

nutzen auch Zierpflanzenzüchter molekulare Marker regelmäßig zur Eltern-Identifizierung und zur Sortenunterscheidung (Rout und Mohapatra, 2006). Zukünftig ist aufgrund neuer DNA-Sequenzierverfahren mit einer erheblichen Reduktion der Entwicklungskosten für molekulare Marker zu rechnen, während gleichzeitig die Verfügbarkeit von Sequenzdaten auch für wirtschaftlich weniger bedeutende Kulturen deutlich steigt. Daher kann mit einer verstärkten Anwendung molekulare Marker auch in der Zierpflanzenzüchtung gerechnet werden. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass auch bei leichter Verfügbarkeit von Sequenzdaten (bzw. dann insbesondere) nur eine planvolle und systematische Anwendung die Züchtungsarbeit tatsächlich erleichtert.

Literatur

- Behr H. C. und R. Niehues, 2009: Markt und Absatz. In: Status quo und Perspektiven des deutschen Produktionsgartenbaus. Landbauforschung, Sonderheft **330**, 69-98.
- Borchert T. und A. Hohe, 2009: Identification of molecular markers for the flower type in the ornamental crop *Calluna vulgaris*. *Euphytica* **170**, 203-213.
- Borchert T. und I. Gawenda, 2010: Development and application of high-throughput amplified fragment length polymorphism technique in *Calluna vulgaris* (Ericaceae). *Electronic Journal of Biotechnology* **13** No. 2, Issue of March 15, 2010.
- Borchert T., J. Krueger und A. Hohe, 2008: Implementation of a model for identifying Essentially Derived Varieties in vegetatively propagated *Calluna vulgaris* varieties. *BMC Genetics* **9**, 56.
- Byrne D. H., 2007: Molecular marker use in perennial plant breeding. *Acta Hort* **751**, 163-167.
- Michelmore R. W. I. Paran und R. V. Kesseli, 1991: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9828-9832.
- Rout, G. R. und A. Mohapatra, 2006: Use of molecular markers in ornamental plants: a critical reappraisal. *Europ. J. Hort Sci.* **71**(2), 53-68.
- Vosman B., D. Visser, J. van der Voort, Smulders M und F. van Eeuwijk, 2004: The establishment of 'essential derivation' among rose varieties, using AFLP. *Theor Appl Genet* **109**, 1718-1725.

Biotechnologische Methoden für die züchterische Verbesserung von Zierpflanzen

Mibus, Heiko; Serek, Margrethe; Winkelmann, Traud
Institut für Zierpflanzen - und Gehölzwissenschaften, Leibniz Universität Hannover,
Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover

DOI: 10.5073/jka.2011.433.005

Einleitung

Die deutsche Zierpflanzenzüchtung nimmt weltweit eine führende Rolle ein und meldet jährlich für die internationale Vermarktung eine große Anzahl von neuen Sorten an. Beim Europäischen Sortenamts sind die neu angemeldeten Zierpflanzenarten mit einem Anteil von 60% die mit Abstand größte Pflanzenartengruppe (Jahresbericht 2007 CPVO Community Plant Variety Office). Neben der großen Bedeutung deutscher Zierpflanzenzüchtungsunternehmen lässt sich daraus auch entnehmen, dass die Suche nach Neuheiten den Sektor bestimmt. Der große Konkurrenzdruck unter den Zierpflanzenzüchtern und die schnellen Veränderungen des Sortenspektrums am Markt erfordern neue Strategien zur Sortenentwicklung. Zur Unterstützung und Beschleunigung der klassischen Züchtung hat deshalb die Nutzung von biotechnologischen Methoden in den letzten Jahrzehnten stark an Bedeutung gewonnen.

Unter Zierpflanzen fallen viele diverse Pflanzenarten verschiedenster Familien in tausenden von Sorten. Durch diese Vielfalt ergibt sich eine ausgeprägte Heterogenität, die eine Übertragung von biotechnologischen Methoden von einer Zierpflanzenart auf eine andere und sogar die Übertragung von einer Sorte auf eine andere meist ausgesprochen schwierig und damit sehr zeitintensiv werden lässt. Idealerweise werden Methoden benötigt, die bei vielen verschiedenen Pflanzenarten und -sorten effizient

angewendet werden können, um durch schnelle Züchtung flexibel auf die sich wandelnden Marktanforderungen zu reagieren.

Die Forschung der Abteilung Zierpflanzenbau des Instituts für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der Leibniz Universität Hannover (LUH) beschäftigt sich mit Themen zur Nacherntephysiologie und Qualität von Zierpflanzen (z. B. *Kalanchoë*, *Campanula*, Topfrosen, *Pelargonium*). Neben der Untersuchung von Alterungsprozessen bei Zierpflanzen stehen die Suche nach umweltverträglichen Haltbarkeitsmitteln und molekulargenetische Ansätze zur Verbesserung der Haltbarkeit im Vordergrund. Ein weiterer Schwerpunkt der zierpflanzenbaulichen Forschung und Lehre ist die Nutzung von In-vitro-Kulturtechniken zur Vermehrung sowie der Transformation zur Verbesserung der gartenbaulich relevanten Eigenschaften der Zierpflanzen. So wurden und werden umfangreiche Versuche zur Transformation von *Petunia*, *Pelargonium*, *Kalanchoë* sowie *Campanula* durchgeführt. Ein neuer Forschungsbereich beschäftigt sich mit der physiologischen und molekulargenetischen Aufklärung von Barrieren bei interspezifischen Kreuzungen zur Züchtung neuer Hybriden. Die meisten Forschungsprojekte werden in Kooperation mit gartenbaulichen Unternehmen durchgeführt.

In Forschung und Lehre der Abteilung Baumschule werden schwerpunktmäßig Fragen der Züchtung, Vermehrung, Physiologie und Kultur von Gehölzen und anderen gartenbaulichen Kulturen, darunter diverse Zierpflanzen, bearbeitet. Der Schwerpunkt wird in Zukunft in Richtung von Fragen zur Vermehrungsphysiologie, mit besonderem Augenmerk auf In-vitro-Kulturtechniken liegen. Die Ausstattung umfasst Freiland-, Gewächshaus-, Klimakammer- und In-vitro-Kulturflächen, ein molekulargenetisches und ein In-vitro-Labor, Möglichkeiten zur Durchflusszytometrie und Histologie, Substrat- und Pflanzennährstoffanalytik, sowie Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie. Forschungsschwerpunkte, die Zierpflanzen betreffen, sind die Entwicklung und Optimierung von In-vitro-Kulturtechniken, vor allem die somatische Embryogenese bei *Cyclamen persicum*, somatische Hybridisierung und „Embryo rescue“ Techniken zur Entwicklung von Arthybriden (z.B. in den Gattungen *Cyclamen* und *Helleborus*), Entwicklung von Transformationssystemen zur Untersuchung von Genfunktionen (*Cyclamen*, *Phalaenopsis*) und das Themengebiet Bodenmüdigkeit.

Im Folgenden werden Techniken und Methoden erläutert, die die Zierpflanzenzüchtung derzeit schon oder in Zukunft bereichern und effizienter gestalten, und die im Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der LUH in Forschungsprojekten eingesetzt werden: Es sind dies interspezifische Hybridisierungen, In-vitro-Kulturtechniken, die genetische Transformation und molekulargenetische Analysen von Kandidatengen. Diese Techniken werden zunächst kurz vorgestellt, bevor anhand von aktuellen Beispielen ihres Einsatzes in unserem Institut Möglichkeiten und Begrenzungen aufgeführt werden.

