

Josefine Engel

Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz

Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst

Untersuchungen zur Resistenz von Pelargonien gegen die Bakterien *Xanthomonas hortorum* (pv. *pelargonii*) und *Ralstonia solanacearum* sowie Etablierung von biotechnologischen und molekularen Methoden zur züchterischen Nutzung derartiger Resistenzmerkmale



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

**Kontakt:**

Josefine Engel  
Heinrichstraße 05  
06484 Quedlinburg

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind oder herausragende eigenständige Arbeiten aus den Forschungsgebieten des JKI darstellen.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot [www.jki.bund.de](http://www.jki.bund.de) Bereich Veröffentlichungen.

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.  
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.  
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:  
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation  
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische  
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-930037-98-8

**Herausgeber / Editor**

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland  
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2013.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

**Untersuchungen zur Resistenz von Pelargonien gegen  
die Bakterien *Xanthomonas hortorum* (pv. *pelargonii*)  
und *Ralstonia solanacearum* sowie Etablierung von  
biotechnologischen und molekularen Methoden zur  
züchterischen Nutzung derartiger Resistenzmerkmale**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades eines  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von Josefine Engel

geboren am 08.12.1981

in Prenzlau

Greifswald, Februar 2013

Dekan: Prof. Dr. Klaus Fesser

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Frieder Schauer
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Christa Volkmar

Tag der Promotion: 20.08.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 DIE PELARGONIE ALS ZIERPFLANZE .....	5
1.2 BEDEUTENDE BAKTERIOSEN AN PELARGONIEN.....	6
1.3 RESISTENZZÜCHTUNG UND RESISTENZMECHANISMEN .....	9
1.4 KREUZUNGSBARRIEREN BEI PELARGONIEN .....	11
1.5 SOMATISCHE HYBRIDISIERUNG .....	13
1.6 ZIELSTELLUNG.....	17
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1 RESISTENZEVALUIERUNG.....	18
2.1.1 Methodenentwicklung.....	21
2.1.1.1 <i>Xanthomonas</i> -Test .....	21
2.1.1.2 <i>Ralstonia</i> -Test .....	24
2.1.2 Virulenzanalysen .....	24
2.1.3 Durchführung der Resistenzprüfung.....	24
2.1.4 Gewinnung von Bakterientoxinen.....	25
2.2 IN-VITRO-PFLANZENMATERIAL.....	26
2.2.1 Kulturbedingungen In-vitro-Pflanzen .....	26
2.2.2 Suspensionskulturen .....	26
2.3 PROTOPLASTENISOLIERUNG.....	27
2.3.1 Isolierung und Aufarbeitung von Mesophyll-, Suspensions- und Petalenprotoplasten.....	27
2.3.2 Bestimmung der Protoplastendichte .....	28
2.3.3 Färbung der Suspensionsprotoplasten mit Rhodamin G und CellTracker Blue .....	29
2.3.4 Inaktivierung der Protoplasten durch UV-Bestrahlung .....	29
2.4 PROTOPLASTENFUSION.....	30
2.4.1 Fusionen mit Polyethyleneglycol (PEG).....	30
2.4.2 Elektrofusion .....	30
2.4.3 Bestimmung der Vitalitäts-, Heterofusions- und Teilungsrate.....	31
2.5 KULTIVIERUNG UND REGENERATION DER PROTOPLASTEN .....	32
2.5.1 Flüssigkultur der Protoplasten .....	32
2.5.2 Kalluskultur und Sprossregeneration aus Protoplasten .....	33
2.5.3 Einsatz verschiedener Zusatzstoffe während der Regeneration.....	34
2.5.4 Überführung der Regenerate .....	35
2.6 CHARAKTERISIERUNG DER REGENERATE.....	36
2.6.1 Messung des DNA - Gehaltes mittels Flowcytometrie (FCM) .....	36
2.6.2.1 DNA Isolierung und Bestimmung der DNA Konzentration.....	37
2.6.2.2 Molekulargenetische Untersuchungen mit Hilfe von Mikrosatelliten .....	39
2.6.3 Zytologische Charakterisierung der Regenerate mittels Genomischer-in-situ- Hybridisierung (GISH) .....	40
2.6.4 Inhaltsstoffanalyse .....	41
2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	42

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1 RESISTENZEVALUIERUNG .....	43
3.1.1 Methodenentwicklung .....	43
3.1.1.1 <i>Xanthomonas</i> -Test .....	43
3.1.1.2 <i>Ralstonia</i> -Test .....	43
3.1.2 Virulenzanalysen .....	44
3.1.3 Ergebnisse der Resistenztestungen .....	48
3.1.4 Statistische Auswertung der Resistenztestungen.....	55
3.2 PROTOPLASTENISOLIERUNG .....	58
3.2.1 Isolierung von Mesophyllprotoplasten.....	59
3.2.2 Isolierung von Suspensionsprotoplasten.....	62
3.2.3 Isolierung von Petalenprotoplasten .....	63
3.3 PROTOPLASTENFUSIONEN .....	63
3.4 PROTOPLASTENREGENERATION .....	65
3.4.1 Einfluss verschiedener Zusatzstoffe auf die Protoplastenregeneration .....	66
3.5 CHARAKTERISIERUNG DER REGENERATE AUS PROTOPLASTENFUSIONEN.....	68
3.5.1 Phänotypische Charakterisierung der Regenerate .....	68
3.5.2 Messung des DNA – Gehaltes mittels Flowcytometrie (FCM).....	69
3.5.2 Molekulargenetische Untersuchung .....	72
3.5.4 Zytologische Charakterisierung der Fusionate mittels GISH .....	80
3.5.5. Inhaltsstoffanalyse .....	81
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>85</b>
4.1 RESISTENZEVALUIERUNG .....	85
4.2 PROTOPLASTENFUSION .....	91
4.2.1 Protoplastenkultur und –regeneration.....	94
4.3 CHARAKTERISIERUNG DER REGENERATPFLANZEN.....	98
<b>7. Literatur .....</b>	<b>109</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>124</b>

## Abkürzungen

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
2,4 D	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure
2ip	6-(Dimethylallylamino)purin
APS	Ammoniumpersulfat
BAP	Benzylaminopurin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELFU	Elektrofusion
FDA	Fluoresceindiacetat
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung (9,81 m*s <sup>-2</sup> )
g	Gramm
GISH	Genomische-in-situ-Hybridisierung
GSPB	Göttinger Sammlung Phytopathogener Bakterien
h	Stunde
IES	Indol-3-essigsäure
kb	Kilobasen
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MS	Murashige und Skoog
MW	Mittelwert
N	Anzahl der Wiederholungen
NAA	1 Naphthylessigsäure
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
PCR	Polymerase Chain Reaction

## Abkürzungen

pg	Picogramm
PEG	Polyethylenglycol
PI	Propidiumiodid
PMSV	Pelargonium-Medium-Sprossverlängerung
PPM	Pelargonium-Protoplasten-Medium
PRM	Protoplasten-Regenerations-Medium
RNAse	Ribonuklease
<i>Rs</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
RT	Raumtemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
<i>Xhp</i>	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>
YDC	Yeast dextrose carbonate



# 1. Einleitung

## 1.1 Die Pelargonie als Zierpflanze

Die Gattungsbezeichnung *Pelargonium* geht auf den Botaniker CHARLES-LOUIS L'HÉRITIER DE BRUTELLE (1746-1800) zurück, der in seinem Werk „Geraniologia“ (1792) 82 Arten beschrieb und diese einer eigenen Gattung zuordnete. Die Gattung *Pelargonium* unterscheidet sich von den vier weiteren Gattungen (*Geranium*, *Erodium*, *Monsonia*, *Sarcocaulon*) der Geraniaceae durch einen zygomorphen Blütenbau, den Nektarsporn und durch maximal sieben fertile, der insgesamt zehn Staubblätter (KOŁODZIEJ *et al.* 1995). Die Heimat der überwiegend krautigen, ein- bis mehrjährigen Pelargonien ist Südafrika, einige Arten sind aber auch in Australien, Neuseeland und Anatolien beheimatet. Die Gattung *Pelargonium* ist nach heutigem Stand in 16 Sektionen mit mehr als 250 Arten unterteilt (BAKKER *et al.* 1999).

Vermutlich brachten Handelsreisende die ersten Pelargonien aus Südafrika nach Europa. Der Botaniker Francis Masson (1741-1805) sorgte dafür, dass ca. 47 Pelargonien-Arten nach England eingeführt wurden. Gärtner und Pflanzenliebhaber begannen, die eingeführten Arten züchterisch zu bearbeiten. Dadurch entstanden viele Hybriden, die man als Vorläufer der Edelpelargonien einordnet. Das Blütenspektrum der heute wichtigsten *P. x hortorum* Sorten umfasst die Farben weiß bis rot mit vielen Mischformen und einigen Gelbtönen.

Aufgrund ihrer Blühfreudigkeit und Robustheit gegenüber Wettereinflüssen gehören die Pelargonien zu den beliebtesten Zierpflanzen in der Kategorie Beet- und Balkonpflanzen. Allerdings gibt es einige Krankheitserreger, die bei der Kulturführung in der Praxis zu Problemen führen. Es konnten sowohl Viren (*Pelargonium flower break virus*, PFBV; *Pelargonium leaf curl virus*, PLCV; *Pelargonium line pattern virus*, PLPV) als auch pilzliche Pathogene wie *Botrytis cinerea*, *Puccinia pelargonii*, *Alternaria*- und *Verticillium*-Arten in Pelargonien nachgewiesen werden. Auch Spinnmilben, Weichhautmilben, Thripse, Weiße Fliege, Trauermücken und Blattläuse beeinflussen die Kultivierung und Vermehrung von Pelargonien (ELSNER *et al.* 1995).

## Einleitung

Ein sehr großes Problem bei der Pelargonienvermehrung stellen Bakteriosen dar, die nicht chemisch bekämpft, sondern zurzeit nur durch phytosanitäre Maßnahmen eingedämmt werden können.

### 1.2 Bedeutende Bakteriosen an Pelargonien

Hauptsächlich werden Pelargonien von zwei pathogenen Bakterienarten befallen. Zum einen ist das die bakterielle Pelargonienwelke, verursacht durch *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (*Xhp*) und zum anderen die bakterielle Schleimkrankheit, hervorgerufen durch *Ralstonia solanacearum* (*Rs*). Diese Bakteriosen sorgen vor allem in Jungpflanzenbetrieben, schon seit mehr als 20 Jahren, jährlich weltweit für erhebliche finanzielle Einbußen (KENNEDY *et al.* 1987, NAMETH *et al.* 1999).

Die typischen Symptome der Pelargonienwelke und der Schleimkrankheit sind die Schirmwelke und das Verfärben der Stängel. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zum Absterben einzelner Bereiche bis hin zur gesamten Pflanze (GRIESBACH *et al.* 1999). Anhand der Symptome kann nicht festgestellt werden, ob die Pflanzen von *X. hortorum* pv. *pelargonii* oder von *R. solanacearum* befallen sind. Für eine eindeutige Diagnose sind mikrobiologische Untersuchungen im Labor notwendig. Wird einer dieser Erreger diagnostiziert, muss der gesamte Bestand vernichtet werden. Eine zusätzliche Meldung an den Pflanzenschutzdienst hat zu erfolgen, wenn es sich um *R. solanacearum* handelt, da dieses Bakterium zu den Quarantäneschaderregern gehört (MÜLLER UND BRIELMAIER-LIEBETANZ 2007).

*X. hortorum* pv. *pelargonii* ist in hohem Maße wirtsspezifisch. Hauptsächlich werden Pflanzen der Familie der *Geraniaceae* von der Bakteriose befallen (KIVILAAN und SCHEFFER 1958). Die ersten Beschreibungen dieser Krankheit stammen von LEQUET (1888) und von STONE (1898), die Bakterien in infiziertem Gewebe nachweisen konnten. In der Literatur ist das Bakterium unter anderem unter folgenden Synonymen zu finden: *Bacterium pelargonii*, *Pseudomonas pelargonii*, *Phytomonas pelargonii*, *Bacterium geranii* und *Pseudomonas geranii* (BRADBURY 1986). VAUTERIN *et al.* (1995) führten den Namen *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* ein.

Im Jahr 2000 änderten SCHAAD *et al.* (2000) den Namen *in Xanthomonas hederæ* pv. *pelargonii*. Eine klare Übereinstimmung gibt es bis heute nicht, so dass in dieser Arbeit die Bezeichnung *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* verwendet wird. *X. hortorum* pv. *pelargonii* ist ein gramnegatives Bakterium und gehört zur Gattung *Xanthomonas* der Familie der Xanthomonadaceae (Gammaproteobacteria).

Die bakterielle Pelargonienwelke stellt schon seit den 70er Jahren ein Problem in den Jungpflanzenbetrieben dar (KLEINHEMPEL *et al.* 1989). In der älteren Literatur wird als weiteres Krankheitsbild von wasserdurchtränkten bis zu wenige Millimeter großen Punkten berichtet, die von einem gelben Hof umgeben sind. In der Praxis treten gegenwärtig fast ausschließlich die Schirmwelke und eine Verfärbung der Stängel auf (KREBS 1992). Die Übertragung von *Xanthomonas* erfolgt hauptsächlich über offene Wunden beim Stecklingsschnitt. Die an der Wundoberfläche befindlichen Bakterien besiedeln das Gefäßsystem und breiten sich sowohl akropetal als auch basipetal in der Pflanze aus (BRÖTHER 1979) und verstopfen durch die Exopolysaccharidbildung die Leitbahnen.

Zur Bekämpfung der bakteriellen Pelargonienwelke wurden von RIEDEL und KECK (1992) *in vitro*-Versuche mit unterschiedlichen Desinfektionsmitteln, Pflanzenschutzmitteln, Antibiotika und Pflanzenextrakten durchgeführt. *In vitro* wurde eine Hemmung einiger Substanzen auf das Wachstum von *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* beobachtet. Ein Pflanzenschutzmittel gegen *X. hortorum* pv. *pelargonii* gibt es bisher jedoch nicht und nur wenige Mittel, wie zum Beispiel Kupfersulfat, sind wirksam (FLAHERTY *et al.* 2001). Eine Spritzung von Antibiotika ist aus medizinischen und toxikologischen Gründen nicht zugelassen und auch auf Grund der Ausbildung von Resistenzen (SCHAFER und GOODMAN 1985) nicht sinnvoll.

*Ralstonia solanacearum*, auch unter den Synonymen *Burkholderia solanacearum* und *Pseudomonas solanacearum* bekannt, ist ein gramnegatives Bakterium der Familie Burkholderiaceae (Betaproteobacteria). Die Erstbeschreibung des polar begeißelten Bakteriums *Bacillus solanacearum* wurde von Smith 1896 (BUCHANAN 1974) vorgenommen.

Bei *R. solanacearum* handelt es sich um einen Quarantäneschaderreger mit einem großen Wirtspflanzenkreis. Er verursacht unter anderem erhebliche Ertragsverluste bei

## Einleitung

Kartoffeln, Tomaten und Bananen (HAYWARD 1991) und wurde aufgrund seines großen Gefahrenpotentials von der Europäischen Union als Quarantäneschaderreger eingestuft (EPPO Bulletin 2004).

Die Wirtspflanzen werden über die Wurzeln und durch kontaminiertes Gießwasser mit dem bodenbürtigen Bakterium infiziert. *R. solanacearum* besiedelt zuerst die Wurzeloberfläche und bildet Mikrokolonien im Bereich der Wurzelspitzen (VASSE *et al.* 1995, ARAUD-RAZOU *et al.* 1998).

