten zur züchterischen Beeinflussung. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau TU München/ Weihenstephan

Seitz C (2004) Klonierung und Charakterisierung von Flavonoidgenen aus *Osteospermum*. Dissertation am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau TU München/ Weihenstephan

Seitz C., Vitten M, Steinbach P, Hartl S, Hirsche J, Rathje W, Treutter D und Forkmann G (2007) Redirection of Anthocyanin synthesis in *Osteospermum* hybrida by a two enzyme manipulation strategy. Phytochem. 68, 824-833

Sheridan P und Mills (1998) Presence of proanthocyanidins in mutant green *Sarracenia* indicate Blockage in late anthocyanin biosynthesis between leucocyanidin and pseudobase. Plant Science 135, 11-16

Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Okinaka Y, Kiyokawa S und Kikuchi Y (1999) Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3',5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants. FEBS Lett. 461, 241-245

Siebert R und Puchta H (2002) Efficient repair of genomic double-strand breaks via homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. Plant Cell 14, 1121-1131

Small I (2007) RNAi revealing and engineering plant gene functions. Curr. Opin. Biotechn. 18, 1-16

Smith E und Townsend C (1907) A plant tumor of bacterial origin. Science 25, 671-673

Spribille R und Forkmann G (1981) Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of *Matthiola incana* R. Br. Z. Naturforschung 36c, 619-624

Spribille R und Forkmann G (1982) Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparations from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). Planta 155, 176-182

Stafford H (1994) Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. Plant Science 101, 91-98

Stafford H und Lester H (1982) Enzymatic and nonenzymatic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4-diol. Plant Physiol. 70, 695-698

Stafford H, Shimamoto M und Lester H (1982) Incorporation of [¹⁴C]phenylalanine into flavan-3-ols and procyanidins in cell suspension cultures of Douglas fir. Plant Physiol. 69, 1055-1059

Stam M, Mol J und Kooter J (1997) The silence of genes in transgene plants. Ann. Bot. 79, 3-12

Stich K, Eidenberger T, Wurst F und Forkmann G (1992a) Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). Planta 187, 103-108

Stich K, Eidenberger T, Wurst F und Forkmann G (1992b) Flavonol synthase activity and the regulation of flavonol and anthocyanin biosynthesis during flower development in *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). Z. Naturforsch. 47c, 14-21

Stich K und Forkmann G (1987) Enzymatic synthesis of 4'- and 3',4'-hydroxylated flavanones and flavones with flower extracts of *Sinningia cardinalis*. Z. Naturforsch. 42c, 1193-1199

Stotz G (1983) Enzymologie und Genetik der Oxidationsreaktion in der Flavonoidbiosynthese höherer Pflanzen. Dissertation 1983, Universität Tübingen, Lehrstuhl für Genetik

Stotz G, De Vlaming P, Wiering H, Schram A und Forkmann G (1985) Genetic and biochemical studies on flavonoid 3'-hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida*. Theor. Appl. Genet. 70, 300-305

Stotz G, Spribille R und Forkmann G (1984) Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena hybrida*. *Plant Physiol.* 116, 173-183

Strack D, Vogt T und Schliemann W (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochem.* 62, 247-269

Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F und Mason J (2005) Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 80, 1-24

Taubenböck S (2004) Biotechnologische und biochemische Untersuchungen an *Rhododendron simsii*-Hybriden. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU München / Weihenstephan

Teusch M (1986) Enzymologie und Genetik der Glycosidierungs- und Acylierungsreaktionen in der Flavonoid-Biosynthese höherer Pflanzen. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karl-Universität Tübingen

Todd R und Tague (2001) A versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19, 307-319

Tomsone S und Gertnere D (2003) In vitro shoot regeneration from flower and leaf explants in *Rhododendron*. *Biologica Plantarum* 46, 463-465

Tsuda S, Fukui Y, Nakamura N, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Ohira K, Ueyama Y, Ohkawa H, Holton TA, Kusumi T und Tanaka Y (2004) Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotech.* 21, 377-386

Tzfira T und Citovsky V (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 14-154

Tzfira T, Li J, Lacroix B und Citovsky V (2004) *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet.* 20, 375-383

Ueno K, Fukunaga Y und Arisumi K (1996) Genetic transformation of *Rhododendron* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 16, 38-41

- Van Blokland R, Van der Gees N, Mol J und Kooter J (1994)** Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* 6, 861-877
- Van Larebeke N, Enbler G, Holsters M, Van Den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort R und Schell J (1974)** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170
- Vergauwe A, Van Geldre E, Inzé D, Van Montagu und Van den Eeckhout E (1996)** The use of amoxicillin and ticarcillin in combination with a β -lactamase inhibitor as decontaminating agents in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia anna* L. *J. Biotechn.* 52, 89-95
- Villemont E, Dubois F, Sangwan R, Vasseur G, Bourgeois Y und Sangwan-Norrel B (1997)** Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* 201, 160-172
- Vogel H, Hrsg. (1982)** Azaleen, Eriken, Kamelien. Parey, Berlin
- Wada E (1956)** On a flavonol glycoside isolated from flowers of a white azalea (*Rhododendron mucronatum* G. Don). *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4725-4726
- Wang H-M und To K-Y (2004)** *Agrobacterium*-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea*. *Plant Sci.* 166, 1087-1096
- Wenck A, Czakó M, Kanevski I und Márton L (1997)** Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 34, 913-922
- Williams C und Grayer R (2004)** Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21, 539-73
- Winkelmann T, Geier T und Preil W (2006)** Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 86, 319-327
- Winkel-Shirley B. (1999)** Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* 107, 142-149

Wolffe A und Matzke M (1999) Epigenetics: Regulation through repression. *Science* 286, 481-486

Wright M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Reed J, Kramer C, Chang Y, Novitzky R, Wang H und Artim-Moore L (2001) Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker; *Plant Cell Rep.* 20, 429 – 439

Xie D-Y, und Dixon R (2005) Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochem.* 66, 2127-2144

Xie D-Y, Sharma S und Dixon R (2004) Anthocyanidin reductase from *Medicago truncatula* und *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 91-102

Xie D-Y, Sharma S, Paiva N Ferreira D und Dixon R (2003) Role of anthocyanidin reductase encoded by *BANYULS* in plant flavonid biosynthesis. *Science* 299, 396-399

Yepes L und Aldwinckle H (1994) Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 37, 257-269

Yoshida H, Itoh Y, Ozeki Y, Iwashina T und Yamaguchi M (2004) Variation on chalconaringenin 2'-O-glucoside content in the petals of carnations (*Dianthus caryophyllus*) bearing yellow flowers. *Sci. Hort.* 99, 175-186

Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemanns L, Van Montagu M und Schell J (1983) Ti plasmid vector für the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150

Zaprometov M und Grisebach (1973) Dihydroflavonols as precursors for catechins in the tea plant. *Z. Naturforsch.* 28, 113-115

Zimmermann T (1995) Effect of timentin for controlling *Agrobacterium tumefaciens* following cocultivation on select plant species. *In vitro Cell Dec. Biol.* 31, 70A

G Anhang

G.1 Übersicht der Ergebnisse der analytischen Blütenuntersuchungen

Tab. G1: Ergebnisse der Blüteninhaltsstoffanalysen des zur Verfügung gestellten Sortiments