Interspezifische Hybridisierungen

Viele der derzeit am Markt wichtigen Zierpflanzen sind vor längerer oder kürzerer Zeit aus Kreuzungen zwischen Arten hervorgegangen. Der Ansatz, Art- und zum Teil auch Gattungsgrenzen zu überwinden, ist nach wie vor eine treibende Kraft der Zierpflanzenzüchtung, deren Potential bei weitem noch nicht ausgeschöpft ist. Während in landwirtschaftlichen Kulturen weite Kreuzungen häufig mit dem Ziel der Übertragung einzelner wichtiger Eigenschaften aus verwandten Arten verbunden ist und wiederholte Rückkreuzungen die Regel sind, ist bei Zierpflanzen häufig bereits die primäre Hybride als neue Zierpflanze interessant. Das generelle Vorgehen bei interspezifischer Hybridisierung beginnt mit der Ermittlung von Ort und Zeit der Kreuzungsbarrieren. Dazu sind zunächst Untersuchungen zur Pollenvitalität mit Vitalitätsfärbung (z. B. Fluoreszeindiacetat nach Widholm (1972), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) nach Kathum und Flowers 1995) oder Pollenkeimfähigkeitstests *in vitro* geeignet, um die Fertilität des Pollenelters zu ermitteln. Gegebenenfalls sind Versuche zur Synchronisierung der Blütezeit oder zur Pollenlagerung zu empfehlen. Die Beobachtung des Pollenschlauchwachstums nach Anilinblaufärbung (detaillierte Anleitung in Winkelmann et al. 2010) unter dem Fluoreszenzmikroskop ist ein wesentlicher Schritt, um die mögliche Kreuzungsbarriere zu lokalisieren und festzustellen, ob diese präzygotisch oder postzygotisch (vor oder nach der Befruchtung) wirksam ist. Bei Barrieren, die vor der Befruchtung wirksam werden, können *In-vitro*-Bestäubungen, die sogenannte „cut-style“ oder „grafted-

style“ Methode (Van Tuyl et al. 2000) oder zum Beispiel die Verwendung von Mentorpollen (Singsit und Hanneman 1991) Anwendung finden. Ist die Befruchtung hingegen erfolgt, so lässt sich die „Embryo Rescue“ Technik einsetzen. Hierbei entwickelt sich der Embryo an der Mutterpflanze noch eine Zeitlang, wird dann aber abgenommen und *in vitro* kultiviert, um das Absterben zu verhindern, das häufig auf eine Fehlentwicklung des Endosperms zurückzuführen ist. Entscheidende Faktoren für das Gelingen in einem „Embryo Rescue“ Ansatz sind die Wahl der Elterngenotypen, die Kreuzungsrichtung und der Zeitpunkt der Entnahme der Fruchtknoten, Samenanlagen oder Embryonen (Winkelmann et al. 2010).

Ein weiterer, aufwändigerer Weg zu interspezifischen Hybriden ist der über somatische Hybridisierungen. Voraussetzung dafür ist, dass mindestens für mindestens einen der Partner ein System zur Pflanzenregeneration aus Protoplasten vorliegt. Dazu muss ein Protokoll für die Polyethylenglykol oder elektrisch vermittelte Protoplastenfusion angepasst werden. Ein weiterer Flaschenhals ergibt sich bei der Selektion der Heterofusionsprodukte, weil unserer Erfahrung nach der Einsatz von Inhibitoren nicht gut funktioniert (Meyer 2006).

Die Identifizierung der Hybriden kann frühzeitig, d.h. schon im Sämlingsstadium, mit Hilfe molekularer Marker oder mittels Durchflusszytometrie erfolgen (Meiners und Winkelmann 2011). Voraussetzung für die durchflusszytometrische Identifizierung sind DNA-Gehalte der Eltern, die sich um mindestens 20-25 % unterscheiden. Bei den DNA-Markern wurden in der Vergangenheit häufig RAPDs (random amplified polymorphic DNA) oder AFLPs (amplified fragment length polymorphism) eingesetzt, zukünftig werden sicher auch bei Zierpflanzen verstärkt Mikrosatellitenmarker oder SNPs (single nucleotide polymorphism) verwendet. Auch die Entwicklung von art- oder gattungsspezifischen Markern kann hilfreich sein (Rode et al. 2010, Prange et al. 2011). Mit Chromosomenanalysen, vor allem, wenn sie aufgrund von Fluoreszenzmarkierung die Zuordnung zu den Eltern ermöglichen (FISH = Fluorescence In Situ Hybridisation, GISH, = Genomic In Situ Hybridisation) (Raina und Rani 2001; Jiang und Gill 2006) sind weitere wichtige Erkenntnisse über die genetische Konstitution der Hybriden zu erlangen. Abschließend erfolgt in der Regel eine detaillierte Untersuchung der Morphologie, des Wachstums, der Fertilität und der gärtnerischen Kultureigenschaften.

Aktuell bearbeitete Projekte im Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften sind:

○ **Erstellung interspezifischer Nemesien-Hybriden:**

Die neuen Züchtungen von Nemesiensorten beruhen auf Kreuzungen mit der Art *Nemesia strumosa*, mit besonders großen Blüten in leuchtenden Farben. Allerdings sind diese Pflanzen gegenüber anderen Arten wie z.B. der kleinblütigen *Nemesia fruticans* weniger robust. Nemesienhybriden, die die positiven Eigenschaften der unterschiedlichen Arten vereinen, werden daher angestrebt. Durch die Arbeiten von Datson et al. (2008) wurden verschiedene IST und ETS Marker, die als Grundlage für die Erstellung eines genetischen Stammbaumes, welcher verschiedene Nemesienarten enthält, genutzt. Die von Datson et al. (2008) durchgeführten Kreuzungsexperimente und phylogenetischen Stammbäume zeigen, dass es in der Gattung *Nemesia* drei Gruppen gibt, die untereinander nicht bzw. nur bedingt kreuzbar sind. Jedoch sind die Arten der Gruppe 1 größtenteils untereinander kreuzbar (Datson und Murry 2006). Ziel des Projektes ist die Analyse und Überwindung der bei Nemesien auftretenden Kreuzungsbarrieren zur Erstellung interspezifischer Nemesienhybriden mit neuen Eigenschaften. Voraussetzung hierfür ist, dass die Befruchtungsmechanismen sowie die bei Nemesien auftretenden Kreuzungsbarrieren eingehend cytologisch und molekulargenetisch identifiziert, untersucht und charakterisiert werden. Die aus diesen Kreuzungen entstehenden Nachkommenschaften werden phänotypisch und molekulargenetisch untersucht. Des Weiteren soll an Beispielkreuzungen die Befruchtungsbiologie, d. h. der Prozess von der Bestäubung bis zur Befruchtung/Samenreife bzw. dem Abort histologisch untersucht und dokumentiert werden. Außerdem sollen die bei *Arabidopsis* an der Embryoentwicklung beteiligten Schlüsselgene bei Nemesien kloniert werden. Darauf aufbauend sollen neue Ansätze für eine stammbaumbasierende Züchtungsstrategie entwickelt bzw. In-vitro- Verfahren zur Überwindung der Kreuzungsbarrieren entwickelt und getestet werden.