Der Mechanismus des Eindringens des Bakteriums in die Wurzel der Wirtspflanzen ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich spielen Pili und/oder Lipopolysaccharide eine wichtige Rolle (ROMANTSCHUK 1992). Verletzungen im Wurzelbereich ermöglichen den Eintritt des Erregers in die Pflanze. Die Ausbreitung von *R. solanacearum* in der Pflanze erfolgt über das Xylem. Aufgrund der Vielzahl der Bakterien und der von ihnen als Schleim produzierten Exopolysaccharide kommt es zur Verstopfung des Xylems und zur Auslösung der Welke (SCHELL 2000). TSUJIMOTO *et al.* (2008) sehen zellwandabbauende Enzyme (CWDEs), die von *Ralstonia* produziert werden, als Ursache für die Welkeerscheinung an Wirtspflanzen.

Durch den Abbau der Zellwände und der Mittellamellen verstopfen die Leitbahnen und der Flüssigkeitsstrom wird unterbrochen.

*R. solanacearum* (Rasse 3/Biovar 2) wurde nachweislich 1996 mit ägyptischen Speisefrühhkartoffeln, über Holland nach Deutschland eingeschleppt (POSCHENRIEDER, mündliche Mitteilung). An Pelargonien wurde der Erreger erstmals im Jahre 2000 nachgewiesen (MOLTMANN und POSCHENRIEDER 2001). Einige Jungpflanzenbetriebe haben ihre Stecklingsvermehrung ins Ausland verlegt, unter anderem nach Kenia. Hier wurde Oberflächenwasser in speziellen Wasseraufbereitungsanlagen desinfiziert und zur Bewässerung genutzt. Nach einem Stromausfall kam es zu einem Ausfall der Desinfektionsanlage, somit gelangte ungereinigtes, mit *Ralstonia* kontaminiertes Wasser in die Pelargonienbestände. Die latent befallenen Pflanzen wurden nach Deutschland importiert und kamen in den Verkauf. Erste befallene Pflanzen wurden in Baden-Württemberg, Nordrhein-Westfalen und Hessen dokumentiert (POSCHENRIEDER, mündliche Mitteilung).

### 1.3 Resistenzzüchtung und Resistenzmechanismen

Die Resistenzzüchtung gehört mit zu den schwierigsten Bereichen der Pflanzenzüchtung (FICKE 1989), denn zwei biologische Objekte (Wirtspflanze und Erreger) müssen berücksichtigt werden. Bei Bakteriosen ist der Anbau resistenter Sorten neben der Anwendung phytosanitärer Maßnahmen der wichtigste Bestandteil im Pflanzenschutz, da geeignete Präparate zur Bekämpfung nicht vorhanden sind.

In der Literatur gibt es einige Beispiele bei denen Einkreuzungen von Bakterienresistenz in Kultursorten durchgeführt wurden. Zum Beispiel konnte die Resistenz gegenüber *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* erfolgreich in eine anfällige Reissorte durch Rückkreuzungen eingebracht werden (BASAVARAJ *et al.* 2010). Aber auch die Kreuzungen vom Zierapfel *Malus floribunda* und dem Wildapfel *Malus robusta* mit Kulturapfelsorten führten zu positiven Ergebnissen im Bereich der Feuerbrandresistenz, so dass bereits Resistenzgene kartiert und isoliert werden konnten (KAHN *et al.* 2006).

Die erste physikalische Barriere ist die cutinisierte Epidermis der Pflanzen, unverletzt bietet sie einen vollständigen Schutz vor phytopathogenen Bakterien. Durch Verletzungen der Epidermis wird das Eindringen der Bakterien in die Pflanze erleichtert. Bei unverletzten Pflanzen können die Bakterien nur über die Stomata als natürliche Eintrittspforten in die Wirtspflanzen zu gelangen. Durch eine abweichende morphologische Struktur der Stomata kann eine Infektion jedoch verhindert bzw. erschwert werden und dient der Pflanze somit als Schutz vor Bakteriosen. Die zweite physikalische Barriere (nach dem Eindringen des Erregers in die Pflanze) stellt die Zellwand dar. Die gel- und netzartige Struktur, die sich hauptsächlich aus Polysacchariden zusammensetzt und häufig sehr ausgeprägte Einlagerungen von Suberin und Lignin aufweist, schützt vor der Einwirkung der gewebe- und zellwandmacerierender Enzyme der phytopathogenen Bakterien. Ist es dem Erreger trotz aller Barrieren gelungen in die Pflanze einzudringen, kommt es zu Abwehrreaktionen in der Pflanze. Die Pflanzenabwehr erfolgt nicht über spezialisierte Immunzellen. Jede Pflanzenzelle ist in der Lage, Pathogene zu erkennen und entsprechende Reaktionen auszulösen.

## Einleitung

Die Ausbildung der Resistenz bei Pflanzen beruht auf verschiedenen Mechanismen. Zum einen der Mechanismus der Nichtwirtsresistenz zum anderen der Mechanismus der kultivarspezifischen Resistenz. Die Nichtwirtsresistenz wird auch als basale oder allgemeine Abwehr bezeichnet und wird durch spezifische Elicitoren ausgelöst. Bei den Elicitoren handelt es sich um Moleküle, die dem Wirt signalisieren, dass ein Pathogenbefall vorliegt. Dabei kann es sich um wirtseigene Substanzen (endogene Elicitoren) handeln, die bei der Degradation der pflanzlichen Zellwand frei werden (HAHN *et al.* 1981, VORWERK *et al.* 2004). Es können aber auch charakteristische mikrobielle Strukturen sein, die sogenannten „pathogen/microbe-associated molecular patterns“ (PAMPs/MAMPs). Dies sind Moleküle, die normalerweise nicht in der Pflanze vorkommen und deshalb als fremd erkannt werden (NÜRNBERGER und BRUNNER 2002).

Zu solchen Molekülen zählen unter anderem Bestandteile der bakteriellen Zelle wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (ZIEDLER *et al.* 2004) oder Flagelline (FELIX *et al.* 1999). Durch membrangebundene Rezeptoren werden die Elicitoren erkannt und eine Signalkaskade wird ausgelöst. Durch die Signalweiterleitung kommt es zum erhöhten Kalziumeinstrom und zur Bildung radikaler Sauerstoffspezies (ROS). In einem weiteren Schritt wird die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP) aktiviert, um letztlich eine Änderung der Transkription diverser Gene und die Induktion von Abwehrgenen der Pflanzenzelle zu bewirken (GARCIA-BRUGGER *et al.* 2006, NÜRNBERGER und SCHELL 2001).

Die kultivarspezifische Resistenz beruht auf der Erkennung spezieller Genprodukte des Pathogens durch die Pflanze. Das Erkennen des *avr*-Gens (Avirulenz) des Pathogens durch ein korrespondierendes *R*-Gen (Resistenz) der Pflanze führt zur Auslösung bestimmter Pflanzenabwehrreaktionen (JONES und DANGL 2006).

Ein weiterer Bestandteil der pflanzlichen Abwehr ist der Mechanismus der hypersensitiven Reaktion. Dieser ist gekennzeichnet durch die Induktion der Apoptose an der Infektionsstelle. Durch die von den sterbenden Zellen produzierten Signalmoleküle kommt es in den Nachbarzellen zu einer verstärkten Ligninproduktion, Kalloseauflagerung und zur Vernetzung von Zellwandproteinen. So wird die Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze verhindert (BRISSEON *et al.* 1994, HOCK und ELSTNER 1995). Die Resistenz bzw Anfälligkeit einer Pflanze gegenüber einem Pathogen ist genetisch festgelegt.

Zum Beispiel wurden Resistenzquellen gegenüber *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Rassen in Tomatenlinien (*Lycopersicon esculentum*) entdeckt (JONES *et al.* 1998).

Diese Resistenzen beruhen auf einer spezifischen Gen-für-Gen-Interaktion, des *Bs4*-Resistenzgens (R) in der Pflanze mit dem Avirulenzgen (*avrBs4*) des Pathogens (BONAS *et al.* 1993, CANTEROS *et al.* 1991; BALLVORA *et al.* 2001).

Abwehrstoffe von Pflanzen können im Rahmen der Nichtwirtsresistenz oder der kultivar spezifischen Resistenz gebildet werden. Zu den Abwehrstoffen gehören die Phytoalexine, deren Bildung durch das Eindringen des Pathogens hervorgerufen wird, und die Phytoanticipine. Bei den Phytoanticipinen handelt es sich um Substanzen, die als Vorstufe in der Pflanze vorliegen und bei einer Infektion in eine aktive Form umgewandelt und freigesetzt werden (ETTEN VAN *et al.* 1994, JONES UND DANGL 2006).

#### **1.4 Kreuzungsbarrieren bei Pelargonien**

Als Kreuzungsbarrieren treten prä- und postzygotische Inkompatibilitätsmechanismen auf. Bei den präzygotischen Mechanismen handelt es sich Mechanismen, die eine Übertragung des Pollens auf die Narbe verhindern (WAGENITZ 1996). Zu diesen Mechanismen gehören laut WAGENITZ (1996), die ökologische Isolation (unterschiedliche Standorte), die zeitliche Isolation (verschiedene Blütezeit) und die blütenbiologische Isolation (Verhinderung der Pollenübertragung). Ebenfalls zu den präzygotischen Mechanismen zählt nach WAGENITZ (1996) die Inkompatibilität (Reaktionen an der Narbe oder im Griffel lassen keine Befruchtung zu).

Bei den postzygotischen Mechanismen handelt es sich um Barrieren die nach einer erfolgreichen Befruchtung auftreten. Störungen in der Entwicklung und die reduzierte Überlebensfähigkeit der Hybrid-Zygote in verschiedenen Entwicklungsstadien sind nach RIESEBERG und CARNEY (1998) die häufigsten Ursachen für das Absterben des Embryos. Sowohl die prä- als auch die postzygotischen Inkompatibilitätsmechanismen spielen bei der Kreuzung der Pelargonie eine große Rolle. Eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kreuzung sind die Übereinstimmung der Chromosomenzahl und die gleiche Ploidiestufe.

## Einleitung

DARLINGTON und WYLIE (1955) kamen zu dem Ergebnis, dass das Haupthindernis bei interspezifischen Kreuzungen der Pelargonie die unterschiedliche Anzahl der Chromosomen ist. Auch die Sektionen spielen eine wichtige Rolle bei Pelargonien-Kreuzungen, so sind Kreuzungen innerhalb einer Sektion erfolgreicher als Kreuzungen zwischen den Sektionen (HORN 1994). Mit Hilfe von Embryo-Rescue ist es BENTVELSEN *et al.* (1990) erstmals gelungen, eine interspezifische Kreuzung zwischen der Sektion Ciconium und der Sektion Dibrachya erfolgreich durchzuführen. Auch interspezifische Kreuzungen mit *P. quinquelobatum* wurden in der Literatur beschrieben (DENIS-PEIXOTO *et al.* 1997). Bisher ist es noch nicht gelungen, *Xanthomonas*-Resistenz in die Kulturform der Pelargonie einzukreuzen. Ein Grund dafür ist der phylogenetische Abstand (Abb. 1.1) zwischen der resistenten Wildform (Sektion Pelargonium) und der anfälligen *Pelargonium x hortorum* Kulturform (Sektion Ciconium) (PETERKA, JKI Quedlinburg mündliche Mitteilung).

Arbeiten zur Resistenzzüchtung bei Pelargonien gegenüber *Ralstonia* waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt.



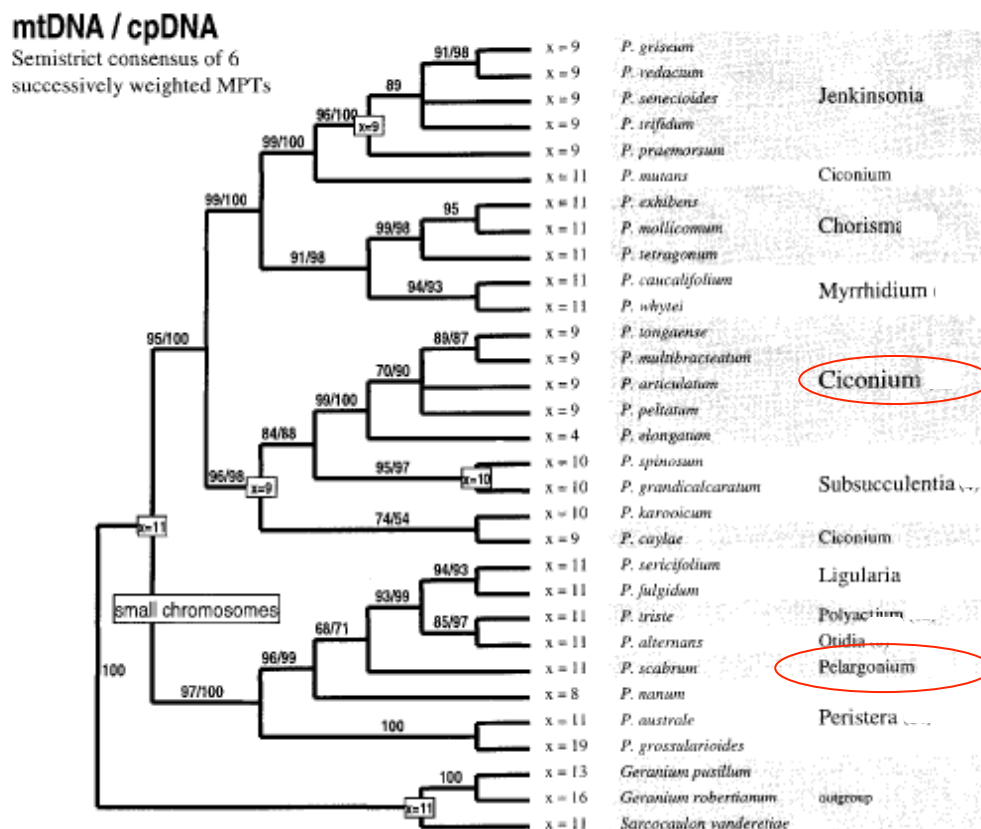


Abb. 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der Pelargonien mit der Unterteilung in die einzelnen Sektionen auf der Grundlage molekulargenetischer Marker der Mitochondrien- und Chloroplasten-DNA (BAKKER *et al.* 2000). Für die Erstellung des Stammbaumes wurde das Programm PAUP verwendet. Die Zahlenwerte dokumentieren Bootstrap Analyse.

## 1.5 Somatische Hybridisierung

Für die Züchtung gewinnt die somatische Hybridisierung immer stärker an Bedeutung, da bei dieser Methode auch Pflanzenmaterial bearbeitet werden kann, das sich auf natürlichem Wege nicht oder nur schwer kreuzen lässt. Hierzu zählen auch Kreuzungen über Art- und Gattungsgrenzen hinweg. Bei der somatischen Hybridisierung kommt es zur Verschmelzung ganzer Protoplasten (symmetrische Fusion) oder zur Verschmelzung einzelner Bestandteile (asymmetrische Fusion), wenn durch Inaktivierung eines oder beider Fusionspartner die Fusion beeinflusst wird. Die Inaktivierung der Zellkerne kann unter anderem durch Gamma- und UV-Bestrahlung ausgelöst werden (GLEBA *et al.* 1988).

## Einleitung

Eine Besonderheit bei der somatischen Hybridisierung ist, dass im Unterschied zur sexuellen Kreuzung auch die Mitochondrien und Chloroplasten der beiden Hybridisierungspartner zusammengeführt werden.

Eine Voraussetzung für die somatische Hybridisierung sind stabile, regenerationsfähige Protoplasten. Bei den Protoplasten handelt es sich um zellwandlose Pflanzeneinzellen aus unterschiedlichen Geweben der Pelargonie. COCKING (1960) beschrieb erstmals das Verfahren der enzymatischen Protoplasten-Isolation.