Sorte	Farbe	Km	Qu	My	Cat	EC	EGC	Cy	Pn	Dp	Mv	Pg
'Anastasia'	rot	0	+++	0	+	++	0	++	++	0	0	0
'Ballerina'	weiß	0	+++	0	+	++	0	+	+	0	0	0
'Helmut Vogel'	rot	0	+++	0	+	++	0	+++	++	0	0	0
'Inka'	rosa	0	+++	0	+	++	0	+++	+	0	0	0
'Mevrouw Edmond Troch'	weiß	0	+++	0	+	+++	0	+	0	0	0	0
'Mevrouw Gerard Kint' bunt	rot mit weißem Rand	0	++	0	+	++	0	++	+	0	0	0
'Mevrouw Gerard Kint' weiß	weiß	0	++	0	+	++	0	+	+	0	0	0
'Nordlicht'	rot	0	+++	0	+	+++	0	+++	++	0	0	0
'Petrick'	rot	0	+++	0	+	++	0	+++	++	0	0	0
'Polarstern'	weiß	0	+	0	+	++	0	+	0	0	0	0
'Rosa'	hellrosa	0	+++	0	+	++	0	++	+	0	0	0
'Sachsenstern'	rot mit weißem Rand	0	+	0	+	+++	0	++	++	0	0	0
'Schneekönigin'	weiß	0	+++	0	0	++	0	+	0	0	0	0
'Winterperle'	weiß	0	+++	0	+	+++	0	+	0	0	0	0

0 = kein Nachweis

+ = schwacher Spot

++ = deutlicher Spot

+++ = kräftiger Spot

Tab. G2: Ergebnisse der Blüteninhaltsstoffanalysen des Sortiments des Azaleenmuseums I

Sorte	Farbe	Km	Qu	My	Cat	EC	EGC
'Adonia'	violett	0	+++	++	++	+++	0
'Adrien Steyert'	violett	0	++	+++	+	++	0
'Anton'	weiß	0	+++	++	+	++	+
'Avenir Alba'	weiß	0	+	0	0	+++	0
'Delicatesse'	weiß	0	++	0	+	++	0
'Gloria'	weiß	0	+	0	+	++	0
'Herme'	weiß	0	+++	0	+	++	0
'Irish Lace'	weiß	0	+++	0	+	+++	0
'Laima'	weiß	0	+	+	+	++	+
'Madame A. Haerens alba rosea'	weiß	0	+	0	+	+++	0
'Madame Boullard'	weiß	0	+	0	+	++	0
'Madame Marcel de Paepe'	weiß	0	+	0	+	++	0
'Madame Papi'	weiß	0	+	0	+	+++	0
'Madame Wibier'	weiß	0	+++	0	+	+++	0
'Mareyke'	weiß mit violetten Sprenklen	0	++	0	+	+++	+
'Niobe'	weiß	0	+++	0	+	++	0
'Paloma'	weiß	0	+++	0	++	+++	0
'Pax'	weiß	0	+	0	+	++	0
'Perle de Saffelaere'	weiß	0	++	0	0	++	0
'Perle de Swynaerde'	weiß	0	+	0	0	++	0
'Petrick Alba'	weiß	0	+++	0	+	++	0
'Picollo'	violett	0	+++	+++	+	++	+
'Polarstern'	weiß	0	+	0	0	+	0
'Prinzess Josephine Charlotte'	weiß	0	+++	0	+	++	0
'Regina'	weiß	0	+	0	+	++	0
'Rema'	violett	0	+++	++	+	++	+
'Rigolletto'	weiß	0	+++	0	+	++	0
'Sakuntala'	weiß	0	+++	+	+	++	0
'Thea'	weiß	0	++	0	++	+++	0
'Timo'	weiß	0	+	0	+	++	0
'Vervaena Alba'	weiß	0	+	0	+	++	0
'Weiße Schäme'	weiß	0	+	0	+	++	+

0 = kein Nachweis

+ = schwacher Spot

++ = deutlicher Spot

+++ = kräftiger Spot

Tab. G3: Ergebnisse der Blüteninhaltsstoffanalysen des Sortiments des Azaleenmuseums II

Sorte	Farbe	EC
'Coelentine White'	weiß	v
'Columba'	weiß	v
'Dame Blanche'	weiß	v
'Loelia'	weiß	v
'Mademoiselle Louise Cuvelier'	weiß	v
'Schnee'	weiß	v
'Tendresse'	weiß	v
'Tukuma Perle'	weiß	v
'Weißer Hirsch'	weiß	v
'White Hexe'	weiß	v
'White Lady'	weiß	v
'Whitewater'	weiß	v

v = vorhanden (Menge nicht quantitativ abgeschätzt)

G.2 Nukleotidsequenzen und offener Leserahmen der *full length* cDNA-Klone und cDNA-Fragmente

Putative Flavanon-3 β -Hydroxylase

GGAGAAGCTCCGGTTCGAAATGTCCGGGGGAAAGAAGGGTGGGTTTCATCGT 51
FHT5'1→
 E K L R F E M S G G K K G G F I V 17
 GTCCAGTCATCTTCAGGGGAAGCAGTGCAAGACTGGAGGGAAATAGTGAC 102
 S S H L Q G E A V Q D W R E I V T 34
 CTACTTCTCATACCCAATCCGGGCCCGAG**GACTACTCAAGATGGCCCGACAA** 153
FHT5'3→
 Y F S Y P I R A R D Y S R W P D K 51
 GCCAGACGGTTGGAGGGCTGTTACGGAGTCCTACAGTGAGAATTTAATGGG 204
 P D G W R A V T E S Y S E N L M G 68
 TCTGGCCTGTAAGTTGCTGGGGGTTTTATCTGAGGCTATGGGCCTTGAGAC 255
 L A C K L L G V L S E A M G L E T 85
 CGAGGCTCTAACAAATGCCTGTGTTGATATGGACCAGAAAGTGGTGGTCAA 306
 E A L T N A C V D M D Q K V V V N 102
 TTTCTACCCGAAATGCCACAACCCGACCTCACTCTCGGCCTCAAGCGACA 357
 F Y P K C P Q P D L T L G L K R H 119
 CACGGATCCGGGTACCATAACCCCTGTTGCTTCAGGACCAGGTTGGTGGGTT 408
 T D P G T I T L L L Q D Q V G G F 136
 CCAGGCCACTAGAGATGGTGGAAAGACTTGGATCACGGTTCAGCCCATTGA 459
 Q A T R D G G K T W I T V Q P I E 153
 AGGAGCTTTTTGTTGTCAATTTGGGCGACCATGGTCATTATCTAAGCAACGG 510
 G A F V V N L G D H G H Y L S N G 170
 GAGGTTCAAGAACGCGGATACCAAGCAGTGGTGAACCTCAACTACAGCCG 561
 R F K N A D H Q A V V N S N Y S R 187
 ACTGTCGATCGCCACGTTCCAGAATCCAGCCCCTGAGGCAACAGTGTACCC 612
 L S I A T F Q N P A P E A T V Y P 204
 TTTGAAGATCAGGGAGGGAGAGAAGCCAGTTCTGGACGGGCCAATGACGTT 663
 L K I R E G E K P V L D G P M T F 221
 CATGGAGATGTATAAGAAGAAGATGAGCAAGGATCTTGAGCTTGCAAGGTT 714
 M E M Y K K K M S K D L E L A R L 238
 GAAGAACTGGCCAAAGAGAAAAGTCTTGAGGAGCAAGAACTGGAGAAGGC 765
 K K L A K E K V L E E Q E L E K A 255
 CAAAGGAGTCGAAGGGATTTTTGCT**TAG**AACTAGTTCAGTGTGTTGAGTGT 816
 K G V E G I F A * 263
 TGATACCACGGTGTGGATGATGCATTTCAAAATTCTAAGTGATTGGTTGGC 867

 TAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCGACATCGATACGCGTGGTC 906

fett = Primer, → forward Primer; ← reverse Primer
TAG = Stopcodon

Anthocyanidinreduktase

```

>ANS_'Nordlicht' rot 25..1083 of trace file
GCGTTACGCTATTTTCGGGGCGCAACAAATCGCAAATGGTGACTACAATGGTG 51
  ANSforw →
                                     M V T T M V 6
GCCCCGAGTCGCGTAGAAAGCCTTGCCAGCAGCGGGATCCAATCCATCCCC 102
A P S R V E S L A S S G I Q S I P 23
AAGGAGTACGTGAGGCCTCAGGAGGAGCTCACGAGCATCGGAAACATCTTC 153
K E Y V R P Q E E L T S I G N I F 40
GAGGAGGAGAAGAAACACGAGGGGCTCAGGTGCCGACCATCGACTTCGAA 204
E E E K K H E G P Q V P T I D F E 57
GACTTGGTTTTTCAGAGGACAAAGAGGCGAGAGAGAGATGCCACGAGGCGCTG 255
D L V S E D K E A R E R C H E A L 74
AAGAAGGCGGCGTCCGAGTGGGGCGTGATGCACCTGGTGAACCACGGCGTC 306
K K A A S E W G V M H L V N H G V 91
CCCGAGGAGCTGATGGACAGGGTCAGGGTGGCCGGAGAAGGGTTTTTCAAT 357
P E E L M D R V R V A G E G F F N 108
CAGCCGGTGGAGGAGAAGGAGAAGTATGCCAATGATCACGCTTCCGGGAAT 408
Q P V E E K E K Y A N D H A S G N 125
ATCCAGGGGTATGGAAGCAAACCTCGCAAACAATGCTAGCGGGCAGCTGGAG 459
I Q G Y G S K L A N N A S G Q L E 142
TGGGAGGACTATTTTTTCCACCTTGTTTACCCCCGAGGACAAGCGGGACATG 510
W E D Y F F H L V H P E D K R D M 159
AAGATTTGGCCCAAGAATCCGTCGACTACATCCCGGCGACAAGTGAGTAC 561
K I W P K N P S D Y I P A T S E Y 176
GCCAAGCACCTGAGAGGCCTAACCCACCAAGGTCTTATCGGCCCTCTCGCTC 612
A K H L R G L T T K V L S A L S L 193
TGCTTGGGATTGAAAGAAGACAGGCTAGAAAACAGAAGTTGGCGGAAAAGGAC 663
C L G L K E D R L E T E V G G K D 210
GAACTCCTCATCCAGATGAAAATCAACTACTACCCGAAATGCCCTCAGCCG 714
E L L I Q M K I N Y Y P K C P Q P 227
GAGCTCGCCCTGGGCGTCGAGGCCCACACCGACGTAAGCGCCCTCACCTTC 765
  ←ANSrevnested
E L A L G V E A H T D V S A L T F 244
ATCCTCCACAACATGGTTCCCGGCCTGCAGCTCTTCTACGAGGGCAAATGG 816
I L H N M V P G L Q L F Y E G K W 261
ATCACGGCGAAATGCGTCCCGAACTCCATCATAATGCACATCGGCGACACG 867
  ←ANSrevA
I T A K C V P N S I I M H I G D T 278
GTCGAGATTCTGAGCAACGGGAAGTACAAGAGCATCCTCCACAGGGGGCTC 918
V E I L S N G K Y K S I L H R G L 295
GTCAACAAGGAAAAGGTGAGGATCTCATGGGCGGCTTTCTGCGAGCCGCCC 969
V N K E K V R I S W A A F C E P P 312
AAGGAGAAGATCATCCTGAAGCCGCTCCCGGAGACGGTCTCGGAGACCGAG 1020
K E K I I L K P L P E T V S E T E 329
CCGGCGCTGTACCCGCGCGCACCTTTTTCGCAGCACATCGAGCACAAGTTG 1071
P A L Y P P R T F S Q H I E H K L 346
TTCAGGAAGACCCAGGAACTCAACGGGGCTAAATTGAGTGGTCAATCGGCCG 1122
F R K T Q E L N G A K * 357
GTGATCATGGTCTACAGTTAGTGCTGGATGAGTGCATCTTATACCAATTA 1173
AGTTTTTTTCGTTGGATGTGGTACTGTTATTTTTTGGTTGGTTTTTGGTCTTCT 1224
TGGGGAACTTTAATTATGGGAGGTACGTAAATATTGGGCATAATGTTGTAT 1275
TCGTCTGATCGATCTATTGCGTCTCGATCTTAATTTGCTTGCCTTCTTTCA 1326
  ←ANS\\rev
ATAAAACCAGTCCGCTGCTAAAAAAGTTCGACATCGATACGC 1377
GTGGTCAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGA 1428
GCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGA 1478
fett = Primer, → forward Primer; ← reverse Primer
ATG = Startcodon TGA = Stopcodon
Sequenz, die als Ausgangsfragment aus Masterarbeit (Helmich, 2005) vorlag

```

G.3 Übersicht der verwendeten Primer

Tab. G4: Übersicht der verwendeten Primer

Name	Nucleotidsequenz
pYes-for	5'-CCC GGA TCG GAC TAC TAG CAG
pYes-rev	5'-CCT CTA GAT GCA TGC TCG AG
Topo-for	5'-AGCTCGGATCCACTAGTAACG
Topo-rev	5'-CCTCTAGATGCATGCTCGAG
Oligo-dT-Anchor	5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TT(AGC)
AP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AAG TTA CT (17)
ANS1	5'-CGG GAC ATG AAG ATT TGG CCC
ANS2	5'-GGA CGA ACT CCT CAT CCA GAT G
ANS\\rev	5'-CGT CTT GAT CGA TCT ATT GCG TCC
ANSforw	5'-GCG TTA CGC TAT TTC GGG
ANSrevA	5'-GGG CGC TTA CGT CGG TGT GGG
ANSrevnested	5'-GGT GAT CAT GGT CCT AC
CHI5'4	5'-GGT CCC TTT GAG AAA TTC AC
CHI3'4	5'-CGA TTC CAA CAC CGC TTC CG
5'CHS1	5'-CAC CGT CGA GGA TGT CAG GAG G
3'CHS2	5'- AGC ACG TGC CTC GTG GCC CG
FHT3'4	5'-CAT TCT TGA ACC TCC CAT TGG
FHT5'1	5'-GGA GAA GCT CCG GTT CGA NAT G
FHT5'3	5'-GAC TAC TCA AGG TGG CCC G
5'DFR1	5'-GTC AAT GGT TCG CCC GCC ACC
3'DFR2	5'-GAG TAG GGA AGC AAT CCC TTC TCC