○ **Erstellung interspezifischer *Helleborus*-Hybriden:**

Die Gattung *Helleborus* umfasst 22 Arten, die sechs Sektionen zugeordnet sind und sich hinsichtlich Blatt- und Blütenmorphologie, insbesondere Blütenfarbe, und der Resistenz gegenüber der Schwarzfleckenkrankheit (*Coniothyrium hellebori*) unterscheiden. Diese Merkmale sind im Hinblick auf die züchterische Weiterentwicklung der bekannten *Helleborus* Arten wie *Helleborus niger* (Christrose) und *H. x hybridus* (Lenzrose) interessant. Vorbereitend für interspezifische Hybridisierungen wurden verschiedene *Helleborus* Arten cytologisch, durchflusscytometrisch und molekulargenetisch mittels AFLPs charakterisiert. Für alle Arten konnte eine gemeinsame Chromosomenzahl von $2n=32$ ermittelt werden. Die DNA-Gehalte des Kerngenoms variierten zwischen 18,3 pg DNA/2C und 33,2 pg DNA/2C. Basierend auf 1109 AFLP Markern wurden genetische Distanzen ermittelt (Meiners et al. 2011). Mittels blütenbiologischer Untersuchungen wurden die Kreuzungsbarrieren zwischen den *Helleborus* Arten als vorwiegend postzygotisch identifiziert. Mit einem Embryo Rescue Verfahren wurden insgesamt 217 interspezifische Hybriden gewonnen, von denen 14 aus Kreuzungen zwischen Arten stammen, die unterschiedlichen *Helleborus* Sektionen zugeordnet sind (Meiners und Winkelmann 2011). Diese Hybriden wurden zum Teil in durchflusscytometrischen Analysen, zum Teil mit RAPD-Markern verifiziert. Einige dieser Hybriden wird derzeit akklimatisiert, um die Morphologie vor allem der Blüten, die Fertilität und die Kultureigenschaften zu ermitteln.

○ **Somatische Hybriden zwischen *C. persicum* und *C. coum*:**

Cyclamen persicum ist weltweit eine wirtschaftlich bedeutende Zierpflanze, die bisher nur durch Kreuzungen innerhalb der Art züchterisch bearbeitet wurde. Eine Hybridisierung mit Wildarten wäre interessant, um neue Eigenschaften, wie Blattzeichnung, Blütenduft, Krankheitsresistenz, Hitze- oder Kältetoleranz in den Genpool der Kulturcyclamen zu integrieren. Kreuzungen mit *C. coum* waren in der Vergangenheit auch unter Einbeziehung von „Embryo Rescue“-Techniken nicht erfolgreich. Daher wurde in unserer Arbeitsgruppe der Weg der somatischen Hybridisierung eingeschlagen. Zunächst wurden ausgehend von embryogenen Suspensionskulturen Protokolle für die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten von *C. persicum* (Winkelmann et al. 2006) und *C. coum* (Prange et al. 2010) etabliert. Mit Hilfe der Polyethylenglykol (PEG)-vermittelten Protoplastenfusion gelang es erstmals, Hybridpflanzen zu regenerieren (Prange et al. 2011). Die somatischen Hybriden zeigten eine größere Ähnlichkeit zu *C. coum*. Durchflusscytometrische Messungen wiesen einen addierten DNA-Gehalt von beiden elterlichen Arten in den Hybriden nach. Chromosomenuntersuchungen ergaben, dass die *C. persicum* Chromosomen nach und nach eliminiert wurden. Derzeit werden die Hybridpflanzen *in vitro* über somatische Embryogenese verklont, bevor ihre Eigenschaften im Gewächshaus sowie die Konstitution der Plasmakomponenten (Chloroplasten und Mitochondrien) untersucht werden.

***In-vitro*-Vermehrung**

Die *In-vitro*-Kultur wird gerade bei Zierpflanzen als eine Methode der Vermehrung genutzt (Winkelmann et al. 2006b). Zur Unterstützung der Zierpflanzenzüchtung sind *In-vitro*-Techniken in den folgenden Anwendungen realisiert, bzw. denkbar (Tabelle 1). Die Züchtung von Zierpflanzen profitiert seit langem davon, dass es mit Hilfe der *In-vitro*-Kultur gelingt, krankheitsfreies Pflanzenmaterial zu erstellen, zu vermehren und zu lagern. Diese Möglichkeiten haben demzufolge Einzug in fast alle größeren Zierpflanzenzüchtungsunternehmen gehalten, sei es durch Betreiben von eigenen *In-vitro*-Laboratorien, sei es durch Inanspruchnahme von Dienstleistungen. Viele Publikationen existieren für diverse Zierpflanzenarten, problematisch ist jedoch, dass es stets sehr ausgeprägte genotypische Unterschiede in der *In-vitro*-Reaktion gibt, die nach wie vor nicht verstanden sind.

Forschungsbedarf gibt es vor allem bei neuen Zierpflanzen bei der Entwicklung von Vermehrungs- und Regenerationsverfahren, bei der Entwicklung von etwas schwierigeren Techniken, wie Haploidentechniken oder Protoplastenregeneration und -fusion sowie *In-vitro*-Mutagenese. Hier sind Kooperationen mit Forschungseinrichtungen gefragt. Zudem ist es für die weitere Nutzung der *In-vitro*-Kultur für Vermehrung und Züchtung wichtig, die Kulturverfahren weiterzuentwickeln, um qualitativ hochwertige Pflanzen kostengünstig mit möglichst wenig Einsatz von menschlicher Arbeitskraft zu produzieren. Darunter wären

zum Beispiel die temporären Immersionskulturen zu nennen, die technisch und kulturtechnisch noch verbessert werden müssen. Weitere nach wie vor aktuelle Forschungsfragen ergeben sich aus der Problematik von endophytischen Mikroorganismen und der Vermeidung von somaklonaler Variation.

Tab. 1 Anwendungsbereiche pflanzlicher *In-vitro*-Kulturtechniken (verändert nach Pierik 1997)

<i>In-vitro</i> -Kulturtechnik	Anwendungsbereiche
Kultur von zygotischen Embryonen/ <i>Embryo rescue</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Überwindung von Kreuzungsbarrieren, Verhinderung des Absterbens von Embryonen
Kultur von Samen	<ul style="list-style-type: none"> • Verkürzung des Züchtungszyklus • Sterile Aussaat von Orchideen ohne Mykorrhiza
Meristemkultur/Sprossspitzenkultur	<ul style="list-style-type: none"> • Verkürzung des Züchtungszyklus • Eliminierung von Pathogenen, v. a. Viren und Bakterien • Etablierung von <i>In-vitro</i>-Kulturen bei Pflanzenarten, die schwierig zu regenerieren sind, axillare Sprossvermehrung • Kryokonservierung (Langzeitlagerung, gekühlt) • Erhaltung von Schichtchimären
Adventivsprossregeneration	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In-vitro</i>-Mutagenese • Pflanzenvermehrung • Entmischung von Chimären • Genetische Transformation • -Mutagenese
<i>Embryogene Kallus</i> - und Suspensionskulturen	<ul style="list-style-type: none"> • Massenvermehrung über anschließende somatische Embryogenese • Material zur Isolierung von Protoplasten • Gewinnung krankheitsfreien Materials • Selektion von Zelllinien mit spezifischen Eigenschaften • Genetische Transformation • <i>In-vitro</i>-Mutagenese
Antheren-/Mikrosporen-Kultur	<ul style="list-style-type: none"> • Gewinnung von Haploiden und/oder homozygoten Doppelhaploiden • Reduktion der Ploidiestufe zur Vereinfachung der Züchtung • Genetische Transformation
Samenanlagen-/Ovarien-Kultur	<ul style="list-style-type: none"> • Gewinnung von Haploiden und/oder Homozygoten • Reduktion der Ploidiestufe zur Vereinfachung der Züchtung • Verhinderung des Absterbens von Embryonen • <i>In-vitro</i>-Fertilisation • Überwindung von Kreuzungsbarrieren (s.o.: <i>Embryo rescue</i>)
Protoplasten	<ul style="list-style-type: none"> • Genetische Transformation • Somatische Hybridisierung • Gewinnung von Cybriden