Die Hauptbestandteile der pflanzlichen Zellwand sind unter anderem Zellulose, Lignin und Hemizellulose. Die mit Hemizellulose bedeckten Zellulosegerüste verbinden sich mit Pektinen zur Mittellamelle. Für den Abbau der Zellwandstruktur sind daher Enzymgemische von großer Bedeutung. Anfang der 60er Jahre wurde erstmals pilzliche Cellulase für den Verdau pflanzlicher Zellwände und zur Gewinnung von Protoplasten eingesetzt (COCKING 1960). Zu Beginn der 70er Jahre waren Cellulase und Pektinase kommerziell erhältlich und ermöglichten die Isolierung von Protoplasten in größeren Mengen (BHOJWANI UND RADZAN 1996). Um die Stabilität der isolierten Protoplasten zu erhalten, müssen diese in hypertonischen Lösungen kultiviert werden. Als Osmotikum wird meistens Mannitol und Sorbitol aber auch Saccharose verwendet (BINDING 1974).

Der wichtigste Prozess während der Protoplastenfusion ist die Induktion der Membranfusion und die damit verbundene Agglutination der Protoplasten. Aufgrund der in der Membranoberfläche enthaltenen Phosphate und Phospholipide ist die Membranoberfläche der Protoplasten negativ geladen. Durch die negativ geladene Oberfläche und die kugelige Gestalt der Protoplasten ist die Kontaktfläche zwischen den Protoplasten sehr gering (EVANS und COCKING 1977). Daher ist es notwendig, die Zusammenlagerung mit Hilfe von Agenzien zu induzieren. KELLER und MELCHERS (1973) führten die Fusion von Tabakmesophyllprotoplasten in einer Lösung mit einem hohen pH Wert und einer hohen Calciumkonzentration (100 -300 mM) durch. GRIMES und BOSS (1985) konnten feststellen, dass Calcium und Calmodulin ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Protoplastenfusion spielen. Eine Verringerung des intrazellulären Calciums führte zu einer Verschlechterung der Fusionsrate, während eine Erhöhung des Calciums zu einer Steigerung der Fusionsrate führte. Der Einsatz von Calmodulin-Hemmern führte ebenfalls zu einer Verringerung der Fusionsrate.

Am häufigsten wird die von KELLER und MELCHERS (1973) beschriebene Methode in Kombination mit Polyethylenglycol verwendet.

Das Polyethylenglycol (PEG) führt zu einer Agglutination und sorgt somit für die Zusammenlagerung der Protoplasten. Der hohe pH-Wert und die erhöhte Kalziumkonzentration der Fusionslösung lösen anschließend die eigentliche Fusion aus (KAO und MICHAYLUK 1974).

Seit 1974 (TEMPELAAR UND JONES 1974) wird auch die Methode der Elektrofusion angewendet und stetig weiterentwickelt, um die womöglich durch die chemischen Agenzien ausgelösten schädigenden Nebenwirkungen zu vermeiden und die Fusionsraten zu erhöhen. Bei der Elektrofusion wird zunächst Wechselstrom mit einer hohen Frequenz angelegt. Dadurch ordnen sich die negativ geladenen Protoplasten von Elektrode zu Elektrode in einer perlenschnurartigen Struktur an und werden so mit einander in Kontakt gebracht. Die eigentliche Fusion wird durch Elektroimpulse induziert. Durch die Impulse werden die Membranen der Protoplasten labil und in den Kontaktzonen von Protoplast zu Protoplast bilden sich zunächst Poren. Anschließend kollabieren die Membranen und es kommt zu einer Fusion, diese Permeabilitätsänderungen sind reversibel. Nach Abschalten des elektrischen Feldes gewinnt die Zellmembran ihren ursprünglichen hohen elektrischen Widerstand und ihre Impermeabilität zurück (ZIMMERMANN und STOPPER 1987). Diese Ergebnisse wurden bei Solanaceae erzielt und die fusionierten Protoplasten konnten zur Regeneration in Kulturmedium überführt werden (MELCHERS *et al.* 1978).

Eine Kombination aus der chemischen Fusion (PEG) und der elektrischen Fusion wurde von OLIVARES-FUSTER *et al.* (2005) am Beispiel von *Citrus* beschrieben.

Für die Trennung von Homo- und Heterofusionaten während und nach der Fusion wurden bei der Auswahl der Fusionspartner verschiedene Kriterien berücksichtigt wie z. B. verschiedene Größen und Farben der Protoplasten. So besteht die Möglichkeit, im Lichtmikroskop Fusionate zu identifizieren.

Somatische Hybridisierungen innerhalb einer Art bzw. Gattung sowie über die Art- bzw. Gattungsgrenzen hinweg werden in der Literatur anhand unterschiedlicher Beispiele beschrieben. Die meisten durch somatische Hybridisierung entstandenen Hybriden gehen jedoch auf Hybridisierungen innerhalb derselben Gattung zwischen verschiedenen Arten zurück.

## Einleitung

Beispiele dafür sind unter anderem Fusionen mit Kartoffel (WAARA *et al.* 1991, SZCZERBAKOVA *et al.* 2010), Kohl (TERADA *et al.* 1987) und Tomate (O'CONNELL und HANSON 1987). Während die Fusion oft kein Problem darstellt, ist die Regeneration der Hybride schwierig.

Zur erfolgreichen Protoplastenfusion bei Pelargonien gibt es bisher nur einen Hinweis aus der Literatur. So wurde von NASSOUR und DORION (2003) die chemische Methode mit Polyethylenglycol (PEG) - bei Pelargonien - angewendet. Eine Transformation mit Pelargonien- Mesophyllprotoplasten wurde von HASSANEIN *et al.* (2009) beschrieben. Über die Isolierung und Kultivierung von Pelargonienprotoplasten gibt es in der Literatur zahlreiche Angaben (KAMEYA 1975, DUNBAR und STEPHENS 1991, NASSOUR und DORION 2002, DORION *et al.* 2010).

## 1.6 Zielstellung

Da die beiden an Pelargonien vorkommenden Bakteriosen nicht chemisch bekämpft werden können, kommt der Züchtung krankheitsresistenter Sorten eine ganz besondere Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb Pelargonien-Sorten, -Wildformen und Zuchtmaterial auf Bakterienresistenz geprüft werden, um Resistenzquellen für die Züchtung widerstandsfähiger Sorten identifizieren zu können. Um die Übertragung der Bakterien krankheitsspezifisch und möglichst praxisnah durchzuführen, musste für jeden Erreger eine spezielle Inokulationsmethode entwickelt werden.

Bei Pelargonien war das Auftreten von Kreuzungsbarrieren zwischen Kultur- und Wildformen bereits vor Beginn der Arbeiten bekannt. Um die Einkreuzung der Resistenz aus Wildarten in die Kulturform trotzdem zu ermöglichen, war es das Ziel, Methoden zur Überwindung von Kreuzungsbarrieren bei Pelargonien zu erarbeiten. Da anzunehmen war, dass eine Einkreuzung der Resistenz auf Grund von Inkompatibilität der Kreuzungspartner im zeitlich begrenzten Rahmen des Projektes nicht erfolgreich durchgeführt werden kann, sollten biotechnologische und molekulare Methoden, wie zum Beispiel die Protoplastenfusion erprobt und weiterentwickelt werden. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Protoplastenfusion waren dabei zunächst Protoplastenisolierungs-, Protoplastenfusionierungs- und –regenerationsprotokolle zu etablieren. Mit Hilfe molekularer Marker, zytogenetischer Methoden und der Inhaltsstoff-Analyse sollten anschließend die Fusionsprodukte charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Resistenzevaluierung

#### Bakterienkultivierung

Für die Resistenzuntersuchungen standen insgesamt 47 Bakterienstämme zur Verfügung (Tab. 2.1 und 2.2). 15 *Xanthomonas hortorum* - und 18 *Ralstonia solanacearum*-Isolate wurden der Stammsammlung des Instituts für Resistenzforschung und Stresstoleranz des JKI Quedlinburg entnommen und je Bakterienart drei bzw. zwei Stämme von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Braunschweig bezogen. 10 *Ralstonia solanacearum*-Isolate stammen aus einem Umweltmonitoring, dass die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft 1997 durchgeführt hat. Hier wurden bayerische Oberflächengewässer und am Ufer wachsende Wildkräuter in Regionen mit Kartoffelanbau und in der Nähe von Kartoffelverarbeitungsbetrieben auf Kontamination bzw. Infektion mit *Ralstonia* untersucht. Alle Bakterienisolate wurden zweimal im Monat überimpft, um die Vitalität und Virulenz zu erhalten. Die Langzeitlagerung erfolgte in lyophilisierter Form bzw. in flüssigem Stickstoff.

Tab 2.1: Übersicht der verwendeten *Ralstonia solanacearum*-Isolate die im Rahmen der Virulenzuntersuchung getestet wurden.

Nr.	Isolat	Herkunft
Rs 1	Rs Sd 22	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 2	Rs Bröther 4	Aschersleben, Institut für Phytopathologie;Kartoffel
Rs 3	Rs 1982	Braunschweig, BBA; Pelargonie
Rs 4	Rs 2762	Holland, Kartoffel
Rs 5	Rs A 96/6	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 6	Rs Sd 15	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 7	Rs 1958	Göttingen, NCPPB; GSPB 1115
Rs 8	Rs Ring 1/1	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 9	Rs 3865	Frankreich, Kartoffel
Rs 10	Rs Re 45	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 11	Rs 3864	Ägypten, Kartoffel
Rs 12	Rs 3863	Frankreich, Kartoffel
Rs 13	Rs 325	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Tomate
Rs 14	Rs A 96/5	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 15	Rs A 96/4	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel

Nr	Isolat	Herkunft
Rs 16	Rs A 96/3	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 17	Rs A 96/2	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 18	Rs A 96/1	Aschersleben, Institut für Phytopathologie; Kartoffel
Rs 19	DSMZ 1993	Braunschweig, DSMZ; Gartenbohne
Rs 20	DSMZ 9544	Braunschweig, DSMZ Tomate
Rs 21	06/8043/5a	Freising, LfL; Wolfstrapp
Rs 22	06/8022/1a	Freising, LfL; Bittersüßer Nachtschatten
Rs 23	06/8061/1a	Freising, LfL; Brennnessel
Rs 24	06/8042/1a	Freising, LfL; Brennnessel
Rs 25	07/9031/1a	Freising, LfL; Brennnessel
Rs 26	07/9148/1a	Freising, LfL; Wasserproben
Rs 27	07/9069/1a	Freising, LfL; Wasserproben
Rs 28	07/9147/2a	Freising, LfL; Wasserproben
Rs 29	07/9034/1a	Freising, LfL; Wasserproben
Rs 30	07/9163/1a	Freising, LfL; Wasserproben

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*-Isolate, die im Rahmen der Virulenzuntersuchung getestet wurden.

Nr.	Isolat	Herkunft
Xhp 1	Xp R-3-92	Geisenheim
Xhp 2	Xp Pac 51	Dresden, Elsner pac
Xhp 3	Xp Elsner 716/94	Dresden, Elsner pac
Xhp 4	Xp G 4428	Göttingen
Xhp 5	Xp 93/136/1a	Freising
Xhp 6	Xp 93/135/1a	Freising
Xhp 7	Xp 93/118/1a	Freising
Xhp 8	Xp W 680	Wien, Bundesanstalt für Pflanzenschutz
Xhp 9	Xp Elsner 716/94S	Dresden, Elsner pac
Xhp 10	Xp 1/99	Dresden, Pelargonie
Xhp 11	Xp PD 443	Wageningen
Xhp 12	Xp 1a-R-92	Geisenheim
Xhp 13	Xp Fischer 2	Hillscheid, Fischer
Xhp 14	Xp 9-R-92	Geisenheim
Xhp 15	50857	Braunschweig, DSMZ; Pelargonie
Xhp 16	50858	Braunschweig, DSMZ; Pelargonie
Xhp 17	50859	Braunschweig, DSMZ; Pelargonie

Die Kultivierung der *X. hortorum* pv. *Pelargonii*-Isolate wurde auf YDC (yeast dextrose chalk) Medium nach GROSSE und GARRETT (1963) (Tab. 2.3) bei 25 °C im Dunkeln durchgeführt. Die *Ralstonia* Isolate wurden auf Glycerin Bouillon Medium (KLEINHEMPEL *et al.* 1989) ebenfalls bei 25 °C im Dunkeln kultiviert.

## Material und Methoden

Für die Arbeitssammlung wurden Schrägagarröhrchen der Isolate angelegt. Für die Inokulationsversuche wurden die Bakterien 48 h bei 25 °C kultiviert.

Um eine entsprechende Inokulumdichte zu erreichen, wurden die Kulturen mit sterilem Leitungswasser abgeschwemmt und die Zellzahl mittels Zählkammer (Thoma, Kammertiefe 0,01 mm) bestimmt. Anschließend erfolgte eine Verdünnung mit sterilem Leitungswasser bis zur definierten Inokulumdichte ( $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen/ml).

Tab. 2.3: Bakterien-Kulturmedien

Glycerin Bouillon Medium		YDC Medium	
Reagenz (Hersteller)	g/l	Reagenz (Hersteller)	g/l
Fleischextrakt (Fluka)	1	Hefeextrakt (Roth)	10
Hefeextrakt (Roth)	1	Calciumcarbonat (Roth)	20
Pepton (Difco)	5	Glucose (Merck)	20
Glycerin (Roth)	20	Agar (Serva)	15
Agar (Serva)	15	pH-Wert	7.0
pH-Wert	7.2		

### Pflanzenmaterial

Die im Testsortiment enthaltenen *Pelargonium* Wild- und Kulturformen wurden von der Firma Elsner pac® Dresden zur Verfügung gestellt (Anhang, Tab. 8.1). Insgesamt wurden 114 Genotypen gegen den Erreger der bakteriellen Schleimkrankheit und den Erreger der bakteriellen Pelargonienwelke getestet.

Die Testpflanzen wurden im Gewächshaus bei einer Tag-Nacht-Temperatur von 20/18 °C und einer relativen Luftfeuchte von 70 % kultiviert. Eine Zusatzbeleuchtung wurde nicht genutzt, da eine Blühinduktion der Pflanzen für die Inokulationsversuche nicht von Bedeutung war.

Die *Xanthomonas*- und *Ralstonia*-Resistenztestungen wurden an 8-12 Wochen alten Pflanzen (Topf Ø 12 cm, Fruhstorfer Einheitserde Typ T + Sand) durchgeführt. Die Inkubation der inokulierten Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei einer Tag-Nacht-Temperatur von 25 °C/18 °C und einer relativen Luftfeuchte von 70 %. Eine Düngung der Pflanzen wurde im Rahmen der Inokulationsversuche nicht durchgeführt.



### 2.1.1 Methodenentwicklung

Die Resistenztests wurden an einem bereits von GRIESBACH UND OLBRICHT (2002) als anfällig für *X. hortorum* pv. *pelargonii* beschriebenen *Pelargonium*-Genotyp (501) erarbeitet. Um die Übertragung der Bakterien möglichst erregerspezifisch und praxisrelevant zu gestalten, musste für jeden Erreger eine spezielle Inokulationsmethode entwickelt werden.

#### 2.1.1.1 *Xanthomonas*-Test

Zur *Xanthomonas*-Inokulation wurden beim Schneiden von Apikalstecklingen die Klingen einer Gartenschere vor jedem Schnitt in eine Bakteriensuspension getaucht, so dass die Bakterien über die Schnittfläche in die Pflanze gelangten. Für die Ermittlung einer geeigneten Erregerdichte wurden Inokulationsdichten von  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingesetzt. Pro Erreger wurden 10 Pflanzen mit der entsprechenden Bakteriensuspension inokuliert.