Die Nomenklatur der Basen entspricht der IUPAC-IUB Vereinbarung von 1969

G.4 Übersicht der Versuche zur Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur

Tab. G5: Versuche zur Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur I

Versuchsnummer	Sorte	verwendete Gewebeart	Herkunft	Anzahl Expl.	Nährmedium	Phytohormone	Kulturgefäße	Ergebnis
E1	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Ballerina • Darius • Gitti • Heidi • Mme d Waele • Melanie • Polarstern • Sachsenstern • Schneekönigin' • Winterperle 	<ul style="list-style-type: none"> • Triebspitzen • Austriebe mit 1 bis 2 Nodi 	Gewächshaus	660	Anderson (1984)	2 mg/l Zea 1 mg/l IAA	Reagenzgläser mit Glasdeckel	<ul style="list-style-type: none"> • 70 – 80% der angelegten Explantate bildeten subkultivierbare Sprosse aus • 2 Monate nach Versuchsbeginn Abnahme der neu ausgebildeten Sprosse zur Weitervermehrung in vitro (siehe Versuch E2)
E2	siehe E1	<i>in vitro</i> -Sprosse	Gewebekultur (Versuch E1)	507	Anderson (1984)	2 mg/l 2iP 1 mg/l IAA	Reagenzgläser mit Glasdeckel	<ul style="list-style-type: none"> • bei keiner Sorte Bildung von Neuaustrieben bzw. Seitenaustrieben • ca. 2 Monate nach Versuchsbeginn Absterben der Sprosse bei 5 Sorten (Darius, Mme de Waele, Heidi, Melanie, Sachsenstern)
E3*	<ul style="list-style-type: none"> • Polarstern • Rosa • Schneekönigin' • Winterperle 	<ul style="list-style-type: none"> • Triebspitzen • Austriebe mit 1 bis 2 Nodi 	Gewächshaus	720	1) Anderson (1984) 2) Economou u. Read (1984) = ER 3) Lloyd u. McCown (1980) = WPM	5 mg/l 2iP 1 mg/l IAA	Reagenzgläser mit Glasdeckel	<ul style="list-style-type: none"> • höchste Neuaustriebsraten bei Triebspitzen • Sorte Rosa mit höchster Neuaustriebsrate • höher Austriebsraten auf den Medium WPM und nach ER(1984)

mit * gekennzeichnete Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Taubenböck, 2004)

Tab. G6: Versuche zur Etablierung der Azaleen in die Gewebekultur II

Versuchsnummer	Sorte	verwendete Gewebeart	Herkunft	Anzahl Expl.	Nährmedium	Phytohormone	Kulturgefäße	Ergebnis
E4*	<ul style="list-style-type: none"> • Melanie • M.G.Kint • Mme d Waele • Neapolis • Rosa • Sachsenstern 	Triebspitzen	Gewächshaus	832	1) Anderson 2) ER 3) WPM	5 mg/l 2iP 1 mg/l IAA	Reagenzgläser mit Glasdeckel	<ul style="list-style-type: none"> • 100% der Explantate der Sorte M.G.Kint bildeten mindestens einen Neuaustrieb auf allen 3 verwendeten Medien • restliche Sorten: über 50% Neuaustrieb auf ER-Medium; unter 50% auf WPM- und Andersonmedium
E5*	siehe E4*	<i>in vitro</i> -Sprosse	Gewebekultur (Versuch E4*)	720	1) Anderson 2) ER 3) WPM	5 mg/l 2iP 1 mg/l IAA	<ul style="list-style-type: none"> • Reagenzgläser mit Glasdeckel • Reagenzgläser mit Steristopfen 	<ul style="list-style-type: none"> • nur Sorte Kint subkultivierbar, Absterben der Sprosse der weiteren Sorte • 80-90% Sprossbildung bei Kint auf ER- und WPM-Medium • keine Sprossneubildung auf Andersonmedium • höhere Sprossbildung bei Verwendung von Steristopfen
E6	Mevrouw Edmond Troch	<ul style="list-style-type: none"> • Triebspitzen • Stengel-explantate mit 4 bis 5 Nodi 	Gewächshaus	240	Anderson	2 mg/l Zea 1 mg/l IAA	<ul style="list-style-type: none"> • Glaspetri-schalen • Weckgläser 	<ul style="list-style-type: none"> • 48% Neuaustrieb an Stengelexplantaten • 33% Neuaustrieb an Triebspitzenexplantaten • kein Unterschied zwischen den Kulturgefäßen

mit * gekennzeichnete Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Taubenböck, 2004)

G.5 Übersicht der Versuche zur *in vitro*-Bewurzelung

Tab. G7: Versuche zur *in vitro*-Bewurzelung

Versuchsnummer	Sorte	Herkunft	Anzahl Expl.	Nährmedium u. Zusätze	Phytohormone	Kulturgefäß	Ergebnis
B1*	<ul style="list-style-type: none"> • Mme d Waele • Polarstern • Rosa • Sachsenstern • Schneekönigin' • Winterperle 	Gewebekultur (Versuche E3* und E4*)	164	Anderson mit reduziertem NaFe-EDTA-Gehalt (100 mM; Preil persönl. Anmerkung)	2 mg/l IAA	<ul style="list-style-type: none"> • Weckgläser • Baby-nahrungsgläser mit Filterdeckel 	keine Wurzelbildung
B2	Mevrouw Edmond Troch	Gewebekultur, (ca. 6 Wochen nach letzten Umsetzungsschritt auf Vermehrungsmedium)	140	1) 1/10 MS + 0,3% Aktivkohle 2) 1/2 MS + 0,3% Aktivkohle 3) 1/2 MS + 0,3% Aktivkohle 4) 1/2 MS 5) Anderson + 0,3% Aktivkohle 6) Anderson	1) 2 mg/l IAA 2) 2 mg/l IAA 3) 5 mg/l IAA 4) 5 mg/l IAA 5) 2 mg/l IAA 6) 5 mg/l IAA	Petrischalen	1) Bewurzelung bei 3 <i>in vitro</i> – Sprossen (1 Spross abgestorben) 2) Bewurzelung von 2 <i>in vitro</i> – Sprossen (6 Sprosse abgestorben) 3) Bewurzelung von 1 <i>in vitro</i> – Spross (6 Sprosse abgestorben) 4) keine Wurzelbildung (alle Sprosse abgestorben) 5) Bewurzelung von 10 <i>in vitro</i> – Sprossen (5 Sprosse abgestorben) 6) keine Wurzelbildung (11 Sprosse abgestorben)
B3	Mevrouw Edmond Troch	siehe B2	60	Anderson + 3% Aktivkohle	2 mg/l IAA	Reagenzgläser	Bewurzelung von 19 <i>in vitro</i> – Sprossen

mit * gekennzeichnete Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Taubenböck, 2004)