○ **Somatische Embryogenese bei *C. persicum*:**

Die somatische Embryogenese ist für *Cyclamen persicum* etabliert und stellt eine Alternative zu der bisherigen, sehr aufwändigen Vermehrung über Samen dar. Die Nutzung der somatischen Embryogenese für die kommerzielle Massenvermehrung ist aufgrund von teilweise auftretenden Entwicklungsstörungen und einer asynchronen Differenzierung immer noch begrenzt. Das System wird allerdings schon zur Verklonung von Eltern von F₁-Hybriden genutzt und war die Basis für die somatischen Hybridisierungen (s.o.: 1.c). Während in der Vergangenheit vor allem „Trial and error“ Ansätze verfolgt wurden, um Verbesserungen in der *In-vitro*-Kultur zu erreichen, zielen jüngere Studien auf das bessere Verständnis der ablaufenden Prozesse ab und die daraus resultierenden Möglichkeiten der Systemoptimierung. Transkriptomische (Rensing et al. 2005, Hönemann et al. 2010) und proteomische Studien (Winkelmann et al. 2006c, Rode et al. 2011a, Rode et al. 2011b) wurden durchgeführt, um die Physiologie der Embryogenese bei *Cyclamen* zu analysieren. Unser Ansatz besteht darin, die zygotischen Embryonen als Vorbild oder ideales Proteinmuster anzusehen und mit den somatischen Embryonen zu vergleichen, um Unterschiede aufzudecken.

Die Proteinaufreinigung wurde dazu für die untersuchten Gewebe optimiert und die darauffolgende zweidimensionale Auftrennung mittels IEF-SDS PAGE resultierte in hochauflösenden Gelen mit über 1000 Proteinspots (Rode 2011). Eine neue Software - GelMap - wurde zur Etablierung und Präsentation von digitalen Proteomreferenzkarten entwickelt (www.gelmap.de, Rode et al. 2011c). In die Referenzkarte von somatischen und zygotischen Embryonen wurden 247 mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteinspots annotiert. Der Vergleich der Proteome von somatischen und zygotischen Embryonen zeigte u.a., dass der Glykolyse eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung der somatischen und zygotischen Embryonen zukam, somatische Embryonen erhöhten Stressbedingungen ausgesetzt waren und in zygotischen Embryonen Speicherproteine stärker abundant waren. Verkürzte Formen des Enzyms Enolase wurden als Kandidaten für eine neue Gruppe von Speicherproteinen in Samen identifiziert. In einer zweiten proteomischen Studie wurde die Entwicklung während der somatischen Embryogenese ausgehend von embryogenem Kallus bis zu torpedoförmigen somatischen Embryonen untersucht. Hierbei wurde eine essentielle Rolle des Ubiquitin/26S-Proteasom Stoffwechselweges für Entwicklung von globulären somatischen Embryonen aus Kallus und von globulären zu torpedoförmigen Embryonen gefunden. Die Behandlung mit Abscisinsäure sowie die Kultivierung von somatischen Embryonen auf Nährmedium mit hohem Saccharosegehalt resultierten in einer verbesserten Reifung und Qualität von somatischen Embryonen (Rode et al. 2011b).

o **Virusfreimachung bei *Dahlia*:**

Als ein weiteres Beispiel für aktuelle Projekte im Bereich *In-vitro*-Kulturtechniken sei eine Masterarbeit genannt, die das Ziel hat, die Viruseliminierung aus *Dahlia* Sorten durch Sprossspitzenkultur und die Entwicklung von schnellen Nachweisverfahren für verschiedene RNA-Viren und einem DNA-Virus zu erreichen.

Genetische Transformation

Für einen erfolgreichen und stabilen Transfer einer Ziel DNA in eine pflanzliche Zelle werden maßgeblich zwei Methoden eingesetzt: Das „Particle bombardment“, d.h. die mechanische Übertragung mittels Gold- oder Wolfram-Partikeln, die mit hohem Druck auf das pflanzliche Gewebe geschossen werden, und der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transfer einer T-DNA. Da die Agrobakterium vermittelte Transformation bei den meisten Zierpflanzenarten zu einer höheren Transformationsrate führt, wird diese Methode jedoch weitaus häufiger eingesetzt. Die genetische Transformation kann zur gezielten Verbesserung von bestimmten Charakteristika bei Zierpflanzen eingesetzt werden (Debener und Winkelmann 2010). Meist kommt diese Methode zum Einsatz, wenn bestimmte Eigenschaften nicht in dem entsprechenden Genpool vorkommen oder nur durch zeitaufwendige Kreuzungsprogramme eingekreuzt werden könnten. Zur Veränderung des Phänotyps können entsprechende Kandidatengene überexprimiert oder aber ausgeschaltet werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet der genetischen Transformation ist die Funktionsanalyse von bestimmten Genen. Auch wenn diese Analysen ausschließlich für die Forschung eingesetzt werden, können sie wichtige Informationen für die Selektion mit molekularen Markern enthalten und damit die Zierpflanzenzüchtung unterstützen. Durch die aus der großen Sorten- und Artenvielfalt entstehende Heterogenität bei Zierpflanzen ist die Übertragung von Transformationsprotokollen von einer Zierpflanzenart zu einer anderen und sogar die Übertragung von einer Sorte auf eine andere meist ausgesprochen schwierig und damit sehr zeitintensiv. Folglich besteht ein wichtiges Ziel darin, Transformationsmethoden zu entwickeln, die bei vielen verschiedenen Pflanzenarten und -sorten effizient angewendet werden können.

In den letzten Jahren wurde die Vermarktung von transgenen Pflanzen mit einem Selektionsgen, und dabei insbesondere mit Antibiotikaresistenzgenen, in der Öffentlichkeit sehr kritisch diskutiert, sodass die Anmeldung von transgenen Pflanzen immer weiter erschwert wurde. Besonders verstärkt wurde dies durch den Erlass der EU-Richtlinie 2001/18/EG (EU-Richtlinie 2001/18/EG), die darauf abzielt, den Gebrauch von Antibiotika-Resistenzgenen mit möglichen schädlichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und Umwelt auszuschließen. Obwohl keine wissenschaftliche Grundlage für diese Bedenken ermittelt werden konnten, würde die Herstellung markerfreier, transgener Pflanzen zweifellos zu einer höheren

Verbraucherakzeptanz führen (De Vetten et al. 2003). Aus diesem Grund besteht ein weiteres Ziel darin, die für die Transformation verwendeten Selektionsgene zu eliminieren.