Um latente Infektionen auszuschließen, wurden bei jedem Genotyp auch 5 Pflanzen mit Wasser inokuliert und unter gleichen Bedingungen kultiviert und bonitiert. Um den Erfolg der Infektion zu dokumentieren, wurde jeweils ein hoch anfälliger Standard (Genotyp 501) mitgeführt.

Die Bonitur der Pflanzen erfolgte zwei, drei und vier Wochen nach der Inokulation in Anlehnung an die Boniturskala von GRIESBACH UND OLBRICHT (2002) (Tab. 2.4, Abb. 2.1).

Tab.2.4: Bewertung des Krankheitsbefalls durch Boniturnoten

Boniturnoten	Befall
BN 1	Pflanze ohne Symptome
BN 2	geringe Symptomausprägung
BN 3	ca. ein Drittel der Pflanze weist Befall auf
BN 5	ca. die Hälfte der Pflanze weist Befall auf
BN 7	ca. zwei Drittel der Pflanze weisen Befall auf
BN 9	die gesamte Pflanze ist abgestorben

## Material und Methoden

Vier Wochen nach der Inokulation konnte die volle Symptomausprägung (bis zum Absterben der gesamten Pflanze) bonitiert werden, während nach zwei Wochen die Anfangssymptome wie die beginnende Welke bonitiert wurden. Die dreimalige Bonitur erwies sich als notwendig, um den Krankheitsverlauf zu dokumentieren.

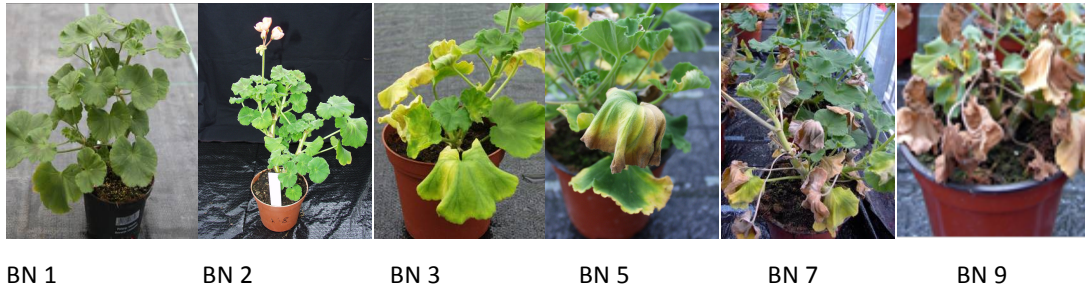


Abb. 2.1: Zuordnung der Boniturnoten zur Krankheitsausprägung. Dargestellt sind die einzelnen Stadien der Krankheitsausprägung und die entsprechenden Boniturnoten am Pelargonien-Genotyp 503.

Für die Analyse symptomloser Pflanzen wurden die Stängel oberflächensterilisiert (Ethanol, 70 %, 1 min) und anschließend jeweils in zwei verschiedenen Varianten aufgearbeitet:

Variante I: Ein Teil des Stängels wurde in kleine Stücke geteilt, diese anschließend auf YDC Medium ausgelegt und bei 25 °C für 24–48 h inkubiert.

Variante II: Der Rest des Stängels wurde in sterile Probenbeutel überführt und mit einer Hebelpresse (HK 500–HK 800, Firma Berg und Schmid Presstechnik) zerquetscht. Der Presssaft des vaskulären Systems mit den darin enthaltenen Bakterien wurde dann ebenfalls auf dem Selektivmedium ausplattiert und für 24–48 h bei 25 °C inkubiert.

An Hand der Ergebnisse erfolgte eine Differenzierung in resistente bzw. tolerante Pflanzen. Waren trotz Erregerinokulation keine Symptome sichtbar und konnten keine Bakterien in der Pflanze nachgewiesen werden, wurden diese als resistent eingestuft, symptomlose Pflanzen mit Erregernachweis als tolerant (Abb. 2.2.). Es wurden jeweils 5 Pflanzen pro Genotyp pro Erreger aufgearbeitet.

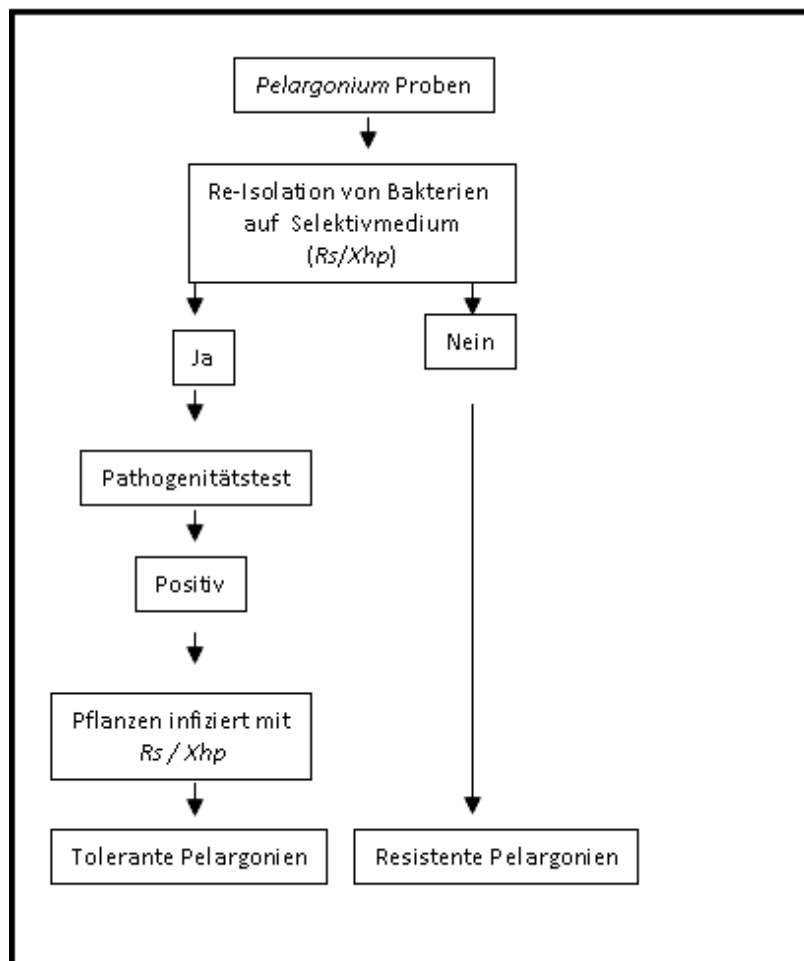


Abb. 2.2: Schema zur Auswertung der Resistenztestungen: Differenzierung zwischen resistenten und toleranten Pelargonien-Genotypen

Konnten die reisolierten Bakterien nicht eindeutig bestimmt werden, wurde mit Hilfe eines serologischen Tests überprüft, ob es sich um *X. hortorum* pv. *pelargonii* oder um *R. solanacearum* handelte. Dieser Test wurden mit Seren aus dem Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz (*Xanthomonas*: *Xhp* 54/90, *Xhp* 185/90, *Xhp*265/90; *Ralstonia*: AS 15, AS 46, AS 49) durchgeführt. Für die Durchführung dieser Untersuchung, wurde eine Bakterienkolonie in 0,85%iger NaCl-Lösung aufgenommen und auf einem Objektträger gemischt. Anschließend wurden 2 Tropfen des jeweiligen Antiserums in einer Verdünnung von 1:20 hinzugegeben. Durch leichtes Schwenken erfolgte eine Durchmischung. Der Objektträger wurde dann für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgewertet. Konnte eine Agglutination nachgewiesen werden, war der Test positiv und es handelte sich um den entsprechenden Erreger.

### **2.1.1.2 *Ralstonia*-Test**

Da *Ralstonia solanacearum* vor allem durch kontaminiertes Gießwasser über die Wurzeln übertragen wird, wurden zwei entsprechende Inokulationsmethoden getestet. Bei den Methoden A und B wurden jeweils 100 ml der Bakteriensuspension ( $1 \times 10^8$  Zellen/ml)/Topf ( $\varnothing$  12 cm) in den Wurzelbereich der Pflanzen gegossen. In der Variante B erfolgte zusätzlich eine Verletzung der Wurzeln mit einem Messer, um das Eindringen des Erregers in die Pflanze zu fördern.

Die Inkubation, Reisolation und Bewertung wurde, wie für *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* unter 2.1.1.1. beschrieben, durchgeführt. Als Selektivmedium wurde jedoch Glycerin-Bouillon Medium verwendet.

### **2.1.2 Virulenzanalysen**

Für die Entwicklung der geeigneten Resistenztests wurden zunächst alle Bakterienstämme (Tab. 2.1 und 2.2) hinsichtlich ihrer Virulenz an jeweils 10 Pflanzen des anfälligen Genotyps 501 (*Pelargonium* x *hortorum*) getestet. Die Inokulation erfolgte mit Hilfe der genannten Methoden. Drei der virulentesten Isolate je Bakterienart wurden selektiert und für die Bestimmung der optimalen Inokulumdichte eingesetzt. Für die ausgewählten Isolate wurden die optimalen Inokulumdichten der Einzelisolate und des Isolategemisches an je 10 Pflanzen des anfälligen Standards (501) ermittelt. Die Bewertung des Krankheitsbefalls erfolgte durch Boniturnoten (s. Tab. 2.4).

### **2.1.3 Durchführung der Resistenzprüfung**

Die Inokulation mit *X. hortorum* pv. *pelargonii* erfolgte mit einer handelsüblichen Gartenschere, deren Klinge vor jedem Schnitt in die Bakteriensuspension getaucht wurde.

Bei der Inokulation mit *Ralstonia solanacearum* wurde eine Bakteriensuspension hergestellt, die dann als Gießwasser eingesetzt wurde. Zusätzlich wurden die Wurzeln der Testpflanzen mit einem Messer verletzt, um das Eindringen der Bakterien in die Pflanze zu erleichtern.

Bei beiden Pathogenen wurde ein Gemisch aus drei Isolaten mit einer Keimdichte von  $1 \times 10^8$  cfu/ml verwendet. Zwei, drei und vier Wochen nach der Inokulation erfolgte eine Sichtbonitur (Tab. 2.4 und Abb. 2.1).

Anschließend wurden Pflanzen, die keine Symptome zeigten, wie unter 2.1.1.1 beschrieben aufgearbeitet. Es wurden 5 Pflanzen pro Genotyp untersucht.

Von den erhaltenen Regeneratpflanzen wurden stichprobenartig 6 Fusionspflanzen vegetativ vermehrt und hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber *Xanthomonas* und *Ralstonia* getestet. Dieser Test wurde einmalig in 4 facher Wiederholung durchgeführt (eine Pflanze = eine Wiederholung).

### **2.1.4 Gewinnung von Bakterientoxinen**

Die Isolierung von Bakterientoxinen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von NASSOUR und DORION (2003). Für die Gewinnung der Bakterientoxine wurden die jeweiligen Bakterienstämme (*R. solanacearum*, *X. hortorum* pv. *pelargonii*) zunächst in 150 ml Nährbouillon (Roth) kultiviert. Angeimpft wurden die Kulturen mit drei Kolonien des jeweiligen Bakterienisolates. Nach 72 h bei 120 UpM und 25 °C wurden die Kulturen bei 4000 g für 10 min zentrifugiert (NASSOUR und DORION 2003). Der Überstand wurde durch einen Filter (Millipore, 0,22 µm) sterilfiltriert, 100 ml des sterilen Überstandes wurden bei -80 °C für drei Tage gelagert und 24 h im Gefriertrockner (Christ gamma 1- 16 LSC, Version 2.233) lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in sterilem Wasser gelöst und unter sterilen Bedingungen zum autoklavierten, auf ca. 60 °C abgekühlten Regenerationsmedium zum PRM 10 Medium (Anhang, Tab. 8.4) zugegeben (*R. solanacearum* 2 g/l; *X. hortorum* pv. *pelargonii* 4 g/l).

## 2.2 In-vitro-Pflanzenmaterial

Für die Protoplastenfusion standen *P x hortorum* (Genotyp 503) als anfällige Kulturform und der Genotyp 609 als resistenter Partner zur Verfügung. Vom Genotyp 609 wurde nach der Auswertung des Resistenztests In-vitro-Kulturen angelegt, der Genotyp 503 wurde als In-vitro-Pflanze von der Firma Elsner pac® bereitgestellt.

### 2.2.1 Kulturbedingungen In-vitro-Pflanzen

Die Dauerkultivierung der In-vitro-Pflanzen erfolgte auf KAD 3 Medium (Anhang, Tab. 8.1) in Magenta Gefäßen (Sigma) bei einer Temperatur von 25 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit, bei einer Belichtungsstärke von 65 µmol/m<sup>2</sup>s. Nach jeweils vier Wochen wurden die In-vitro-Pflanzen auf frisches KAD 3 Medium überführt.

### 2.2.2 Suspensionskulturen

Für die Etablierung einer Suspensionskultur wurde zunächst Kallus erzeugt. Hierzu wurden Stängelstücke der In-vitro-Pflanzen auf modifiziertem MS-Medium (P-Sus 1, Anhang, 8.2.1) (ROBICHON *et al.* 1997) bei einer Belichtungsstärke von 65 µmol/m<sup>2</sup>s kultiviert. Nach vier Wochen wurde der entstandene Kallus zerkleinert und in 300 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Kultivierung des in der Arbeit verwendeten Genotyps 503 erfolgte in P-Sus 2 Medium (Anhang, Tab. 8.2.2). Der Genotyp 609 wurde in Ta-Medium (Anhang, Tab. 8.2.2) kultiviert, da sich die Suspension in diesem Medium besser entwickelte. Wöchentlich erfolgte eine Passage der Suspensionen auf frisches Kulturmedium, dabei wurden die Kulturen mit Hilfe eines Filters (Porengröße 500 µm) gesiebt. Anschließend wurde aus dem Überstand ca. 1 g Suspensionskallus in 300 ml frisches Medium überführt.

Die Kultivierung erfolgte im Schüttler (Infors HT Multitron) bei 110 UpM und 25 °C im Dunkeln. Die Qualität der Suspensionen wurde regelmäßig unter dem Inversmikroskop kontrolliert.

## **2.3 Protoplastenisolierung**

### **2.3.1 Isolierung und Aufarbeitung von Mesophyll-, Suspensions- und Petalenprotoplasten**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Protoplasten aus dem Mesophyllgewebe, aus Suspensionskulturen und aus Petalen isoliert werden. Die Isolierung und Aufarbeitung der Mesophyll- und Suspensionsprotoplasten erfolgte in Anlehnung an SUNDBERG und GLIMELIUS (1986).

Zur Gewinnung von Mesophyllprotoplasten wurden 0,5–1 g Blattmaterial von In-vitro-Pelargonien entnommen und in einer sterilen Petrischale ( $\varnothing$  10 cm) in 8 ml PPM 1 Medium (Anhang, Tab. 8.2) mit Hilfe eines scharfen Skalpells in 1 mm breite Streifen geschnitten. Nach ca. 15 min wurden 500  $\mu$ l Enzym EI (Tab. 8.6.2, Anhang) zugegeben.

Um Suspensionsprotoplasten zu isolieren, wurde zunächst die Aufarbeitung von 10 ml Suspension aus der entsprechenden Pelargonien-Suspensionskultur (2.2.2) durchgeführt. Die Suspensionskulturen wurden in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und 5 min bei 123 g zentrifugiert. Das Suspensionspellet (2 ml) wurde in eine Petrischale überführt und mit einem Skalpell zerkleinert, anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben mit 8 ml des Enzyms Eapi I (Anhang, Tab. 8.6.2).