G.6 Übersicht der Versuche zur Etablierung eines *in vitro*-Regenerationssystems

Tab. G8: Versuche zur Etablierung eines *in vitro*-Regenerationsversuch I

Versuchsnummer	Sorte	verw. Gewebeart/ Präparationsmethode	Anzahl Expl.	Nährmedium u. Zusätze	Phytohormone	Kulturgefäß	Ergebnis
R1	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Ballerina • Darius • Gitti • Heidi • Melanie • Polarstern • Sachsenstern • Schneekönigin' • Winterperle 	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	200	Anderson (1984)	Versuchswoche 1 und 2: Kallusinduktion: 2 mg/l 2,4-D 0,75 mg/l Zea ; ab Woche 3: Sprossinduktion: 15 mg/l Zea → Protokoll nach Mertens et al (1996)	Petrischalen	keine Regeneration von Adventivsprossen (Nekrotisierungserscheinungen bei allen Sorten bereits 2 Wochen nach Versuchsbeginn, teilweise Kallusbildung bei den Sorten 2000/5, Ballerina, Gitti, Melanie, Polarstern, Schneekönigin' und Winterperle, nach ca. 9 Wochen wurden alle Explantate als abgestorben bonitiert)
R2	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Ballerina • Darius • Gitti • Heidi • Melanie • Polarstern • Sachsenstern • Schneekönigin' • Winterperle 	<i>in vitro</i> -Blätter mit Petiole ohne Schnittwunde, abaxial auf das Medium gelegt	200	½ MS (halbe Konzentration der Macro- und Micronährstoffe) + 25 mg/l NaFeEDTA	0,372 mg/l NAA 2 mg/l TDZ → Protokoll nach Samyn et al (2002)	Petrischalen	keine Regeneration von Adventivsprossen (Nekrotisierungserscheinungen bei allen Sorten bereits 2 Wochen nach Versuchsbeginn, teilweise Kallusbildung bei den Sorten 2000/5, Ballerina, Gitti, Heidi, Sachsenstern, Schneekönigin' und Winterperle, nach ca. 9 Wochen wurden alle Explantate als abgestorben bonitiert)
R3*	• M.G.Kint	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	30	Anderson (1984)	siehe R1	<ul style="list-style-type: none"> • Petrischalen • Baby-nahrungsgläser mit Filterdeckel 	keine Regeneration von Adventivsprossen (im Vergleich zu Sorten aus den Versuchen R1 und R2 deutlich höhere Kallusbildungsrate)

mit * gekennzeichnete Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Taubenböck, 2004)

Tab. G9: Versuche zur Etablierung eines *in vitro*-Regenerationssystems II

Versuchsnummer	Sorte	verw. Gewebeart/ Präparationsmethode	Anzahl Expl.	Nährmedium u. Zusätze	Phytohormone	Kulturgefäß	Ergebnis
R4*	M.G.Kint	<i>in vitro</i> -Blätter mit Petiole ohne Schnittwunde, abaxial auf das Medium gelegt	30	½ MS (halbe Konzentration der Macro- und Micronährstoffe) + 25 mg/l NaFeEDTA	siehe R2	<ul style="list-style-type: none"> • Petrischalen • Baby-nahrungsgläser mit Filterdeckel 	keine Regeneration von Adventivsprossen (im Vergleich zu Sorten aus den Versuchen R1 und R2 deutlich höhere Kallusbildungsrate)
R5*	M.G.Kint	siehe R4*	30	Anderson (1984)	1,5 mg/l TDZ 12 mg/l 2iP 3 mg/l BA → Protokoll nach Tomsone (2003); nach 16 Wochen: Umsetzung auf 3 mg/l 2iP	<ul style="list-style-type: none"> • Petrischalen • Baby-nahrungsgläser mit Filterdeckel 	keine Regeneration von Adventivsprossen
R6*	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Ballerina • Winterperle 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>in vitro</i>-Blätter • <i>ex vitro</i>-Blätter (Oberflächensterilisiert) Blätter quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt) 	60	Anderson (1984)	1) 1,86 mg/l NAA 4,0 mg/l 2iP 2) 1,86 mg/l NAA 4,4 mg/l TDZ 3) 1,86 mg/l NAA 4,51 mg/l BA	Petrischalen	keine Regeneration von Adventivsprossen (hohe Absterbequote der Explantate bereits 2 Wochen nach Anlage der Kultur)
R7*	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Ballerina • Winterperle 	siehe R6*	60	Anderson (1984)	1) 2,22 mg/l 2,4-D 4,0 mg/l 2iP 2) 2,22 mg/l 2,4-D 4,4 mg/l TDZ 3) 2,22 mg/l 2,4-D 4,51 mg/l BA	Petrischalen	keine Regeneration von Adventivsprossen (hohe Absterbequote der Explantate bereits 2 Wochen nach Anlage der Kultur)

mit * gekennzeichnete Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Taubenböck, 2004)

Tab. G10: Versuche zur Etablierung eines *in vitro*-Regenerationssystems III

Versuchsnummer	Sorte	verw. Gewebeart/ Präparationsmethode	Anzahl Expl.	Nährmedium u. Zusätze	Phytohormone	Kulturgefäße/ Kulturbedingungen	Ergebniss
R8*	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Ballerina • Winterperle 	siehe R6*	60	Anderson (1984)	1) 1,75 mg/l IAA 4,0 mg/l 2iP 2) 1,75 mg/l IAA 4,4 mg/l TDZ 3) 1,75 mg/l IAA 4,51 mg/l BA	Petrischalen	Regeneration von Adventivsprossen an ex vitro-Explantaten bei Hormonkombination 2) (Regenerationsquote: 20 %)
R9*	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Ballerina • Gitti • Neapolis • Rosa 	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	240	Anderson (1984)	1) 1,75 mg/l IAA 4,0 mg/l 2iP 2) 2,22 mg/l 2,4-D 4,0 mg/l 2iP	Petrischalen; 1) Standardkulturbedingungen 2) Woche 1 und 2 Kultur im Dunkeln 3) gesamter Kulturverlauf im Dunkeln	keine Regeneration von Adventivsprossen anfängliche Kultur im Dunkeln verzögerte Nekrotisierungen, Kallusbildung möglich, nach 12 Wochen Absterben aller Explantate
R10*	siehe R9*	siehe R9*	360	1) Anderson 2) Anderson + 2 g/l Aktivkohle 3) Anderson + 0,5 g/l PVP	siehe R9*	Petrischalen; Standardkulturbedingungen	keine Regeneration von Adventivsprossen (hohe Absterbequote der Explantate bereits 2 Wochen nach Anlage der Kultur) Aktivkohle und PVP nicht geeignet zur Reduktion von Nekrotisierungen
R11*	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Mme d Waele • Polarstern • Rosa • Sachsenstern • Winterperle 	1) siehe R9 2) Blattexplantate quadratisch (mit 4 Schnittwunden)	240	Anderson (1984)	3 mg/l NAA 2 mg/l TDZ	Babynahrungsgläser mit Filterdeckel; Woche 1 und 2 Kultur im Dunkeln, anschließend bei PAR 10-20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	keine Regeneration von Adventivsprossen Vergrößerung der Wundfläche führt nicht zu Regenerationserfolg

mit * gekennzeichnete Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Taubenböck, 2004)