○ **Entwicklung von Technologien zur effizienten Herstellung markerfreier Zierpflanzen:**

Der größte Anteil der heute genutzten Transformationsmethoden basiert auf bakteriellen Genen, das sind zum einen Selektionsgene (z.B. Antibiotikaresistenz), aber auch Gene zur anschließenden Eliminierung von unerwünschten Sequenzen (z.B. Rekombinasen). Die in den letzten Jahren durchgeführten großen Genomprojekte lieferten Informationen, die Strategien zur Optimierung von Genen bzw. dessen Codonstrukturen für dikotyle Pflanzenarten ermöglichen. Damit stehen neue Werkzeuge zur Verfügung, mit denen bakterielle Gene für den pflanzlichen Organismus optimiert werden können, sodass eine bessere Verträglichkeit und eine erhöhte Aktivität im pflanzlichen Zielorganismus zu erreichen ist. Die mit Hilfe dieser neuen Methode optimierten Gene werden in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen für die Transformation von Zierpflanzenarten getestet. Ein weiteres Ziel des Projektes besteht darin, die für die Transformation verwendeten optimierten Selektionsgene mittels eines codonoptimierten, sequenzspezifischen Rekombinationssystems zu eliminieren. Weiterhin sollen Strategien zur Optimierung von binären Vektoren verfolgt werden, die eine höhere Plasmidstabilität und damit eine bessere Transformationsrate und Reproduzierbarkeit von Transformationen bei Pflanzen ermöglichen. Zielsetzung des mit Züchtern durchgeführten ZIM (Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand) Projektes ist die Entwicklung von neuen Transformationstechnologien zur effizienten Herstellung von transgenen Zierpflanzen, die frei von Selektionsgenen sind. Des Weiteren kann durch die Eliminierung der Selektionsgene ein großer Beitrag zur breiteren Akzeptanz von gentechnisch veränderten Zierpflanzen in der Öffentlichkeit erbracht werden.

○ **Verbesserung der Blütenhaltbarkeit:**

Bei vielen Zierpflanzenarten werden die Blütenseneszenz und die Blütenabscission durch das gasförmige Phytohormon Ethylen induziert (Woltering und Van Doorn 1988). Zierpflanzenarten, die besonders stark auf Ethylen reagieren, sind z.B. *Campanula*, *Kalanchoë*, *Pelargonium*, *Delphinium*, *Dianthus* und *Petunia*. Bis heute konnte jedoch bei keiner dieser untersuchten Pflanzenarten eine Ethyleninsensitivität beobachtet werden, sodass nur eine genetische Transformation zu dieser Eigenschaft führt. In bereits abgeschlossenen Projekten wurde in Kooperation mit der Universität Kopenhagen und verschiedenen Zierpflanzenzüchtern das Gen eines mutierten Ethylenrezeptors (*etr1-1*) aus *Arabidopsis* mit einer Agrobakterium vermittelter Transformation auf verschiedene *Kalanchoë*, *Oncidium* und *Odontoglossum*-Hybriden sowie *Campanula* Arten übertragen (Sriskandarajah et al. 2007, 2008; Sanikhani et al. 2008, Raffener et al. 2009). Durch die dominante Ausprägung des Gens *etr1-1* konnten bei beiden Pflanzenarten transgene Linien selektiert werden, die eine Ethyleninsensitivität der Blüten zeigten. Bei *Campanula carpartica* 'Blue Uniform' zeigten einige transgene Genotypen auch nach 27 Tagen bei 1,5 ppm Ethylen keine Blütenseneszenz (Sriskandarajah et al. 2007). Da das Ethylen als Phytohormon einen entscheidenden Einfluss auf viele physiologische Prozesse der Pflanzen hat, würde eine Ethyleninsensitivität in der gesamten transgenen Pflanze zu negativen morphologischen Veränderungen führen (z.B. Inhibierung der Wurzelentwicklung). Um diese Seiteneffekte auszuschließen und die Ethyleninsensitivität auf das Blütengewebe zu beschränken, kam ein blütenspezifischer Promoter (*fbp1*) aus der Petunie, der vor das *etr1-1* Gen kloniert wurde, zum Einsatz. Damit gelang es, eine hohe Blütenspezifität des Merkmals der Ethyleninsensitivität zu erreichen (Sriskandarajah et al. 2007; Sanikhani et al. 2008). Durch Kreuzungsversuche konnte eine stabile Vererbung der blütenspezifischen Ethyleninsensitivität bis zur T₄ nachgewiesen werden. Durch das Einkreuzen des neuen Merkmals in unterschiedliche *Kalanchoë* Wildformen (z. B. *K. campanulata* und *K. laciniata*) konnte die Funktion des Gens *etr1-1* und des Promotors *fbp1* in unterschiedlichen genetischen Hintergründen nachgewiesen werden.

○ **Beeinflussung des Habitus:**

Durch die immer restriktiveren Zulassungsverfahren für Wachstumsregulatoren wird die Produktion von kompakten Zierpflanzen immer schwieriger. Auch ein züchterischer Ansatz mit dem Ziel kompakt wachsender Sorten ist meist schwierig, da dieses Merkmal sehr häufig mit einer Schwachwüchsigkeit und mit kleinen Blüten korreliert ist. In den letzten Jahren konnten die molekulargenetischen Mechanismen des Längenwachstums bei Modellpflanzen immer weiter aufgeklärt werden. Damit wurde es möglich, durch eine gezielte genetische Modifikationen die Gibberellinsynthese und damit das Längenwachstum zu beeinflussen. In einem Doktorandenprojekt wurde das Gen der *GA₂oxidase* (*GA₂ox*) unter einem konstitutiven oder stängelspezifischen Promoter mittels Agrobakterium vermittelter Transformation auf *Kalanchoe* und *Petunia* übertragen. Das damit hochregulierte Enzym *GA₂ox* führt in den transgenen Linien zu einer Deaktivierung der biologisch aktiven Form *GA₃* und damit zu einer Reduktion des Längenwachstums (Stavang et al., 2005, 2007). Transgene Linien mit einem konstitutiven Promoter zeigen jedoch diverse Seiteneffekte, wie zum Beispiel eine verzögerte Blüteninduktion, kleine Blüten und Blätter und eine allgemein schwache Wüchsigkeit. Jedoch konnten durch den Einsatz eines stängelspezifischen Promotors aus *Pisum sativum* die Seiteneffekte weitgehend unterdrückt werden, sodass eine spezifische Wirkung der *GA₂oxidase* in der Zellstreckungsphase der Internodien erreicht wurde. Aufgrund von zuvor durchgeführten Testtransformationen mit unterschiedlichen Promotoren in Kombination mit Markergenen (*GUS* und *GFP*) konnte die Organspezifität des modifizierten *PAL1* Promoters für die Zielorganismen *Petunia* und *Kalanchoe* untersucht und nachgewiesen werden.