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung der Petalenprotoplasten wurden Pelargonienblüten aus dem Gewächshaus verwendet. Die Oberflächensterilisierung der Blüten wurde wie bei OH und KIM (1994) beschrieben durchgeführt. Zunächst wurden die Blüten für 1 min mit 70%igem Ethanol und anschließend für 10 min mit einer 0,6%igen Natriumhypochlorit-Lösung (Roth) behandelt. Es folgten drei weitere Waschschrirte mit sterilem Aqua dest. für 1, 3 und 5 min. Die Blütenblätter (ca. 500 mg Frischgewicht) wurden in 1 mm Streifen geschnitten und für ein bis zwei Stunden in 8 ml Präplasmolyselösung (TVL-Lösung, Anhang, Tab. 8.6.1) bei 25 °C im Dunkeln

## Material und Methoden

inkubiert. Anschließend wurde die Präplasmolyse gegen 8 ml E-VI Enzymlösung ausgetauscht.

Der enzymatische Verdau erfolgte für alle Gewebe 15 h bei 25 °C und 30 UpM (Kreisschüttler, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik KS 501 D) im Dunkeln.

Für die Aufreinigung der Meosophyll-, Suspensions- und Petalenprotoplasten wurden diese durch einen Nylonfilter (Porengröße 100 µm) in ein steriles 10 ml Zentrifugenröhrchen filtriert, um größere Bruchstücke zu entfernen.

Die Protoplasten wurden dann für 5 min bei 123 g zentrifugiert (Universal 320, Hettich). Das Protoplastenpellet wurde leicht aufgeschüttelt und in einem Saccharosegradienten aufgereinigt. Dazu wurden die Protoplasten in 8 ml Saccharose Lösung (Anhang, Tab. 8.6.5) aufgenommen und mit 2 ml W5 Lösung (Tab. 8.6.6, Anhang) überschichtet. Die Zentrifugenröhrchen wurden anschließend für 10 min bei 277 g zentrifugiert (Hettich, Universal 320). Nach diesem Zentrifugationsschritt bildete sich auf der Saccharose ein Protoplastenring. Dieser wurde vorsichtig in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit 8 ml W5 Lösung gewaschen und erneut für 5 min bei 123 g zentrifugiert. Die im Pellet enthaltenen Protoplasten wurden kultiviert oder für Fusionen und weitere Versuche verwendet.

### 2.3.2 Bestimmung der Protoplastendichte

Die Protoplastenausbeute wurde mit Hilfe der Fuchs–Rosenthal–Zählkammer (0,200 mm) bestimmt, indem die Anzahl der Protoplasten je Großquadrat erfasst wurde. Je Probe wurden 8 Großquadrate unter dem Mikroskop Zeiss Axiovert ausgezählt. Der ermittelte Wert diente zur Einstellung der Kultur- und Fusionsdichte auf  $1 \times 10^5$  Protoplasten/ml.

Mittelwert der 8 ausgezählten Großquadrat \* 5000 = Zellzahl/ml



### 2.3.3 Färbung der Suspensionsprotoplasten mit Rhodamin G und CellTracker Blue

Um den Fusionsverlauf verfolgen und Homo- von Heterofusionaten unterscheiden zu können, wurden Protoplasten aus unterschiedlichen Geweben gewonnen. Dadurch konnten die farblichen Unterschiede der Protoplasten zur Bewertung und Beurteilung während der Fusion genutzt werden. Für die Durchführung der somatischen Hybridisierung mit farblosen Suspensionsprotoplasten beider Fusionspartner wurden für die bessere Differenzierung Vitalfarbstoffe verwendet. Für die Vitalfärbung wurde in 1 ml W5 Lösung (Anhang, 8.6.7) die Protoplastendichte von  $1 \times 10^5$  Protoplasten/ml eingestellt. Anschließend wurde der jeweilige Farbstoff, Rhodamin G (Fluka) bzw. CellTracker Blue (Invitrogen), in einer Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  hinzugegeben. Die Inkubation der Farbstoffe erfolgte bei RT im Dunkeln (Labormethode Frau DR. KLOCKE JKI Quedlinburg). Nach einer Einwirkzeit von 25 min wurden die Protoplasten mit 10 ml W5 Lösung gewaschen und für 5 min bei  $123 \text{ g}$  zentrifugiert (Universal 320, Hettich). Die gefärbten Protoplasten konnten nach diesem Waschschrift für die weitere Kultivierung und Fusion verwendet werden.

### 2.3.4 Inaktivierung der Protoplasten durch UV-Bestrahlung

Protoplasten des Pelargonien-Wildtyps wurde durch die Bestrahlung mit UV-Licht teilweise inaktiviert, um dadurch die Regeneration der Pelargonien-Kulturform nach der Fusion zu fördern. Die Inaktivierung der Protoplasten durch die UV-Bestrahlung wurde in Anlehnung an ZHANG *et al.* (2007) durchgeführt.

Für die UV-Behandlung wurden  $5 \times 10^5$  Protoplasten/ml in UV-Lösung (Anhang, Tab. 8.6.7) aufgenommen. Die Protoplasten wurden in eine sterile Petrischale überführt und im CrossLinker (Biolink BLX-254) mit  $350 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Nach der UV-Behandlung erfolgte ein Waschschrift in W5 Lösung und die Protoplasten konnten für die asymmetrische Fusion eingesetzt werden.

## 2.4 Protoplastenfusion

Für die Fusionsexperimente wurden hauptsächlich Mesophyll- und Suspensionsprotoplasten eingesetzt. In einem weiteren Versuch wurden Petalenprotoplasten isoliert und für Fusionen verwendet. Die Fusionen, die Kultivierung und die Regeneration der Protoplasten wurden mit Hilfe der Protokolle von SUNDBERG und GLIMELIUS (1986), DUNBAR und STEPHENS (1991), NASSOUR und DORION (2002) sowie HASSANEIN und DORION (2005) weiterentwickelt und durchgeführt.

### 2.4.1 Fusionen mit Polyethyleneglycol (PEG)

Zu Beginn der Fusionsexperimente wurden die Protoplasten in W5 Lösung (Anhang Tab. 8.6.6) aufgenommen, um eine Dichte von  $2 \times 10^5$  Protoplasten/ml einzustellen. Die Fusionspartner wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Von dem Protoplastengemisch wurde je ein Tropfen (450  $\mu$ l) in eine Petrischale ( $\varnothing$  3,5 cm) gegeben. Nach 10 min wurden 200  $\mu$ l der FM 4 Lösung (Anhang, Tab. 8.6.8) zu dem Protoplastentropfen pipettiert. Dieser Fusionsansatz wurde bei RT inkubiert. Nach 25 min wurde die FM 4 Lösung abdekantiert und durch die FM 5 Lösung (Anhang, Tab. 8.6.8) ersetzt. In drei Waschsritten mit der FM 5 Lösung wurde die FM 4 vollständig entfernt, anschließend wurde das fusionierte Protoplastengemisch in 2 ml PPM 1 Medium aufgenommen und bei 25 °C im Dunkeln kultiviert.

### 2.4.2 Elektrofusion

Die Durchführung der Elektrofusion erfolgte im ECM Electro Cell Manipulator 2001 der Firma BTX nach dem im Handbuch für Protoplasten angegebenen Protokoll. Für die Elektrofusion wurden die Protoplasten in der Elektrofusions-Lösung (Anhang, Tab. 8.6.8) aufgenommen und auf eine Protoplastendichte von  $2 \times 10^5$  Protoplasten/ml eingestellt. Die Fusionspartner wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und je 100  $\mu$ l dieses Protoplastengemisches wurden in eine sterile Küvette (Plattenabstand 1 mm) der Firma BTX überführt.

Die Fusionsparameter wurden wie folgt eingestellt: AC Alignment (Wechselstrom) 1 MHz, 35 V, 25 sec; DC Fusion (Gleichstrom) 260 V, 40  $\mu$ sec. Nach dem Fusionsereignis wurden die Protoplasten in 2 ml PPM 1 Medium (Anhang Tab. 8.3) in eine sterile Petrischale ( $\varnothing$  3,5 cm) überführt und bei 25 °C im Dunkeln kultiviert (Protoplastenenddicke  $3 \times 10^5$  Protoplasten/ml). Elektrofusionen wurden mit Mesophyll- und Mesophyllprotoplasten, sowie mit Mesophyll- und Suspensionsprotoplasten durchgeführt.

### 2.4.3 Bestimmung der Vitalitäts-, Heterofusions- und Teilungsrate

Die Vitalitätsbestimmung der Protoplasten erfolgt mittels Fluorescein-Diacetat (FDA) nach WIDHOLM (1972). Das FDA (Serva) wurde in Aceton (Merck) gelöst (5 mg/ml), 20  $\mu$ l dieser Lösung wurden mit 20  $\mu$ l Protoplastenlösung ( $1 \times 10^5$  Protoplasten/ml) und 1 ml W5 Lösung gemischt. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurde ein Tropfen (40  $\mu$ l) unter dem Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) bei 100facher Vergrößerung unter Fluoreszenzlicht betrachtet. In vier Gesichtsfeldern wurde die Anzahl der fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Protoplasten ermittelt. Die Vitalitätsrate wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl fluoreszierender Protoplasten}}{\text{Gesamtzahl der Protoplasten}} \times 100 \%$$

Die Heterofusionsrate wurde bei Fusionen mit farblich unterschiedlichen Protoplasten bestimmt. Zur Ermittlung der Fusionsrate wurden 4 Gesichtsfelder je Fusionsansatz unter dem Mikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss) bei 100 facher Vergrößerung ausgezählt. Die Heterofusionsrate wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der heterologen Fusionsprodukte}}{\text{Anzahl der intakten Protoplasten}} \times 100 \%$$

## Material und Methoden

Nach 3 bis 5 Tagen wurde - in Abhängigkeit vom Genotyp und je nach Entwicklung- die Teilungsrate durch das Auszählen von vier Gesichtsfeldern pro Petrischale im Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss) bei 200 facher Vergrößerung bestimmt. Die Zellteilungsrate wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellteilungen}}{\text{Gesamtzahl der Protoplasten}} \times 100 \%$$

## 2.5 Kultivierung und Regeneration der Protoplasten

### 2.5.1 Flüssigkultur der Protoplasten

Die frisch isolierten Mesophyll-, Suspensions- und Petalenprotoplasten wurden - ebenso wie die fusionierten Protoplasten - in einer Petrischale ( $\emptyset$  3,5 cm) in 2 ml PPM 1 Medium (Anhang, Tab. 8.3) bei 25 °C im Dunkeln kultiviert. Nach drei bis fünf Tagen wurden die Kulturen mit 3 ml PPM 2 Medium verdünnt (Anhang, Tab. 8.3). Die Kultivierung erfolgte ab dieser Verdünnung im Klimaschrank (Percival) in einer Petrischale ( $\emptyset$  10 cm) bei 25 °C und einer Lichtintensität von 9  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h Tag/8 h Nacht. Zehn Tage nach der Isolierung und/oder Fusion erfolgte eine weitere Verdünnung mit 3 ml PPM 2 Medium (ohne Mannit als Osmoticum). Die Aggregate wurden je nach Entwicklung ca. 21 Tage nach Isolierung/Fusion ein weiteres Mal mit 6 ml PPM 2 Medium (ohne Mannit) in einer Petrischale verdünnt.

### 2.5.2 Kalluskultur und Sprossregeneration aus Protoplasten

Circa einen Monat nach der Protoplastenisolierung wurden die Mikrocalli im Flüssigmedium auf das PPM 3\* Medium (Anhang, Tab 8.3) überführt.

Hierzu wurde die Flüssigkultur auf PPM 3\* Medium (Petrischale) ausplattiert, so dass sich Aggregate absetzten und das Flüssigmedium mit einer sterilen Transferpipette abgenommen werden konnte. Die Kultivierung der Mikrocalli erfolgte für 4 Wochen bei 25 °C und einer Belichtungsstärke von 39  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  bei 16 h Tag und 8 h Nacht. Die daraus hervorgegangenen Kalli wurden auf Petrischalen mit PRM 10 Medium (Anhang, Tab 8.4) überführt und für einen weiteren Monat bei 25 °C und einer Lichtintensität von 52  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  kultiviert. Die Kalli, aus denen bereits kleine Pflanzen regenerierten, wurden auf PMSV Medium (Anhang, Tab 8.5) weiterkultiviert, um die Sprossverlängerung zu forcieren. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Kultivierung in der Klimakammer bei 25 °C, die Lichtintensität betrug während der Sprossverlängerung 65  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (Philips Master TL D 36 W/865).

Auf dem Sprossverlängerungsmedium (PMSV) befanden sich die Regenerate ungefähr einen Monat. Anschließend wurden die Pflanzen in In-vitro-Gefäße (Babygläser, Sigma) mit KAD 1 Medium (Anhang, Tab 8.1) überführt. Es folgte eine Kultivierung von 2 Wochen auf KAD 2 (Anhang, Tab 8.1) und abschließend auf 30 ml KAD 3 (Anhang, Tab 8.1). Das KAD 3 Medium wurde zur Bewurzelung eingesetzt (Abb. 2.3).

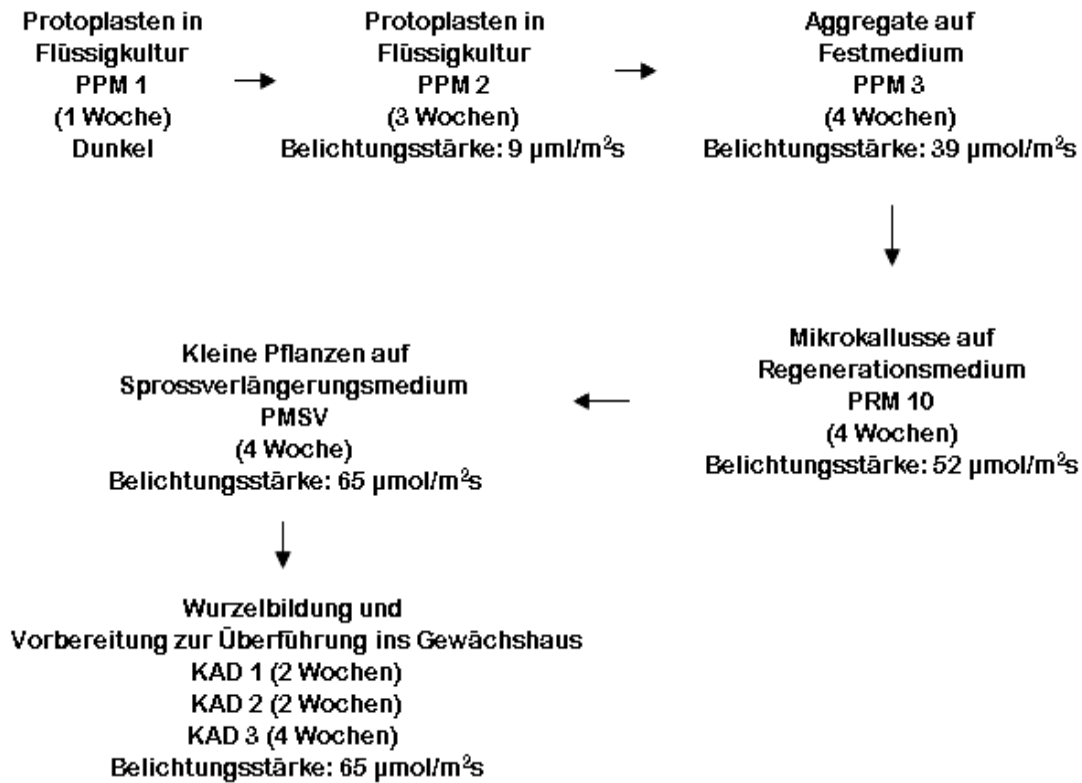


Abb. 2.3: Allgemeines Regenerationsschema mit den einzelnen Kultivierungszwischenschritten vom Pelargonium-Protooplasten bis zur vollständig regenerierten Pelargonium-Pflanze.