Tab. G11: Versuche zur Etablierung eines *in vitro*-Regenerationssystems IV

Versuchsnummer	Sorte/ Anzahl Expl.	verw. Gewebeart	Nährmedium u. Zusätze	Phytohormone	Kulturgefäße/ Kultur- bedingungen	Ergebnisse
R12*	<ul style="list-style-type: none"> • Ballerina • Mme d Waele • Rosa Anzahl Expl.: 720	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	1) Anderson 2) Anderson + 50 mg/l Ascorbinsäure	1) 1,75 mg/l IAA 4,51 mg/l BA 2) 1,75 mg/l IAA 4,4 mg/l TDZ 3) 1,75 mg/l IAA 4,0 mg/l 2iP 4) 1,86 mg/l NAA 4,51 mg/l BA 5) 1,86 mg/l NAA 4,4 mg/l TDZ 6) 1,86 mg/l NAA 4,0 mg/l 2iP	Petrischalen; Woche 1 und 2 Kultur im Dunkeln	keine Regeneration von Adventivsprossen geringere Nekrotisierungen bei Zugabe von Ascorbinsäure
R13*	<ul style="list-style-type: none"> • Ballerina • Mme d Waele • Rosa Anzahl Expl.: 180	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	1) Anderson + 15 g/l Saccharose 2) Anderson + 15 g/l Saccharose + 50 mg/l Ascorbinsäure 3) Anderson	1,86 mg/l NAA 4,4 mg/l TDZ	Petrischalen; Woche 1 und 2 Kultur im Dunkeln	keine Regeneration von Adventivsprossen geringere Nekrotisierungen bei Zugabe von Ascorbinsäure und reduzierten Saccharosegehalt
R14	<ul style="list-style-type: none"> • 2000/5 • Ballerina Anzahl Expl.: 160	<i>in vitro</i> -Blätter, quadratisch (mit 4 Wundrändern), abaxial auf das Medium gelegt	1) Anderson 2) Anderson + 50 mg/l Ascorbinsäure 3) Anderson + 50 mg/l Zitronensäure 4) Anderson + 50 mg/l Ascorbinsäure + 50 mg/l Zitronensäure	4 mg/l 2iP 2 mg/l NAA	Petrischalen; Woche 1 und 2 Kultur im Dunkeln	keine Regeneration von Adventivsprossen Absterben aller Explantate bereits 4 Wochen nach Anlage der Kultur
R15	siehe R14 Anzahl Expl.: 160	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	siehe R14	siehe R14	siehe R14	keine Regeneration von Adventivsprossen Absterben aller Explantate des Medium 1); deutlich geringere Nekrotisierungen bei den Varianten mit Antioxidationszusätzen, zudem Kallusbildung

mit * gekennzeichnete Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Taubenböck, 2004)

Tab. G12: Versuche zur Etablierung eines *in vitro*-Regenerationssystems V

Versuchsnummer	Sorte/ Anzahl Expl.	verw. Gewebeart	Nährmedium u. Zusätze	Phyto- hormone	Kulturgefäße/ Kultur- bedingungen	Ergebnisse
R16	• Ballerina • Neapolis • Wintperle Anzahl Expl.: 300	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	1) Anderson 2) Anderson + 50 mg/l Ascorbinsäure 3) Anderson + 50 mg/l Zitronensäure 4) Anderson + 50 mg/l Ascorbinsäure + 50 mg/l Zitronensäure 5) Anderson + 50 mg/l Na- Ascorbat	4 mg/l 2iP 2 mg/l NAA	Petrischalen; Woche 1 und 2 Kultur im Dunkeln	keine Regeneration von Adventivsprossen reduzierte Nekrotisierungen der Varianten mit Antioxidationszusätzen, bei überlebenden Explantaten Kallusbildung
R17-1	Mevrouw Edmoud Troch Anzahl Expl.: 154	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	Anderson (1984) → Protokoll nach Mertens et al. (1996)	• Woche 1 u. 2: 2 mg/l 2,4-D 0,75 mg/l Zea • anschließend 2 mg/l TDZ	Petrischalen	Regeneration von Adventivsprossen! <i>Bonitur nach ca. 10 Wochen</i> Absterberate: 1) 8% 2) 16%; Regenerationsrate: 1) 50% 2) 42%; <i>Bonitur nach ca. 5 Monaten</i> Anteil überlebender Explantate: 1) 46,5% 2) 82% davon mit Regeneration: 1) 18% 2) 86%
R17-2	M.G. Kint Anzahl Expl.: 100	siehe R17-1	Siehe R17-1	siehe R17-1	Petrischalen	geringe Regeneration von Adventivsprossen <i>nach 10 Wochen:</i> Absterberate: 14%, keine Regeneration <i>nach 5 Monaten:</i> überlebende Explantate: 52%, davon mit Regeneration: 2%
R17-3	Mevrouw Edmoud Troch Anzahl Expl.: 50	<i>in vitro</i> -Blätter mit Petiole ohne Schnittwunde, abaxial auf das Medium gelegt	½ MS + 25 mg/l NaFeEDTA → Protokoll nach Samyn et al. (2002)	0,37 mg/l NAA 2 mg/l TDZ	Petrischalen	Regeneration von Adventivsprossen! <i>nach 10 Wochen:</i> Absterberate: 0%, Regenerationsrate: 52% <i>nach 5 Monaten:</i> überlebende Explantate: 72%, davon mit Regeneration: 48%
R17-4	M.G. Kint Anzahl Expl.: 212	siehe R17-3	siehe R17-3	siehe R17-3	Petrischalen	geringe Regeneration von Adventivsprossen <i>nach 10 Wochen:</i> Absterberate: 42%, Regenerationsrate: 3% <i>nach 5 Monaten:</i> überlebende Explantate: 13%, davon mit Regeneration: 10%

Tab. G13: Versuche zur Etablierung eines *in vitro*-Regenerationssystems VI

Versuchsnummer	Sorte/ Anzahl Expl.	verw. Gewebeart	Nährmedium u. Zusätze	Phytohormone	Kultur- gefäße	Ergebnisse
R18-1	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 84	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	Anderson (1984)	1) 1. Woche: 2 mg/l 2,4-D 0,75 mg/l Zea anschließend: 2 mg/l TDZ 2) 1. Woche: 2 mg/l NAA 0,75 mg/l Zea anschließend: 2 mg/l TDZ	Petrischalen	Regeneration von Adventivsprossen! Regenerationsrate: 1) 43,2% 2) 60,5%
R18-2	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 71	siehe R18-1	Anderson (1984)	1) 1. u. 2. Wo: 2 mg/l 2,4-D 0,75 mg/l Zea anschließend: 2 mg/l TDZ 2) 1. u. 2. Wo: 2 mg/l NAA 0,75 mg/l Zea anschließend: 2 mg/l TDZ	Petrischalen	Regeneration von Adventivsprossen! Regenerationsrate: 1) 55,6% 2) 71,5%
R18-3	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 68	siehe R18-3	Anderson (1984)	1) 1. bis 3. Wo: 2 mg/l 2,4-D 0,75 mg/l Zea anschließend: 2 mg/l TDZ 2) 1. bis 3. Wo: 2 mg/l NAA 0,75 mg/l Zea anschließend: 2 mg/l TDZ	Petrischalen	Regeneration von Adventivsprossen! Regenerationsrate: 1) 70,4% 2) 75,6%
R19	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 213	<i>in vitro</i> -Blätter, quer zur Mittelrippe geteilt, abaxial auf das Medium gelegt	Anderson (1984)	1) 1. u. 2. Wo: 2 mg/l 2,4-D 0,75 mg/l Zea anschließend: 2 mg/l TDZ 2) 1. u. 2. Wo: 2 mg/l 2,4-D 0,75 mg/l Zea anschließend: 15 mg/l Zea	Petrischalen	Regeneration von Adventivsprossen! Regenerationsrate: 1) 69,0% 2) 46,9%