○ **Beeinflussung der Reaktion auf abiotischen Stress (Kühletoleranz):**

Abiotischer Stress (z.B. Kühlestress) führt bei der Produktion von Zierpflanzen häufig zu Qualitätseinbußen, zu einer Verlängerung der Kulturzeit und/oder zu hohen Ausfallquoten, die die Wirtschaftlichkeit der Kultur in Frage stellen. Pflanzen sind in der Lage, sich an niedrige Temperaturen anzupassen und können so notwendige biochemische Prozesse aufrechterhalten. Eine solche physiologische Anpassung hat zum Beispiel die Veränderungen der Zellmembranen oder die Modifizierung des Wasserhaushaltes zur Folge (Pearce 1999). Diese als Kühleadaptation bezeichnete Reaktion der Pflanzen ist sowohl auf biochemischer als auch auf der Ebene der Genregulation bei Modellpflanzen untersucht worden. So konnten in den letzten Jahren Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden, die es der Pflanze ermöglichen, spezifisch auf abiotischen Stress (z.B. niedrige Temperaturen) zu antworten. Die meisten dieser Transkriptionsfaktoren konnten in die bisher ausschließlich in Pflanzen nachgewiesene *AP2/ERF* Genfamilie eingeordnet werden. Diese Genfamilie ist eine große Gruppe von Genen, die für Proteine kodieren, die im Promotorbereich binden (cis Element) und als Aktivatoren die Transkription eines Gens stimulieren oder als Repressoren die Expression unterbinden können. Benannt wurde die *AP2/ERF* Genfamilie nach dem zuerst isolierten Protein mit zwei repetitiven AP2 Domänen, dem APETALA2 Protein aus *Arabidopsis thaliana* (Jofuku et al. 1994). Aus Ethephon behandelten Tabakblättern wurden die ersten Gene, die nur für eine AP2 Domäne codieren, isoliert. Sie werden daher als Ethylene Responsive Element Binding Proteins (EREBP) bzw. als Ethylene Responsive Element Binding Factors (ERF) bezeichnet (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995). Ziel des Projektes (Verbundprojekte „Terminproduktion von Zierpflanzen in Gewächshäusern (Kühletoleranz)“, WeGa Netzwerk) ist es, an der Modellpflanze *Petunia* *AP2/ERF* Transkriptionsfaktoren unter Einfluss von niedrigen Temperaturen zu untersuchen und anschließend die Expression von selektierten Kandidatengenen durch eine Transformation zu verstärken oder auszuschalten. Die *AP2/ERF* homologen Transkriptionsfaktoren wurden mittels Analysen in EST Datenbanken (z.B. NCBI) selektiert, kloniert und sequenziert. In laufenden Funktionsanalysen werden alle isolierten *AP2/ERF* Transkriptionsfaktoren mittels Virus Induced Gene Silencing (VIGS) (Cheng et al. 2005) bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Nach diesem Funktionsscreening der *AP2/ERF* Transkriptionsfaktoren werden selektierte Transformationsvektoren unter der Kontrolle eines konstitutiven 35S Promotors überexprimiert oder durch einen RNAi Ansatz mittels Transformation einer cDNA palindrom Sequenz gesilenced. Diese transgenen Petunien stehen dann für weitere Kühletoleranz-Versuche in Kooperation mit den Projektteilnehmern zur Verfügung. Die so selektierten transgenen Petunien mit einer erhöhten Kühletoleranz werden anschließend auf ihre gartenbaulichen Eigenschaften getestet.

○ **Grundlegende Untersuchung von Genfunktionen:**

Zur Zeit werden *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformationssysteme für *Cyclamen persicum* und *Phalaenopsis* Hybriden entwickelt. Diese sollen dazu genutzt werden, durch Überexpression bzw. Herabregulierung über RNAi-Ansätze die Funktion von Genen zu studieren. Bei *C. persicum* werden dies Gene sein, die in der somatischen Embryogenese eine Schlüsselrolle einnehmen, die zur Zeit in proteomischen Studien identifiziert werden (s.o.: 2.a). Bei *Phalaenopsis* wäre das Transformationssystem nötig, um Gene, die den Blütezeitpunkt in Modellpflanzen steuern, auf ihre Funktion in *Phalaenopsis* zu untersuchen.

Molekulargenetische Analysen von Kandidatengen

In den letzten Jahren konnte die Funktion vieler Gene und damit die molekulargenetischen Mechanismen diverser Eigenschaften (z.B. Blüteninduktion, Wurzelinduktion und Blütenmorphologie) bei Modellpflanzen (insb. *Arabidopsis*) aufgeklärt werden. Hingegen konnten bei Zierpflanzen durch das breite Artenspektrum und nur eingeschränkte Genom- bzw. Sequenzinformationen nur wenige molekulargenetische Zusammenhänge untersucht und aufgeklärt werden. Die stetig wachsenden Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung mit Modellpflanzen können jedoch bei der Analyse von gärtnerisch und pflanzenzüchterisch relevanten Merkmalen bei Zierpflanzenarten genutzt werden, sodass eine Aufklärung bestimmter physiologischer Eigenschaften beschleunigt werden kann. Diese auf die Zierpflanzen zu übertragenden Erkenntnisse können dann zur Sortencharakterisierung und zur gezielten Selektion bei der Züchtung neuer Sorten eingesetzt werden.

○ **Thermoperiodische Reaktion bei *Petunia*:**

Temperaturregelstrategien finden seit vielen Jahren in der konventionellen Zierpflanzenproduktion erfolgreiche Anwendung bei der Reduzierung des unerwünschten Streckungswachstums. Bei der Analyse der thermoperiodischen Inhibierung des Streckungswachstums von *Pisum sativum* konnte nachgewiesen werden, dass die Transkriptionsregulierung der *GA2oxidase*, die zur Deaktivierung der biologisch aktiven Gibberelline führt, eine Schlüsselrolle spielt (Stavang et al., 2005, 2007). Zur Aufklärung der molekulargenetischen Mechanismen der thermoperiodischen Inhibierung des Streckungswachstums bei Zierpflanzen wurden bei *Petunia* vier bisher unbekannte *GA2oxidase* Gene kloniert und analysiert. Die Expressionsanalysen des *PhGA2ox2* Gens zeigten, dass die relative *PhGA2ox2* Transkriptkonzentration in den Sprossspitzen bei *P. hybrida* durch eine kurzzeitige Temperaturabsenkung mit einer Verzögerung um das 8-fache anstieg. Die Ergebnisse weisen auf eine temperaturabhängige Expression des *PhGA2ox2* Gens hin. Die bei *P. hybrida* durch eine Temperaturabsenkung bei Dunkelheit hervorgerufene Hemmung des Streckungswachstums könnte daher vermutlich auf eine reduzierte Konzentration bioaktiver GAs infolge der erhöhten relativen *PhGA2ox2* Expression zurückgeführt werden. Da die *GA2oxidasen* durch eine Multigenfamilie codiert werden, besteht das momentane Ziel, weitere *GA2oxidasen* auf ihre Transkription und Funktion bei unterschiedlichen Umweltbedingungen zu analysieren.