### 2.5.3 Einsatz verschiedener Zusatzstoffe während der Regeneration

Es wurden verschiedene Medienkombinationen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Protoplastenregeneration untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Verfestigungsmittel (Agar-Agar, Phytigel), Phytohormonkombinationen/-konzentrationen sowie weiterer Zusatzstoffe, wie Nitroprussid (Nitroprussid-Natrium-Dihydrat, Roth) und Chitosan (Chitosankapsel, Allpharm Vertriebs GmbH; Chitosan niederviskos, Sigma; Chitosan mittelviskos, Sigma) auf die Regeneration geprüft.

Des Weiteren wurden Bakterientoxine eingesetzt, um eine selektive Regeneration zu unterstützen. Ein häufig in der In-vitro-Kultur verwendetes Verfestigungsmittel ist Phytigel (PODWYSZYNSKA und OLSZEWSKI 1995). In Vorversuchen wurde der Einfluss des Verfestigungsmittels auf die Regeneration getestet.

Die verwendeten Phytohormone wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren in entsprechender Konzentration dem jeweiligen Medium zugegeben.

Um den Effekt auf die Wurzelbildung zu überprüfen, wurden 30 und 60  $\mu\text{M}$  Nitroprussid zum PMSV Medium (Anhang Tab. 8.5) zugegeben. Dazu wurde das Nitroprussid in Wasser gelöst, sterilfiltriert und in entsprechender Konzentration zum PMSV Medium pipettiert.

In Versuchen zur Auswirkung von Chitosan auf die Regeneration von Pelargonien-Kallus, wurden drei verschiedene Chitosanherkünfte getestet. Das Chitosan wurde in einer Konzentration von 15 mg/l zum PMSV Medium gegeben.

#### **2.5.4 Überführung der Regenerate**

Nachdem die Regeneratpflanzen auf dem KAD 3 Medium (Anhang Tab. 8.1) Wurzeln ausgebildet hatten, wurden sie für eine Woche bei 18 °C kultiviert.

Für die Überführung ins Gewächshaus wurde das Medium von den Wurzeln der In-vitro-Pflanzen komplett entfernt. Die Pflanzen wurden in Frühstorfer Erde (Aussaats- und Stecklingserde) pikiert und mit einem Fungizid [Previcur (Maag), 0,15 %] angegossen. Die Akklimatisierung der getopften Pflanzen erfolgte bei 22 °C und einer relativen Luftfeuchte von 100 % in einem Minigewächshaus in einer Klimakammer unter Tag-Nacht-Bedingungen (16 h Tag/8 h Nacht) und einer Lichtintensität von 32  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ .

Um die Pflanzen abzuhärten, wurden täglich die Minigewächshäuser geöffnet bzw. die Deckel entfernt. Nach zwei Wochen konnten die Pflanzen aus den Minigewächshäusern in die Anzuchtkabine (20 °C) überführt werden.

## 2.6 Charakterisierung der Regenerate

Die nach einer Fusion regenerierten und ins Gewächshaus überführten Pflanzen wurden hinsichtlich ihrer phänotypischen Merkmale bonitiert. Hierzu wurden die Blattformen und der gesamte Pflanzenaufbau der Ausgangspflanzen mit dem der Regeneratpflanzen verglichen. Pflanzen mit phänotypischen Auffälligkeiten wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

### 2.6.1 Messung des DNA - Gehaltes mittels Flowcytometrie (FCM)

Die Aufarbeitung der Proben für die flowzytometrische Untersuchung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von DOLEZEL und BARTOS (2005).

Für die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Ausgangspflanzen wurden 0,01–0,03 g Blattmaterial sowohl von In-vitro–Pflanzen als auch von Pflanzen aus dem Gewächshaus entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 500 µl Extraktionspuffer (Cystain PI Absolute P, Partec) und einer Karbidkugel (Qiagen, 3 mm) überführt. Anschließend wurde die Probe in eine Mühle (Retsch, MM 300) eingespannt und 30 sec bei einer Frequenz von 30 Schwingungen/s zerkleinert. Die zerkleinerte Probe wurde mit Hilfe einer Transferpipette in ein Polystyrol Rundboden–Röhrchen mit in der Kappe integriertem Zellsieb (BD Falcon) überführt.

Je Probe wurden 2 ml Puffer [Zusammensetzung: 2 ml „Staining“ Puffer [Cystain PI Absolute P (Partec), 12 µl Propidiumiodid (1 mg/ml, Sigma), 6 µl Ribonuclease (50 mg/ml, Serva) und 5 % PVP 25 (Serva)] zugegeben. Die Proben wurden kurz auf Eis inkubiert und dann im Durchflusszytometer (BD FACS Calibur) gemessen (Anhang 8.7 Messprotokoll). Pro Probe wurden 10000 Partikel gemessen.

Die Berechnung des DNA-Gehaltes der Ausgangs- und Fusionspflanzen wurde mit Hilfe des Standards *Raphanus sativus* (1,38 pg, mündliche Mitteilung DR. O. SCHRADER, JKI Quedlinburg) durchgeführt.



## 2.6.2 Molekulargenetische Untersuchung

### 2.6.2.1 DNA Isolierung und Bestimmung der DNA Konzentration

Die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte modifiziert nach dem Protokoll von POREBSKI *et al.* (1997). Von den zu untersuchenden Pflanzen wurden je 100 mg Blattmaterial entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Nach der Zugabe von 400 µl des auf 60 °C erwärmten Extraktionspuffers (Tab. 2.3) und einer Karbidkugel (Qiagen, 3 mm) wurde das Reaktionsgefäß in eine Mühle (Retsch, MM 300) eingespannt und für 2 x 5 min bei einer Frequenz von 30 Schwingungen/s zermahlen. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad bei 60 °C inkubiert. Nach 1 h erfolgte die Zugabe von 500 µl eines Chloroform–Isoamylalkohol–Gemisches (24:1, v/v) und die Proben wurden kurz geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation von 20 min bei 15142 g (Hettich Zentrifuge, EBA 12). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Anschließend wurde der Überstand mit 0,5 Volumen einer 5 M NaCl Lösung (Roth) versetzt und gut vermischt. Dann erfolgte die Zugabe von 2 Volumen kaltem (-20 °C) Ethanol (96 %, Roth), die Proben wurden leicht geschwenkt und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min bei RT und 15142 g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml kaltem (-20 °C) Ethanol (70 %, Roth) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 15142 g wurde das DNA Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) für 10 min bei 30 °C getrocknet und in 100 µl TE–Puffer (Tab. 2.3) über Nacht gelöst. Nach der Zugabe von 1 µl RNase A (10 mg/ml, Roche) erfolgte eine Inkubation bei 37 °C im Thermomixer Comfort (Eppendorf) für 1 h. Zur Entfernung von Nukleasen erfolgte die Zugabe von 1 µl Proteinase K (1 mg/ml, Roche) und die Inkubation wurde 1 h fortgesetzt. Anschließend wurden 100 µl eines Chloroform–Isoamylalkohol–Gemisches (24:1, v/v) hinzupipettiert und die Proben wurden für 10 min bei 15142 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) übertragen, zur unteren Phase wurden 100 µl TE–Puffer pipettiert und es erfolgte eine Durchmischung mit anschließender Zentrifugation (10 min 15142 g).

## Material und Methoden

Die erhaltene obere Phase wurde zur bereits vorhandenen oberen Phase hinzugefügt. Zur gesammelten oberen Phase wurden 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (Roth) und 2 Volumen Ethanol (96 %, Roth) gegeben und leicht geschwenkt. Die Fällung der DNA erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 min.

Im Anschluss an die Fällung wurde für 10 min bei 15142 *g* zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in Ethanol (70 %, Roth) gewaschen und für 10 min bei 15142 *g* zentrifugiert und für ca. 12 min in der Vakuumentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Abschließend wurde das DNA-Pellet in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer aufgenommen. Für die Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden die Proben 1:100 in Reinstwasser verdünnt und durch die Messung in einem Spektralphotometer (Spectramax Plus 384, Molecular Devices) wurde die DNA-Konzentrationen bestimmt.

Tab. 2.3: Lösungen und Reagenzien für die DNA Extraktion

Reagenz (Hersteller)	Konzentration/Anteil
<b>Extraktionspuffer</b>	
Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (AppliChem)	100 mM
Natriumchlorid, NaCl (Roth)	1,4 M
EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (Roth)	20 mM
CTAB, $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ (AppliChem)	2 %
2-Mercaptoethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ (Roth)	0,30 %
PVP 40 (Serva)	100 mg/g Blattmaterial
pH-Wert	8,0
<b>Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)</b>	
Chloroform, $\text{CHCl}_3$ (Roth)	96 %
Isoamylalkohol, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ (Roth)	4 %
<b>TE-Puffer</b>	
Tris-HCl (AppliChem)	10 mM
EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (Roth)	1 mM
pH-Wert	8,4

### 2.6.2.2 Molekulargenetische Untersuchungen mit Hilfe von Mikrosatelliten

Die molekulargenetischen Untersuchungen an Regeneratpflanzen erfolgten mit Hilfe von Mikrosatelliten, die von BECHER *et al.* (2000) beschrieben wurden. Die Sequenzen wurden freundlicherweise von K. Weising (Universität Kassel) zur Verfügung gestellt. Es wurden 6 Mikrosatelliten (Tab. 2.4) ausgewählt und bei der Firma Metabion, Martinsried, entsprechende Primer synthetisiert. Bei den Primerkombinationen PhSSR 13, PhSSR 17 und PhSSR 21 wurde jeweils der „forward Primer“ mit einem Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 685 nm (IRD 700) markiert. Bei den Primerkombinationen PhSSR 26, PhSSR 45 und PhSSR 49 erfolgte eine Fluoreszenzmarkierung mit einem Farbstoff, der ein Absorptionsmaximum bei 795 nm (IRD 800) aufwies. Die Fluoreszenzmarkierung war notwendig, um SSRs mit Hilfe des LICOR-Systems detektieren zu können. Der Reaktionsansatz für die PCR hatte ein Volumen von 25 µl und setzte sich, wie in Tab. 2.5 dargestellt, zusammen. Das verwendete Programm nach BECHER *et al.* (2000) für den Thermocycler (iCycler, Biorad) ist in Tab. 2.6 zusammengefasst.

Tab. 2.4: Für die Regeneratcharakterisierung verwendete Mikrosatelliten

Code	Mikrosatellit	Primersequenzen (5'-3')
PhSSR 13	(GC) <sub>5</sub> N <sub>20</sub> (CT) <sub>7</sub> C <sub>4</sub> (CT) <sub>5</sub>	(forward) AAGGTGACGAGGCAACCTTA (reverse) TCCCAACCTTGAACCAATC
PhSSR 17	(GA) <sub>5</sub> AA (GA) <sub>3</sub> N <sub>33</sub> (GA) <sub>11</sub> N <sub>39</sub> (GA)	(forward) TCCCCACCTCCCACACTAT (reverse) GCCCATAAGGTTATGCTTGC
PhSSR 21	(CA) <sub>14</sub>	(forward) TTGTTGAATCCCAGCCCTAC (reverse) GGATCTTCTCATGAGTTGGTTTG
PhSSR 25	(CA) <sub>8</sub> N <sub>76</sub> (CA) <sub>6</sub>	(forward) CAAAACCATTCAATTGCAACA (reverse) TGTGTTGTGTACGCTAGAGG
PhSSR 45	(CTT) <sub>31</sub>	(forward) GCACTGCAATTCCAATGAAGA (reverse) AAAGCCATTCCCAAGTGAAC
PhSSR 49	GAA <sub>13</sub> T (GAG) <sub>2</sub> (AAG) <sub>2</sub> GA (GAA) <sub>17</sub>	(forward) GCGTAAAGGGCGAATATGAA (reverse) GCATTCTGTATGTTGCATCCC

Tab. 2.5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes (25 µl nach BECHER *et al.* 2000) für die Mikrosatellitenanalyse

Reagenzien (Hersteller)	Endkonzentration
DNA	20 ng
Tween 20 (AppliChem)	0,01 %
10 x Puffer mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> (Qbiogene)	1 x
dNTPs (Fermentas)	0,2 mM
Primer (forward)	0,25 µM
Primer (reverse)	0,25 µM
Taq - Polymerase (Qbiogene)	0,025 U/µl

Tab. 2.6: Thermocycler-Programm für die *Pelargonium*-Mikrosatelliten (nach BECHER *et al.* 2000)

Schritt	Temp [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	94	25 sec	30
Annealing	52	45 sec	
Elongation	65	60 sec	
Final Elongation	65	7	1

Nach Beendigung der PCR wurden die Proben 1:1 mit Formamid-Ladepuffer (Anhang, Tab. 8.8.3) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und jeweils 0,7 µl einer jeden Reaktion auf ein Polyacrylamidgel (Anhang, Tab. 8.8.1) aufgetragen und für 2 h im Gel Analyzer LICOR (1500 V, 40 mA, 40 W, 45 °C) aufgetrennt.

### 2.6.3 Zytologische Charakterisierung der Regenerate mittels Genomischer-in-situ-Hybridisierung (GISH)

Die Genomische-in-situ-Hybridisierung wurde an Wurzelspitzenpräparaten von 4 bis 6 Wochen alten *Pelargonien*stecklingen nach dem Protokoll von SCHOLZ *et al.* (2009) durchgeführt.

#### 2.6.4 Inhaltsstoffanalyse

Durch eine Inhaltsstoffanalyse der Blätter wurde versucht, die Regenerat- und Ausgangspflanzen anhand ihres Metabolitmusters zu charakterisieren. Hierfür wurde die Gaschromatographie in Kombination mit der Twister Methode (sog. stir-bar-sorptive extraction, SBSE) der Firma Gerstel angewendet ([www.gerstel.com](http://www.gerstel.com)). Der Twister ist rein optisch wie ein Rührstab für einen Magnetrührer gebaut und funktioniert nach demselben Prinzip. Der Unterschied zum Magnetrührer besteht darin, dass sich der Sorptionsmantel (Polydimethylsiloxan) des Twisters während des Drehvorgangs mit organischen Inhaltsstoffen (aus einer Flüssigkeit oder einer Gasphase) anreichert. Nach der Inkubation wurde der Twister in das Thermodesorptionssystem Gerstel-TDS 2 überführt. Dort erfolgte die Thermodesorption, sowie die anschließende Chromatographie und Detektion direkt vom Twister aus ([www.gerstel.com](http://www.gerstel.com)).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Inhaltsstoffe aus der Gasphase aufgenommen und analysiert. Pro Pflanze wurde je ein Blatt entnommen und in eine 250 ml Blaukappenflasche (Schott) überführt.

Nach der Zugabe eines konditionierten Twisters pro Flasche wurden diese verschlossen und 24 h bei RT inkubiert. Die vorherige Konditionierung der Twister wurde nach dem Protokoll der Firma Gerstel durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Twister mit Hilfe einer Gaschromatographie mit masseselektivem Detektor (Agilent Technologies 5975 B, VLMSD) analysiert (Anhang, 8.9 Messprotokoll). Um festzulegen ab welcher Peakhöhe eine Auswertung erfolgt, wurde ein Schwellenwert festgelegt. Peaks unter einem Peak/Rauschverhältnis von 6:1 wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die Identifizierung der vorhandenen Substanzen wurde mit Hilfe der Bibliothekssuche in der NIST-Bibliothek (National Institute of Standards and Technology) durchgeführt.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Konfidenzintervalle wurde mit der Software Excel (Microsoft Corporation 2003) berechnet. Bei der Berechnung des Konfidenzintervalls wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 0,05$  angenommen. Weitere statistische Berechnungen wurden mit der AUDPC (Area under disease progress curve) durchgeführt. Die AUDPC ist die Fläche unter der Befallsverlaufkurve, die sich aus einzelnen Erhebungsterminen ergibt (SHANNER und FINNEY 1977). Die Berechnung wurde mit dem System SAS durchgeführt (SAS Institute 2003).