G.7 Übersicht der Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems

Tab. G14: Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems I

Versuchsnummer	Azaleen-Sorte/ Anzahl	Transformationsmethode	Agrostamm, Plasmid	Dauer Präkultur	Dauer Kokultur	Antibiotika	Ergebnisse
T1-1	Mevrouw Edmomd Troch •Anzahl Expl. insg.: 240 •Explante für GUS-Test: 123	Pipetieren der Agrosuspension auf das Explantat → Mertens et al. (1997)	1) EHA pBI 121 GUS 2) LBA pBI 121 GUS 3) Kontrolle*	14 d	2 d	20 mg/l Kan 250 mg/l Cef	keine Regeneration von putativ transgenen Adventivsprossen GUS-Test 1 Wo nach Transformation 1) 29,4% Explantate GUS-positiv* 2) 11,9% Explantate GUS-positiv* 3) 0% Explantate GUS-positiv** *3 Wo nach Transformation: alle Explantate mit <i>Agrobacterium</i> überwachsen ** 3-4 Wo nach Transformation: alle Explantate abgestorben
T1-2	Mevrouw Edmomd Troch •Anzahl Expl. insg.: 260 •Expl. für GUS-Test: 130	<i>Leaf Disk</i> -Methode → Horsch et al. (1985)	1) EHA pBI 121 GUS 2) LBA pBI 121 GUS 3) Kontrolle	14 d	2 d	20 mg/l Kan 250 mg/l Cef	keine Regeneration von putativ transgenen Adventivsprossen GUS-Test 1 Wo nach Transformation 1) 72,5% Explantate GUS-positiv* 2) 57,5% Explantate GUS-positiv* 3) 0% Explantate GUS-positiv** *ca. 50% der Explantate mit <i>Agrobacterium</i> überwachsen ** 3-4 Wo nach Transformation: alle Explantate abgestorben

* Kontrolle: Behandlung der Explantate wie bei transformierten Varianten, anstatt der Agrosuspension wurde flüssiges YEB-Medium verwendet

Tab. G15: Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems II

Versuchsnummer	Azaleen-Sorte/ Anzahl	Transformationsmethode	Agrostamm, Plasmid	Dauer Präkultur	Dauer Kokultur	Antibiotika	Ergebnisse
T2	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl •Expl. insg.: 372 •Expl. GUS-Test: 184	1) Infiltration der Agrosuspension in das Explantat durch Unterdruck 10 mbar 2) Infiltration der Agrosuspension in das Explantat durch Unterdruck 20 mbar 3) <i>Leaf Disk</i> -Methode 4) Kontrolle*	1) EHA pBI 121 GUS	14 d	2 d	20 mg/l Kan 250 mg/l Cef	keine Regeneration von putativ transgenen Adventivsprossen GUS-Test 1 Wo nach Transformation 1) 0% Explantate GUS-positiv 2) 0% Explantate GUS-positiv 3) 73,9% Explantate GUS-positiv 4) 0% Explantate GUS-positiv Überwachung durch Agros bei 3) 40% bzw. 1) und 2) 50% der Explantate; Absterben der übrigen Explantate ca. 3 Wo nach Transformation
T3	Mevrouw Edmomd Troch •Anzahl Expl. insg.: 364 •Expl. GUS-Test: 155	<i>Leaf Disk</i> -Methode	EHA pBI 121 GUS, sowie Kontrolle*	1) 0 d 2) 7d 3) 14 d 4) 21 d	2 d	20 mg/l Kan 250 mg/l Cef	keine Regeneration von putativ transgenen Adventivsprossen GUS-Test 1Wo nach Transformation Kontrolle: 0% Explantate GUS-positiv 1) 27,8% Explantate GUS-positiv (10 von 36) 2) 43,5% Explantate GUS-positiv (13 von 30) 3) 78,1% Explantate GUS-positiv (25 von 32) 4) 51,5% Explantate GUS-positiv (16 von 31) ca. 3 Wo Beginn d. Kultur auf Selektionsmedium Absterben oder Agroüberwachung aller Eplantate

* Kontrolle: Behandlung der Explantate wie bei transformierten Varianten, anstatt der Agrosuspension wurde flüssiges YEB-Medium verwendet

Tab. G16: Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems III

Versuchsnummer	Azaleen-Sorte / Anzahl	Transformationsmethode	Agrostamm, Plasmid	Prä-/Ko-Kultur	Antibiotika	Ergebnisse
T4	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 298	<i>Leaf Disk</i> -Methode	EHA pBI 121 GUS, sowie Kontrolle*	Prä: 14 d Ko: 2d	1) keine Antibiotika 2) 200 mg/l Cef 3) 500 mg/l Cef 4) 200 mg/l Carb 5) 500 mg/l Carb 6) 200 mg/l Tim 7) 500 mg/l Tim	Regeneration transgener Sprosse 1) 100% Agroüberwuchs 2) 33,3% Agroüberwuchs; 13 put. transg. Sprosse 3) 0% Agroüberwuchs 4) 9% Agroüberwuchs 5) 0% Agroüberwuchs 6) 0% Agroüberwuchs; 22 put. Transg. Sprosse 7) 0% Agroüberwuchs nicht transf. Kontrolle ohne Antibiot.: 80 Adventivsprosse
T5	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 200	<i>Leaf Disk</i> -Methode	EHA pBI 121 GUS, sowie Kontrolle*	Prä: 14 d Ko: 2d	200 mg/l Tim 1) 0 mg/l Kan 2) 5 mg/l Kan 3) 10 mg/l Kan 4) 15 mg/l Kan 5) 20 mg/l Kan	Regeneration transgener Sprosse Kontrolle: Regeneration von >100 Adventivsprossen 1) 52 Adventivsprosse 2) 11 Adventivsprosse → 4 transgen 3) keine Regeneration; 4) keine Regeneration 5) keine Regeneration
T6	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 260	<i>Leaf Disk</i> -Methode	EHA pBI 121 GUS, sowie Kontrolle*	Prä: 14 d Ko: 2d	200 mg/l Tim steigende Kan-Konz. 1) 0 mg/l → 0 mg/l → 0 mg/l 2) 0 mg/l → 5 mg/l → 10 mg/l 3) 0 mg/l → 5 mg/l → 5 mg/l 4) 5 mg/l → 5 mg/l → 10 mg/l 5) 5 mg/l → 10 mg/l → 10 mg/l „→“ = 2 Wochen	Regeneration transgener Sprosse Kontrolle: > 100 Adventivsprosse 1) 54 Advenivsprosse → 2 transgen 2) 33 Adventivsprosse → 17 transgen 3) 30 Adventivsprosse → 6 transgen 4) 2 Advenivsprosse → 1 transgen 5) 100% der Explantate abgesorben
T7	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 80	<i>Leaf Disk</i> -Methode	EHA pBI 121 GUS, sowie Kontrolle*	Prä: 14 d Ko: 2d	200 mg/l Tim Kan-Konzentrationen 1) 0 mg/l → 0 mg/l → 0 mg/l 2) 0 mg/l → 5 mg/l → 10 mg/l	Regeneration transgener Sprosse Kontrolle: > 100 Adventivsprosse 1) 88 Adventivsprosse → 7 transgen 2) 34 Adventivsprosse → 26 transgen