○ **Blatt- und Blüten-Abscission bei Rosen:**

Ethylen zeigt bei Topfrosen viele Effekte, die zu einer Verringerung der Nacherntequalität führen: zum Beispiel das Abwerfen von Blättern, die Blütenseneszenz und den Verlust von Knospen und Blüten. Um ethyleninduzierte Gene zu isolieren wurde eine Differential Display RT-PCR bei ethylenbehandelten Topfrosen durchgeführt. Insgesamt konnten 88 hochregulierte und 72 herunterregulierte Gene kloniert werden. Von 17 hochregulierten cDNA Fragmenten wurde die Expression in unterschiedlichen Gewebebereichen der Blattstiele und Blütenstiele analysiert (Ahmadi et al. 2008). Bei den dann folgenden Arbeiten wurde ein ethyleninduziertes, laccasehomologes Gen, das als *RhLAC* bezeichnet wurde, selektiert. Diese *RhLAC* wird bereits wenige Stunden nach einer Ethylenapplikation in der Abscissionszone hochreguliert. Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz dieses Gens zeigt eine Homologie von 58% zu einer möglichen Laccase aus *Zea mays* und eine Homologie von 56% zu der Laccase 15 aus *Arabidopsis thaliana* (Ahmadi et al. 2008). Um die Funktion der Laccase zu charakterisieren, wurde die Translation des *RhLAC*-homologen Gens bei *Nicotiana benthamiana* mittels „Virus-Induced Gene Silencing“ (VIGS) unterdrückt. In Pflanzen mit

unterdrücktem *RhLAC* Gen kam es zur Vergilbung und schließlich zum Absterben der Blätter, vergleichbar mit den Symptomen von ethylenbehandelten Kontrollpflanzen. Um den genetischen Einfluss der Ethylensensitivität auf die Blatt- und Knospenabscission zu analysieren, wurden unterschiedliche F₁ Nachkommenschaften untersucht, sodass Genotypen mit geringer und hoher Ethylensensitivität selektiert werden konnten (Ahmadi et al. 2009). Transkriptionsanalysen verschiedener Ethylenrezeptor-Gene (*RhETRI/3*) und Ethylen-Signal-Transduktions-Gene (*RhCTR1/2*) konnten nicht mit der Ethylensensitivität der untersuchten Genotypen korreliert werden. Hingegen konnte die ethyleninduzierte Expression der Laccase (*RhLAC*) in allen untersuchten Genotypen mit der Ethylensensitivität korreliert werden (Ahmadi et al. 2009).

o Blütenfüllung bei Rosen:

Wichtige morphologische Eigenschaften bei Rosen sind die Blütenfarbe, die Blütenform und die Blütenfüllung. Eine erhöhte Anzahl von Petalen geht immer mit einer Reduzierung der Antheren einher, sodass ein homeotischer Wechsel von Antheren zu Petalen bei den gefüllten Blütenformen angenommen werden kann. Innerhalb der letzten 20 Jahre konnte die Blütenorganentwicklung bei den Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* (Bowman et al. 1991) und *Antirrhinum majus* (Coen et al. 1990; Schwarz-Sommer et al. 1990) auf molekulargenetischer Ebene aufgeklärt werden. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte eine Klassifizierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren (MADS box Gene) in Meristem- und Organidentitätsgenen erfolgen und das ABC(DE)-Modell abgeleitet werden.

Die meisten Organidentitätsgene (B-, C- and E- Funktionsgene) konnten bei Wildrosen (*Rosa rugosa* Thumb. Ex Murray) bereits kloniert werden (Chmelnitsky et al. 2003; Matsumoto und Kitahara 2005). Bis vor kurzen gab es jedoch keine Informationen zu den A-Funktionsgenen (*Apetala1* und *Fruitfull*) bei der Rose, sodass die A-Funktionsgene (*RhAPI-1*, *RhAPI-2*, und *RhFUL*) kloniert und dessen Expressionsprofil in unterschiedlichen Blütentypen analysiert wurden. Damit konnten, entsprechend der Transkriptionsmuster bei anderen Pflanzenarten, eine exklusive Expression der Gene *RhAPI-1* und *RhAPI-2* in Sepalen und Pedalen nachgewiesen werden. Hingegen konnten die Transkripte des Gens *RhFUL* nur in den Sepalen nachgewiesen werden (Mibus et al. 2011). Zur Untersuchung von unterschiedlichen Blütenformen wurden die Organidentitätsgene A-, B- und C- Funktionsgene mittels quantitativer Expressionsanalysen in den Blütenorganen untersucht. Das Expressionsmuster der B-Funktionsgene zeigte keinen Unterschied zwischen der gefüllten und ungefüllten Blüte. Der Vergleich der Expressionsmuster der C- und A- Funktionsgene zeigte jedoch im zentralen Bereich des Blütenmeristems der gefüllten Blüten eine unterdrückte Expression der Gene *RhC1* und *RhC2* und eine Erhöhung der *RhAPI-1*, *RhAPI-2* und *RhFUL* Transkripte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Unterdrückung der C-Funktionsgene zur Erhöhung der Petalenanzahl führt (MIBUS et al. 2011).

Danksagung

Die Autoren danken den folgenden Fördermittelgebern sehr für die finanzielle Unterstützung der Forschungsprojekte: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (im Rahmen von ProInno und ZIM) Bundesministerium für Landwirtschaft und Verbraucherschutz (über BLE) und Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Literatur

- Ahmadi, N., H. Mibus und M. Serek, 2008: Isolation of an ethylene induced putative nucleotide laccase in miniature roses (*Rosa hybrida* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* 27:320-330
- Ahmadi, N., H. Mibus und M. Serek, 2009: Characterization of ethylene-induced organ abscission in F1 breeding lines of miniature roses (*Rosa hybrida* L.). *Postharvest Biology and Technology* 27 (4):320-330
- Bowman J.L., Smyth D.R., und E.M. Meyerowitz, 1991: Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*. 112:1-20
- Chen, J.C., Jiang, C.Z. und M.S. Reid, 2005: Silencing a prohibitin alters plant development and senescence. *Plant J.* 44:16-24
- Chmelnitsky I., Khayat E., und N. Zieslin, 2003: Involvement of RAG, a rose homologue of AGAMOUS, in phyllody development of *Rosa hybrida* cv. Motrea. *Plant Growth Regulation* 39:63-66