Für diese statistische Auswertung wurden die Boniturnoten in Prozent [%] umgewandelt [ $\%=(\text{Note}-1)*12,5$ ]. Verglichen wurden in der Varianzanalyse sowohl der integrierte Wert als Fläche unter der Befallskurve (AO) als auch die drei Bonituren jeweils getrennt. Als Faktor wurde die Wiederholung in die Berechnung einbezogen. Es wurde der Mittelwertsvergleich nach Tukey gerechnet, da die Stichprobenzahl nicht immer gleich groß war, wurde der Mittelwertsvergleich mittels LSMEANS (Methode der kleinsten Quadrate der Mittelwerte) mit der Korrektur nach Tukey gerechnet.

Im Bereich der In-vitro-Kultur und Protoplastenfusion sind auf Grund der Vielzahl an Einflussfaktoren statistischen Berechnungen nur eingeschränkt möglich gewesen. Da es sich bei der Protoplastenfusion um keine standardisierten Routineversuche handelt, sind in diesem Bereich meist Einzelergebnisse dargestellt, mögliche Verallgemeinerungen werden diskutiert.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Resistenzevaluierung**

#### **3.1.1 Methodenentwicklung**

##### **3.1.1.1 *Xanthomonas*-Test**

Durch das Schneiden von Apikalstecklingen mit einer kontaminierten Gartenschere konnten im *Xanthomonas*-Test (2.1.1.1) beim anfälligen Standard (501) sehr hohe Befallsraten erreicht werden. Die Methode lieferte reproduzierbare Ergebnisse und wurde deshalb für die Virulenzanalysen und die anschließenden Resistenzprüfungen eingesetzt.

##### **3.1.1.2 *Ralstonia*-Test**

Für den *Ralstonia*-Test sind zwei verschiedene Methoden geprüft worden. Bei allen Isolaten wurde durch das zusätzliche Verletzen der Wurzeln (Methode B) ein höherer Befall an den Testpflanzen erreicht (Abb. 3.1).

## Ergebnisse

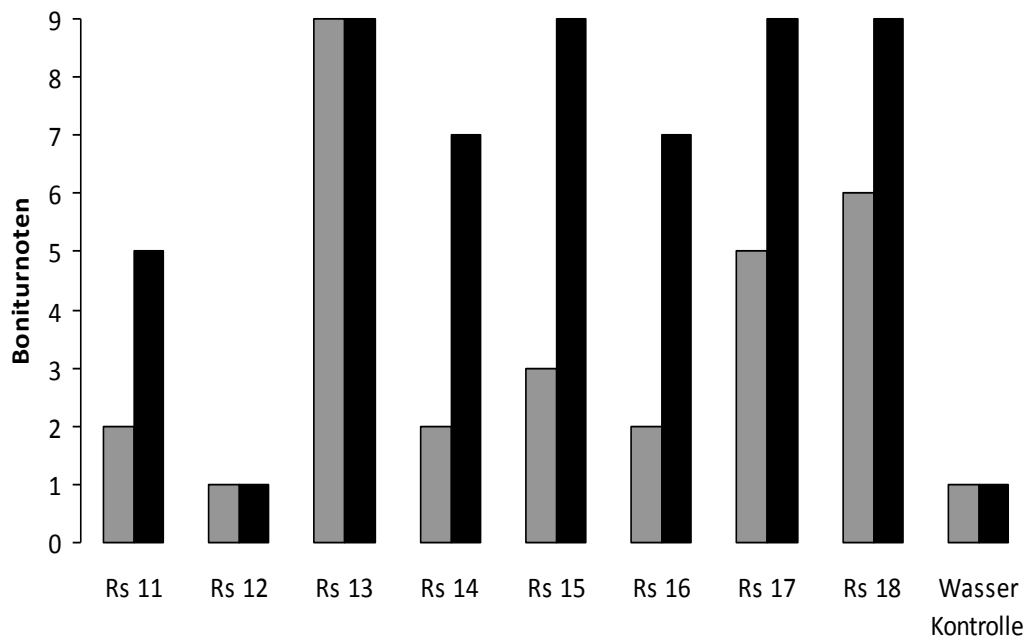


Abb. 3.1: Vergleich von zwei geeigneten Inokulationsmethoden für das Resistenzscreening mit *Ralstonia solanacearum* Isolaten. Befall (Boniturnoten 4 Wochen nach Inokulation) Methode A (grau): Mit 100 ml einer Bakteriensuspension  $1 \times 10^8$  cfu/ml/Topf  $\varnothing$  12 cm wurden die 8 Wochen alten Pflanzen des anfälligen Genotyps 503 angegossen. Methode B (schwarz): wie Methode A, zusätzliche Verletzung der Wurzeln mit einem Messer.

Auf Grund der stärkeren Symptomausprägung bei der Inokulation mit der Methode B, wurde für die Virulenz- und Resistenzprüfung diese Methode verwendet.

### 3.1.2 Virulenzanalysen

#### *Xanthomonas*

Für die Virulenzanalyse wurden zunächst alle 17 vorhandenen *Xanthomonas*-Isolate am anfälligen Genotyp 503 hinsichtlich ihrer Virulenz getestet. Die Isolate *Xhp* 4, *Xhp* 6, *Xhp* 10, *Xhp* 11 und *Xhp* 16 erwiesen sich vier Wochen nach der Inokulation als hoch virulent (Abb. 3.2). Für das Resistenzscreening wurden davon die Isolate *Xhp* 4, *Xhp* 6 und *Xhp* 10 ausgewählt.



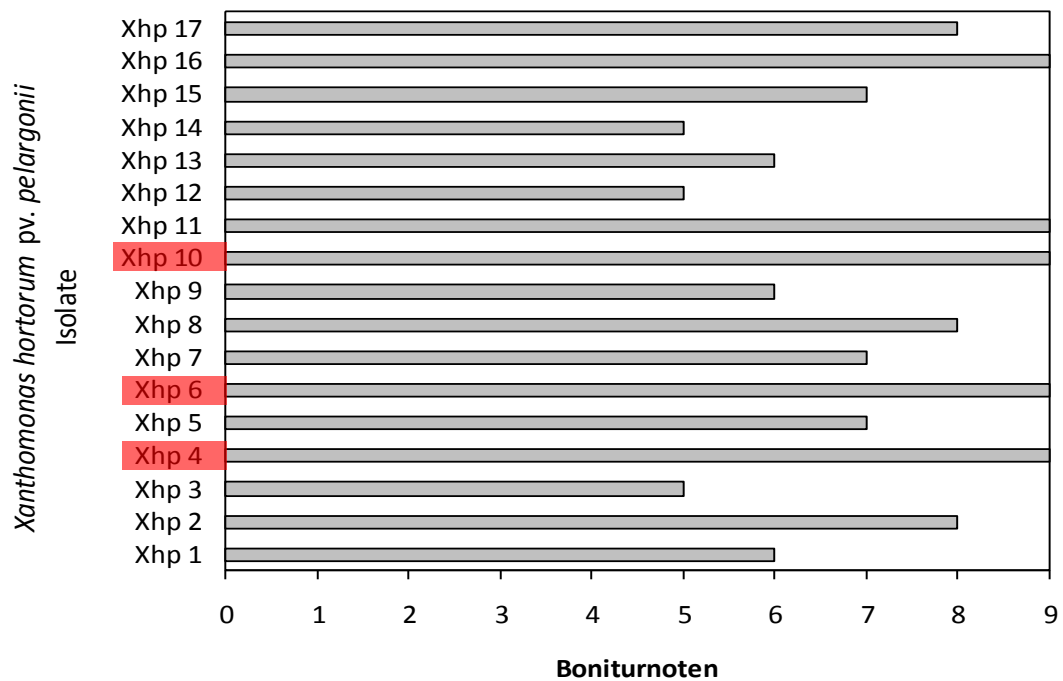


Abb. 3.2: Virulenzanalyse von *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*; Befall (Boniturnoten) 4 Wochen nach Inokulation (Isolate mit farblicher Markierung wurden für das Resistenzscreening verwendet). Für die Virulenzanalyse wurden Pelargonienpflanzen des anfälligen Genotyps 503 verwendet.

Sie sind sowohl als Einzelisolate, als auch im Gemisch geprüft worden. Um eine geeignete Inokulumdichte bestimmen zu können, mit der reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, wurden vier verschiedene Verdünnungsstufen getestet und die Einzelisolate dem Isolatgemisch gegenübergestellt (Abb. 3.3).

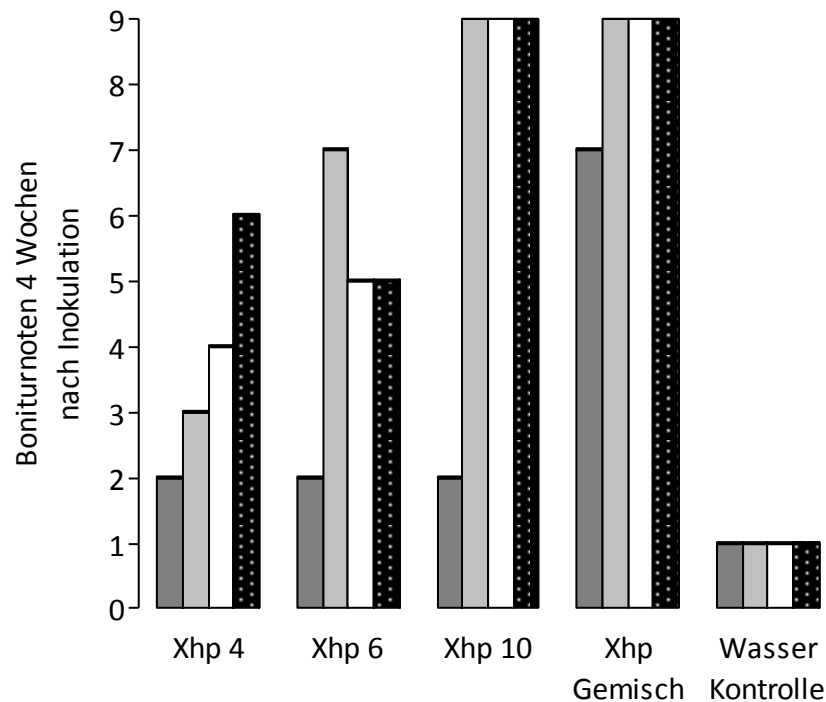


Abb. 3.3: Einfluss unterschiedlicher Inokulumdichten auf den *Xanthomonas*-Befall bei Verwendung von Einzelisolaten und einem Isolatgemisch (Xhp 4, Xhp 6, Xhp10), 4 Wochen nach Inokulation (dunkelgrau =  $1 \times 10^5$  cfu/ml; grau =  $1 \times 10^6$  cfu/ml; weiß  $1 \times 10^7$  cfu/ml; gepunktet =  $1 \times 10^8$  cfu/ml). Die Testung erfolgte am anfälligen *Pelargonium*-Genotyp 503.

Das Isolatgemisch zeigte bei den Verdünnungsstufen  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^8$  cfu/ml eine sehr hohe Virulenz (Boniturnote 9). Ein nahezu gleiches Ergebnis erbrachte auch das Isolat Xhp 10, das von *Pelargonien* stammt. Für das Resistenzscreening des *Pelargonium* Sortimentes wurde das *Xanthomonas*-Isolatgemisch mit der höchsten Inokulumdichte ( $1 \times 10^8$  cfu/ml) verwendet.

### *Ralstonia*

30 *Ralstonia* Isolate unterschiedlicher Herkunft, wurden am anfälligen Genotyp (503) hinsichtlich ihrer Virulenz geprüft. Bei der Testung zeigten sich deutliche Virulenzunterschiede (ENGEL *et al.* 2008).

Von den 30 *R. solanacearum* Isolaten wurden auf Grund der Ergebnisse der Virulenzanalyse die Stämme Rs 13 aus Aschersleben (von Tomate) und die beiden von Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*) isolierten Stämme Rs 19 und Rs 20 aus der DSMZ Braunschweig für die Resistenzuntersuchungen an *Pelargonium* ausgewählt (Abb.3.4).

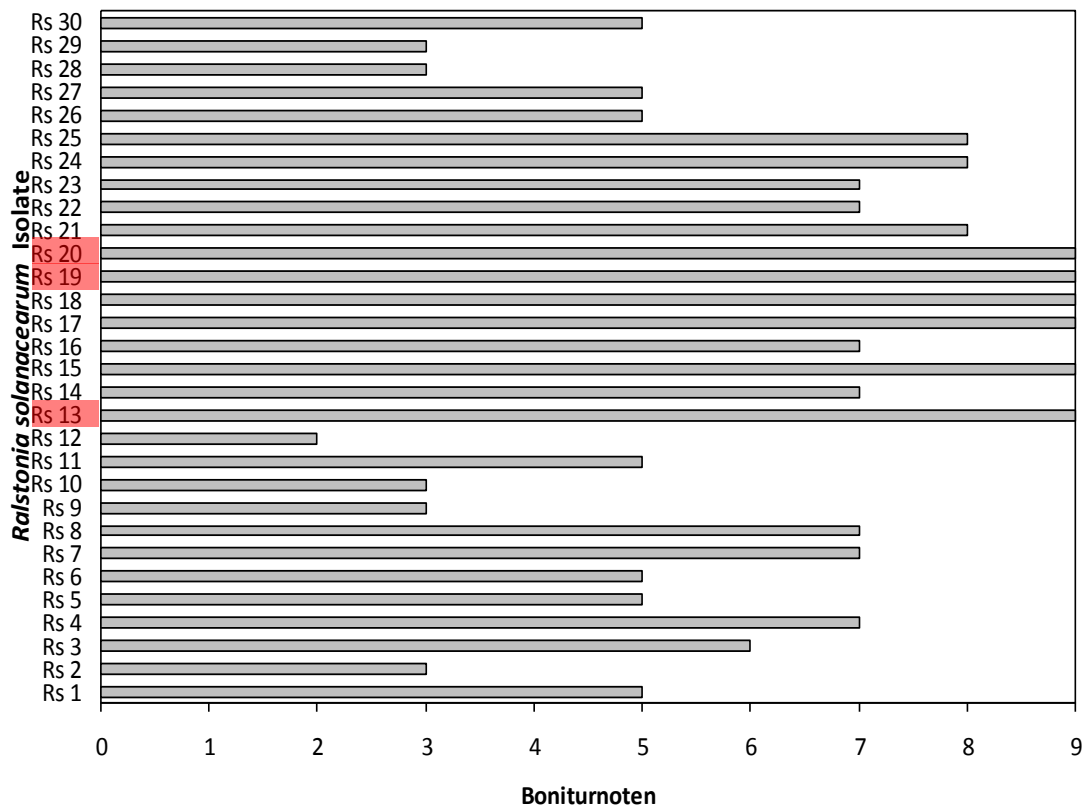


Abb. 3.4: Virulenzanalyse von *Ralstonia solanacearum*-Stämmen; Befall (Boniturnoten) 4 Wochen nach Inokulation (Isolate mit farblicher Markierung wurden für das Resistenzscreening verwendet). Die Virulenzanalyse wurde am anfälligen *Pelargonium*-Genotyp 503 durchgeführt.

Anschließend waren für diese drei Isolate die optimalen Inokulumdichten der Einzelisolate und des Isolategemisches zu ermitteln (Abb. 3.5). Getestet wurden Keimdichten von  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^8$  cfu/ml. Bei der höchsten Inokulumdichte wurden sowohl die mit Einzelisolaten als auch die mit dem Isolategemisch inokulierten Pflanzen vollständig befallen und deshalb mit der Endboniturnote 9 bewertet.