* Kontrolle: Behandlung der Explantate wie bei transformierten Varianten, anstatt der Agrosuspension wurde steriles Wasser verwendet

G.8 Übersicht der Versuche zur Etablierung eines Mannose-Selektionssystems

Tab. G17: Versuche zur Etablierung eines Mannose-Selektionssystems I

Versuchsnummer	Azaleensorte/ Anzahl	Transformationsmethode	Agrostamm, Plasmid	Dauer Prä- und Kokultur	Antibiotika	Mannose (M)/ Saccharose(S) in g/l	Ergebnisse
M1**	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 240	-	-	Präkultur: 14d auf 30 g/l Saccharose	-	1) 0M/ 20S 2) 1M/ 20S 3) 2M/ 20S 4) 5M/ 20S 5) 10M/ 20S 6) 20M/ 20S	1) 2) und 3) Regeneration von Adventivsprossen 4) 5) und 6) keine Regeneration und keine oder schwache Kallusbildung
M2-1**	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 240	-	-	Präkultur: 14d auf 30 g/l Saccharose	200 mg/l Cefotaxim	1) 0M/ 20S 2) 4M/ 20S 3) 5M/ 20S	1) Regeneration ausdifferenzierter Sprosse 2) Kallusbildung und Ausbildung von Sprossprimordien 3) keine Regeneration
M2-2**	Mevrouw Edmomd Troch Anzahl Expl.: 240	<i>Leaf Disk-</i> Methode	EHA PNOVGUS und Kontrolle*	siehe M2-1**	siehe M2-1**	siehe M2-1**	1) Regeneration ausdifferenzierter Sprosse 2) Kallusbildung und Ausbildung von Sprossprimordien 3) keine Regeneration

*Kontrolle: Behandlung der Explantate wie bei transformierten Varianten, anstatt der Agrosuspension wurde steriles Wasser verwendet

**Versuche wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt (Pfeufer, 2006)

Tab. G18: Versuche zur Etablierung eines Mannose-Selektionssystems II

Versuchsnummer	Azaleensorte/ Anzahl	Transformationsmethode	Agrostamm, Plasmid	Dauer Prä- und Kokultur	Antibiotika	Mannose (M)/ Saccharose(S) in g/l	Ergebnisse
M3-1	Mevrouw Edmond Troch Anzahl Expl.: 240	-	-	Präkultur: 14d auf 30 g/l Saccharose	200 mg/l Timentin	Steigende M-Konz. bei gleicher S-Konz. (20g/l) 1) 3M → 4M → 4M 2) 3M → 4M → 5M 3) 4M → 5M → 5M 4) 5M → 5M → 5M „→“ = 2 Wochen	1) 12 Adventivsprosse 2) 1 Adventivpross 3) 3 Adventivsprosse 4) keine Regeneration
M3-2	Mevrouw Edmond Troch Anzahl Expl.: 240	<i>Leaf Disk-</i> Methode	EHA PNOVGUS und Kontrolle*	siehe M3-1	siehe M3-1	siehe M3-1	Regeneration transgener Sprosse 1) 5 Adventivsprosse, 2 Transgen 2) 32 Adventivsprosse; 13 Transgene 3) 6 Adventivsprosse; 6 Transgene 4) keine Regeneration

*Kontrolle: Behandlung der Explantate wie bei transformierten Varianten, anstatt der Agrosuspension wurde steriles Wasser verwendet

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Gert Forkmann für die Überlassung des Themas, die Begleitung dieser Arbeit und sein entgegen gebrachtes Vertrauen

Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl für die Übernahme des Prüfungsausschuss-Vorsitzes und Herrn Prof. Dr. Dieter Treutter für die Übernahme des Koreferats

Dr. Christian Seitz, bei dem ich mich besonders für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Ratschläge bedanken möchte, die für mich unbezahlbar waren. Dr. Bernhard Hauser, bei dem ich jederzeit mit Anfragen an die Tür klopfen durfte. Bei beiden möchte ich mich auch für die Korrektur des Manuskripts bedanken.

Prof. Preil für die wertvollen Ratschläge insbesondere zur Gewebekultur von Azaleen, Prof. Feucht für die Hilfe bei den mikroskopischen Untersuchungen.

Ina Tittel für die Unterstützung bei der Laborarbeit und den Fotoaufnahmen

dem Gärtnerteam unter der Leitung von Gärtnermeister Richard Dinkel für die Betreuung der Versuchspflanzen

den Lehrstuhlsekretärinnen Frau Erna Lock und Frau Waltraud Deragisch für ihre stete Hilfsbereitschaft

allen Kolleginnen und Kollegen für die gute und angenehme Zusammenarbeit

den Studentinnen und Studenten, die während ihrer Diplom- und Masterarbeiten mit ihrer Motivation und Begeisterung zum Azaleen-Projekt beigetragen haben

meiner Mutter Edda Rathje, Mike O'Neill (dem *native speaker*), meinem Bruder Jörg und meiner Schwägerin Inga

und besonders meinem Freund Janis Eitner für die unendliche Geduld und das Verständnis

Lebenslauf

Name Wiebke Rathje
Geburtsdatum 29.04.1975
Geburtsort Peine
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1981 – 1985
 Grundschule, Peine

1985 – 1987
 Orientierungsstufe, Peine

1987 – 1994
 Gymnasium, Peine,
 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1994 – 1996
 Ausbildung zur Landwirtschaftlich-technischen
 Assistentin an der Berufsbildenden Schule VI der
 Stadt Braunschweig,
 mit fachpraktischer Ausbildung bei Nickerson
 Pflanzenzucht GmbH, Lehrte-Arpke

Studium

11/1996 – 08/2002
 Studium der Gartenbauwissenschaften an der TU
 München-Weihenstephan
 Abschluss: Dipl.-Ing. agr. (Univ)
 Diplomarbeitsthema: „Untersuchungen zur
 züchterischen Bearbeitung von *Osteospermum
 ecklonis*“

Berufstätigkeit

12/2002 – 4/2007
 angestellt bei der Fa. Citzler Gartenbau, Gütersloh,
 als wissenschaftliche Mitarbeiterin
 im Rahmen eines Mitarbeiteraustauschprogrammes
 delegiert an den Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

4/2007 - heute
 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für
 Zierpflanzenbau, TU München-Weihenstephan