- CPVO, 2007: Annual report. Community Plant Variety office. <http://www.cpvo.europa.eu/main/de/home/dokumente-und-veroeffentlichungen/jahresbericht>
- Coen E.S., Romero J.M., Doyle S., Elliot R., Murphy G. und R. Carpenter, 1990: Floricaula: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322
- Datson, P.M. und B.G. Murray, 2006: Pollination systems, hybridization barriers and meiotic chromosome behaviour in *Nemesia* hybrids. *Euphytica*, 151:173-185
- Datson, P.M.; Murray, B.G. und K.E. Steiner, 2008: Climate and the evolution of annual / perennial life histories in *Nemesia* (Scrophulariaceae). *Pl. Syst. Evol.* 270:39-57
- Debener, T. und T. Winkelmann, 2010: Ornamentals. S. 369-391 in: Kempken, F und C. Jung (Hrsg.): Genetic Modification of Plants, Vol. 64 Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg
- De Vetten N., Wolters A.-M., Raemakers K., van der Meer I., ter Stege R., Heeres E., Heeres P., und R. Visser, 2003: A transformation method for obtaining marker-free plants of across-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology*, 21:439-442
- EU- Richtlinie 2001/18/EG : Über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. http://www.bfr.bund.de/cm/208/richtlinie_2001_18_eg_ueber_die_absichtliche_freisetzung.pdf
- Hönemann, C., Richardt, S., Krüger, K., Zimmer, A.D., Hohe, A. und S.A. Rensing, 2010: Large impact of the apoplast on somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* offers possibilities for improved developmental control in vitro. *BMC Plant Biol* 10:77
- Jiang, J. und B.S. Gill, 2006: Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G.W., Van Montagu, M. und J.K. Okamoto, 1994: Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell* 6:1211-1225
- Khatun, S. und T.J. Flowers, 1995: The estimation of pollen viability in rice. *J. Exp. Bot.* 46:151-154
- Matsumoto S. und K. Kitahara, 2005: MADS-box genes in rose: Expression analysis of *Agamous*, *Pistillata3* and *Sepallata* homologue genes in the green rose. *Acta Hort.* 690:203-210
- Meiners, J. und T. Winkelmann, 2011: Evaluation of reproductive barriers and realisation of interspecific hybridisations depending on the genetic distances between species in the genus *Helleborus*. *Plant Biol.* (submitted)
- Meiners, J., Debener, T., Schweizer, G. und T. Winkelmann, 2011: Analysis of the taxonomic subdivision within the genus *Helleborus* by nuclear DNA content and genome-wide DNA markers. *Scientia Horticulturae* 128:38-47
- Meyer, L., 2006: Somatische Hybridisierungen zwischen Vertretern der Gattungen *Petunia* und *Calibrachoa*. Dissertation, Leibniz Universität Hannover
- Mibus H., Heckl D. und M. Serek, 2011: Cloning and Characterization of Three *APETALA1/FRUITFULL*-like Genes in Different Flower Types of *Rosa x hybrida* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 30 (3):272-285
- Ohme-Takagi, M. und H. Shinshi, 1995: Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* 7:173-182
- Pearce, R.S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* 29:47-76
- Pierik, R.L.M. 1997: In Vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht
- Prange, A.N.S., Serek, M., Bartsch, M. und T. Winkelmann, 2010: Efficient and stable regeneration from protoplasts of *Cyclamen coum* Miller via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 101:171-182
- Prange, A.N.S., Bartsch, M., Meiners, J., Serek, M. und T. Winkelmann, 2011: Interspecific somatic hybrids between *Cyclamen persicum* and *C. coum*, two sexually incompatible species. *Plant Cell Rep.* (submitted)
- Raffeiner, B., Serek, M., und T. Winkelmann, 2009: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Oncidium* and *Odontoglossum* orchid species with the ethylene receptor mutant gene *etr1-1*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 98:125-134
- Raina, S.N. und V. Rani, 2001: GISH technology in plant genome research. *Methods in Cell Science* 23:83-104
- Rensing, S.A., Lang, D., Schumann, E., Reski, R. und A. Hohe, 2005: EST sequencing from embryogenic *Cyclamen persicum* cell cultures identifies a high proportion of transcripts homologous to plant genes involved in somatic embryogenesis. *J. Plant Growth Regul.* 24:102-115
- Rode, C., 2011: A proteomic dissection of embryogenesis in *Cyclamen persicum*. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Rode, C., Winkelmann, T., Meyer, L. und T. Debener, 2010: The ethylene 2 receptor gene as a robust molecular marker for intergeneric somatic hybrids between *Petunia* and *Calibrachoa*. *Plant Breed.* 129:448-453
- Rode, C., Gallien, S., Heintz, D., van Dorsselaer, A., Braun, H.-P. und T. Winkelmann, 2011a: Enolases: Storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol* 75:305-319

- Rode, C., Lindhorst, K., Braun, H.P. und T. Winkelmann, 2011b: From callus to embryo - a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum* Mill. *Planta* (submitted)
- Rode, C., Senkler, M., Klodmann, J., Winkelmann, T. und H.-P. Braun, 2011c: GelMap – A novel software tool for building and presenting proteome reference maps. *Journal of Proteomics* 74:2214-2219
- Sanikhani M., H. Mibus, B.M. Stummann und M. Serek 2008: *Kalanchoe blossfeldiana* plants expressing the *Arabidopsis* *etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep.* 27:729-737
- Schwarz-Sommer Z.S., Huijser P., Nacken W., Saedeler H., und H. Sommer, 1990: Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250: 931-936
- Singsit, C. und R.E. Hanneman, 1991: Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. *Plant Cell Rep.* 9:475-478
- Sriskandarajah, S., H. Mibus und M. Serek, 2007: Transgenic *Campanula carpatica* plants with reduced ethylene sensitivity showing specific expression of *etr1-1* in flowers and buds. *Plant Cell Rep.* 26: 805-813
- Sriskandarajah, S., H. Mibus und M. Serek, 2008: Regeneration and transformation of adult plants of four campanula species. *Plant Cell Rep.* 27:1713-1720
- Stavang, J.A., Lindgard, B., Eernten, A., Lid, S.E., Moe, R. und J.E. Olsen, 2005: Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiology* 138:2344-2353
- Stavang, J.A., Juntilla, O., Moe, R. und J.E. Olsen, 2007: Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea. *Journal of Experimental Botany* 58 (11):3061-3069
- Van Tuyl J.M., Van Dijken A., Chi H.S., Lim K.B., Vilmoes S. und B.C.E. Van Kronenburg, 2000: Breakthroughs in interspecific hybridisation of lily. *Acta Hort.* 508:83-88
- Widholm, J., 1972: The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47:189-194
- Winkelmann, T., Specht, J. und M. Serek, 2006a: Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86:337-347
- Winkelmann, T., Geier, T. und W. Preil, 2006b: Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86:319-327
- Winkelmann, T., Heintz, D., van Dorsselaer, A., Serek, M. und H.-P. Braun, 2006c: Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta* 224:508-519
- Winkelmann, T., Doil, A., Reinhardt, S. und A. Ewald, 2010: Embryo rescue. S. 79-95 in: Davey, M. und P. Anthony (Eds.): *Plant Cell Culture – Essential Methods*. Wiley VCH Weinheim
- Woltering, E. J. und W. G. Van Doorn, 1988: Role of Ethylene in Senescence of Petals Morphological and Taxonomical Relationships. *Journal of Experimental Botany*, 39:1605-1616

Methodische Ansätze zur Verbesserung der Trockenstresstoleranz durch markergestützte Selektion

Enhancing drought stress tolerance by marker assisted selection procedures

Ordon, Frank; Seddig, Sylvia; Bartelmann, Anne; Balko, Christiane
Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz,
Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg
Tel.: ++49 3946 47-602; E-Mail: Frank.ordon@jki.bund.de

DOI: 10.5073/jka.2011.433.006

Zusammenfassung

Die Trockenstresstoleranz von Kulturpflanzen tritt aufgrund des Klimawandels zunehmend in den pflanzenzüchterischen Fokus. Eine sichere Selektion anhand des Phänotyps erfordert kontrollierte Bedingungen, ist sehr arbeitsintensiv und damit nur schwer in den praktischen Zuchtbetrieb zu integrieren. Aus diesem Grund sind molekulare Marker von besonderer Bedeutung im Hinblick auf eine Verbesserung der Trockenstresstoleranz. Möglichkeiten der Entwicklung und Nutzung molekularer Marker werden aufgezeigt.

Stichwörter: Trockenstresstoleranz, Molekulare Marker, markergestützte Selektion