Für die Resistenzuntersuchungen ist das *Ralstonia* Isolategemisch mit der Inokulumdichte von  $1 \times 10^8$  cfu/ml ausgewählt worden.

## Ergebnisse

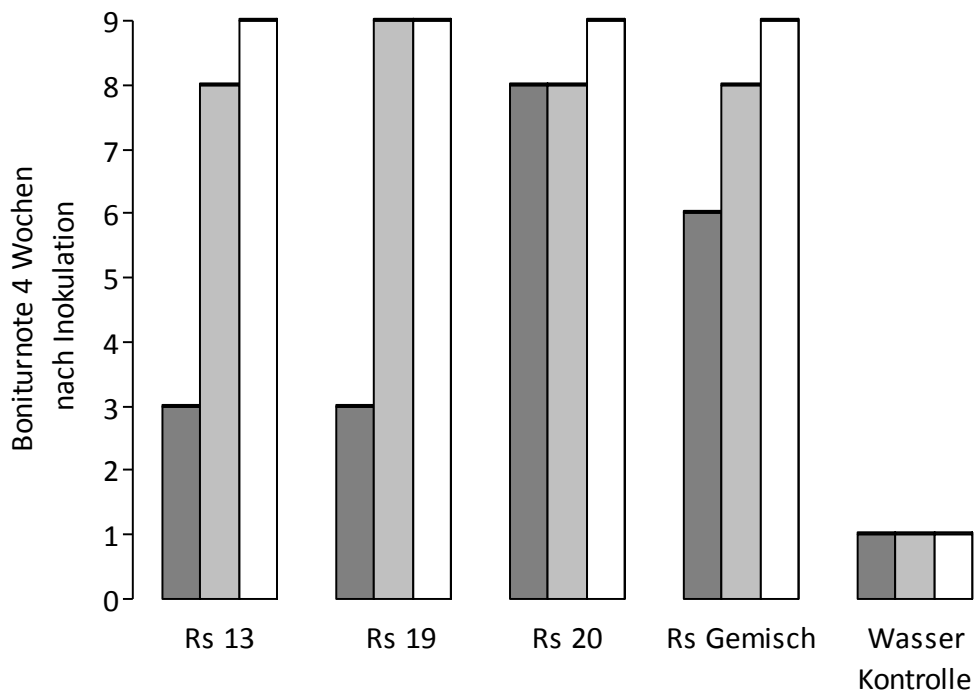


Abb. 3.5: Krankheitsentwicklung nach Inokulation unterschiedlicher Inokulumdichten bei *Ralstonia*; Vergleich von Einzelisolaten gegenüber dem Isolategemisch (Rs 13, Rs 19, Rs 20), 4 Wochen nach Inokulation (dunkelgrau =  $1 \times 10^6$  cfu/ml; grau =  $1 \times 10^7$  cfu/ml; weiß  $1 \times 10^8$  cfu/ml). Die Prüfungen der Inokulumdichten wurden am anfälligen Pelargonium-Genotyp 503 durchgeführt.

### 3.1.3 Ergebnisse der Resistenztestungen

Für die Resistenztestungen wurden die virulentesten Isolate ausgewählt und als Isolatgemisch eingesetzt. Die *Xanthomonas*-Testung wurde mit den Isolaten Xhp 4, Xhp 6 und Xhp 10 durchgeführt. Für die *Ralstonia*-Testung wurden die Isolate Rs 13, Rs 19 und Rs 20 verwendet.

Von den 114 Pelargonien Genotypen, die sowohl gegen *X. hortorum* pv. *pelargonii* als auch gegen *R. solanacearum* getestet wurden (Tab 3.1), erwiesen sich drei als resistent gegen beide Erreger, Sie zeigten weder Symptome, noch konnten die Erreger im Pflanzenmaterial nachgewiesen werden. Weitere zwei Genotypen waren resistent gegen *X. hortorum* pv. *pelargonii*, allerdings anfällig für *R. solanacearum*.

Ein Genotyp konnte als resistent gegen *Ralstonia* und tolerant gegenüber *Xanthomonas* eingestuft werden. Die Pflanzen blieben in beiden Tests symptomfrei, aus dem Stängel konnten jedoch Xanthomonaden isoliert werden. 37 Genotypen waren tolerant gegenüber beiden Erregern, 24 Genotypen tolerant gegenüber *Xanthomonas*, aber anfällig für *Ralstonia*. 13 Genotypen wurden als tolerant gegenüber *R. solanacearum* und anfällig für *X. hortorum* pv. *pelargonii* identifiziert. 34 Genotypen waren anfällig für beide Erreger (Tab. 3.1).

Tab.3.1: Ergebnisse der Resistenztestung. Die unterschiedlichen Genotypen wurden jeweils mit den Isolatgemischen von *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Xhp 4, Xhp 6, Xhp 10) und *Ralstonia solanacearum* (Rs 13, Rs 19, Rs 20) inokuliert. Die Bonitur erfolgte jeweils 14, 21 und 28 Tage nach der Inokulation. Die Durchschnittswerte der einzelnen Bonituretermine sind in der Tabelle dargestellt.

Nr	Genotyp	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Xhp</i>			Eigenschaften	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Rs</i>			Eigenschaften
		14 Tage	21 Tage	28 Tage		14 Tage	21 Tage	28 Tage	
1	501	3	5	8	anfällig	6	7	8	anfällig
2	503	3	4	8	anfällig	3	4	5	anfällig
3	505	3	3	4	tolerant	2	3	3	tolerant
4	511	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
5	519	1	1	1	tolerant	1	3	3	tolerant
6	522	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
7	523	1	1	1	tolerant	5	9	9	anfällig
8	524	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
9	525	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
10	526	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
11	527	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
12	530	1	3	5	anfällig	2	2	2	tolerant
13	532	1	2	3	tolerant	6	8	9	anfällig
14	533	2	3	3	anfällig	3	4	4	anfällig
15	534	2	2	3	anfällig	3	4	5	anfällig
16	535	2	3	4	anfällig	3	4	4	anfällig
17	538	2	3	4	anfällig	2	3	4	anfällig
18	539	2	3	6	anfällig	5	7	7	anfällig
19	540	2	3	6	anfällig	4	4	5	anfällig
20	541	1	1	2	tolerant	3	4	5	anfällig
21	549	3	5	7	anfällig	5	7	8	anfällig
22	552	3	3	3	anfällig	3	4	6	anfällig

Nr	Genotyp	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Xhp</i>			Eigenschaften	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Rs</i>			Eigenschaften
		14 Tage	21 Tage	28 Tage		14 Tage	21 Tage	28 Tage	
23	558	1	2	4	anfällig	6	9	9	anfällig
24	560	2	6	8	anfällig	9	9	9	anfällig
25	562	2	3	4	anfällig	2	4	4	anfällig
26	566	1	2	1	tolerant	1	1	1	tolerant
27	569	1	1	2	tolerant	4	4	5	anfällig
28	570	1	1	1	tolerant	1	2	2	tolerant
29	571	1	1	1	tolerant	1	2	2	tolerant
30	572	1	2	2	tolerant	3	6	7	anfällig
31	573	1	2	2	tolerant	1	2	2	tolerant
32	574	1	1	1	tolerant	1	1	2	tolerant
33	576	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
34	584	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
35	585	1	1	1	resistent	1	2	2	resistent
36	586	1	1	1	tolerant	3	5	6	anfällig
37	591	1	1	1	tolerant	2	1	1	tolerant
38	592	1	2	2	tolerant	1	2	2	tolerant
39	593	1	2	2	tolerant	2	4	4	anfällig
40	594	2	2	2	resistent	2	2	1	resistent
41	595	2	3	3	anfällig	2	2	4	anfällig
42	596	1	3	4	anfällig	4	6	8	anfällig
43	597	1	2	3	tolerant	2	2	2	tolerant
44	598	1	1	1	tolerant	3	4	5	anfällig
45	599	1	2	3	tolerant	1	1	1	tolerant
46	601	1	2	2	tolerant	2	2	2	tolerant
47	602	2	2	3	tolerant	7	7	7	anfällig
48	603	1	1	1	tolerant	2	3	3	tolerant

Nr	Genotyp	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Xhp</i>			Eigenschaften	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Rs</i>			Eigenschaften
		14 Tage	21 Tage	28 Tage		14 Tage	21 Tage	28 Tage	
49	604	1	1	1	tolerant	1	1	1	resistent
50	609	1	1	1	resistent	1	1	1	resistent
51	610	1	1	1	tolerant	4	6	7	anfällig
52	611	2	2	3	anfällig	7	7	9	anfällig
53	612	3	4	4	anfällig	7	8	9	anfällig
54	613	2	3	5	anfällig	2	2	3	tolerant
55	614	1	2	3	tolerant	2	2	4	anfällig
56	615	1	1	1	tolerant	2	3	6	anfällig
57	616	3	4	5	anfällig	7	9	9	anfällig
58	617	1	2	3	tolerant	2	2	3	tolerant
59	620	3	4	5	anfällig	3	4	5	anfällig
60	621	1	3	3	anfällig	3	4	6	anfällig
61	622	1	1	1	resistent	1	2	3	anfällig
62	623	1	2	2	tolerant	5	8	8	anfällig
63	625	1	1	1	tolerant	1	2	2	tolerant
64	626	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
65	627	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
66	628	2	3	3	tolerant	1	2	1	tolerant
67	629	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
68	634	2	5	6	anfällig	2	4	5	anfällig
69	637	5	7	9	anfällig	2	2	2	tolerant
70	639	4	6	7	anfällig	1	2	1	tolerant
71	642	5	6	9	anfällig	2	3	3	tolerant
72	644	1	4	6	anfällig	1	1	1	tolerant
73	654	1	2	2	tolerant	2	3	3	tolerant
74	655	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant



Nr	Genotyp	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Xhp</i>			Eigenschaften	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Rs</i>			Eigenschaften
		14 Tage	21 Tage	28 Tage		14 Tage	21 Tage	28 Tage	
76	657	2	3	3	tolerant	4	6	7	anfällig
77	658	2	3	3	tolerant	3	4	3	tolerant
75	656	3	5	5	anfällig	6	7	8	anfällig
78	659	2	5	6	anfällig	4	5	7	anfällig
79	660	4	6	7	anfällig	4	5	5	anfällig
80	661	3	3	3	tolerant	3	5	5	anfällig
81	662	1	1	1	tolerant	1	1	1	tolerant
82	663	2	4	6	anfällig	3	4	4	anfällig
83	664	3	9	9	anfällig	5	9	9	anfällig
84	665	2	3	3	tolerant	2	3	5	anfällig
85	666	2	3	3	tolerant	2	3	4	anfällig
86	667	2	3	3	tolerant	2	3	6	anfällig
87	668	2	3	3	tolerant	3	4	5	anfällig
88	669	4	7	9	anfällig	9	9	9	anfällig
89	670	2	3	5	anfällig	5	7	9	anfällig
90	671	3	4	6	anfällig	5	7	8	anfällig
91	672	3	5	5	anfällig	3	3	6	anfällig
92	673	2	3	5	anfällig	3	9	9	anfällig
93	675	2	2	3	tolerant	3	5	7	anfällig
94	676	2	3	3	tolerant	4	5	7	anfällig
95	677	3	3	5	anfällig	4	7	7	anfällig
96	678	3	3	3	tolerant	5	7	9	anfällig
97	679	2	2	3	tolerant	5	9	9	anfällig
98	681	1	1	1	resistent	2	3	5	anfällig
99	682	1	2	2	tolerant	2	2	2	tolerant
100	683	2	3	3	tolerant	3	3	7	anfällig

Nr	Genotyp	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Xhp</i>			Eigenschaften	Boniturnoten (Durchschnitt) nach Inokulation mit <i>Rs</i>			Eigenschaften
		14 Tage	21 Tage	28 Tage		14 Tage	21 Tage	28 Tage	
101	684	2	2	2	tolerant	2	2	2	tolerant
102	685	1	2	2	tolerant	1	1	1	tolerant
103	686	2	3	5	anfällig	3	5	7	anfällig
104	688	2	3	5	anfällig	2	2	2	tolerant
105	689	1	2	5	anfällig	2	3	3	tolerant
106	690	1	3	6	anfällig	2	2	2	tolerant
107	691	1	2	4	anfällig	2	2	2	tolerant
108	693	1	2	2	tolerant	3	3	3	tolerant
109	695	1	1	2	tolerant	2	3	2	tolerant
110	697	2	2	5	anfällig	1	3	3	tolerant
111	698	1	2	5	anfällig	1	1	1	tolerant
112	699	5	7	9	anfällig	3	3	3	tolerant
113	700	1	3	2	tolerant	1	2	2	tolerant
114	701	1	1	2	tolerant	2	2	2	tolerant

Variabilitäten in den Boniturnoten konnten wie folgt festgestellt werden:

Bei resistenten Pflanzen wurden die Boniturnoten 1 und 2 vergeben.

Tolerante Pflanzen wurden mit Boniturnoten von 1 bis 3 bewertet (Reisolierung von Bakterien)

und bei den anfälligen Genotypen wurden Boniturnoten von 5 bis 9 vergeben.

### 3.1.4 Statistische Auswertung der Resistenztestungen

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Tukey-Test der Studentisierten Spannweite (HSD) für die einzelnen Boniturtermine und für die Boniturmittel. Die Berechnung erfolgte für drei Boniturtermine (14 Tage, 21 Tage und 28 dpi). Ein Ausschnitt zu der statistischen Auswertung ist in von Tab. 3.2.1 bis Tab 3.2.3 dargestellt. Die vollständigen Daten befinden sich im Anhang unter Tab. 8.10.1 bis Tab. 8.10.6. In Bezug auf die Anfälligkeit gegenüber *Xanthomonas* und *Ralstonia* gab es signifikante Unterschiede zwischen den anfälligen Genotypen (501, 503) und den resistenten Genotypen (585, 609).

#### *Xanthomonas*

Genotyp	MW	
501	26,25	D E F
503	18,75	F G H I J K
594	7,80	L M
585	0,00	
609	0,00	

#### *Ralstonia*

501	58,33	B C D E F G
503	25,00	K L M N
594	12,50	
585	5,26	
609	0,00	

#### *Xanthomonas*

Genotyp	MW	Tukey-Test
501	55,00	C D E F
503	37,50	F G H I J
594	7,81	M N
585	0,00	
609	0,00	

#### *Ralstonia*

Genotyp	MW	Tukey-Test
501	70,83	A B C D E F G
503	33,75	J K L
594	7,14	
585	7,89	
609	0,00	

## Ergebnisse

<i>Xanthomonas</i>		
Genotyp	MW	Tukey-Test
501	85,00	A B C
503	85,00	A B C
594	7,81	Q R S T
585	0,00	T
609	0,00	T

<i>Ralstonia</i>		
Genotyp	MW	Tukey-Test
501	87,50	A B C D E F
503	46,25	I J K L
594	5,35	A B C
585	10,53	A B C
609	0,00	C

### 3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Resistenztestungen

Insgesamt wurden im Rahmen der Resistenztestung 114 Pelargonien-Genotypen sowohl gegen *Ralstonia solanacearum* als auch gegen *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* getestet. Drei Genotypen waren resistent gegen beide Erreger. Weitere zwei Genotypen waren resistent gegen *X. hortorum* pv. *pelargonii*, allerdings anfällig für *R. solanacearum*. Ein Genotyp war resistent gegen *Ralstonia* und tolerant gegenüber *Xanthomonas*. Weitere 37 Genotypen waren tolerant gegenüber beiden Erregern; 24 Genotypen tolerant gegenüber *Xanthomonas*, aber anfällig für *Ralstonia*; 13 Genotypen waren tolerant gegenüber *R. solanacearum* und anfällig für *X. hortorum* pv. *pelargonii*; 34 Genotypen waren anfällig für beide Erreger (Abb. 3.6).

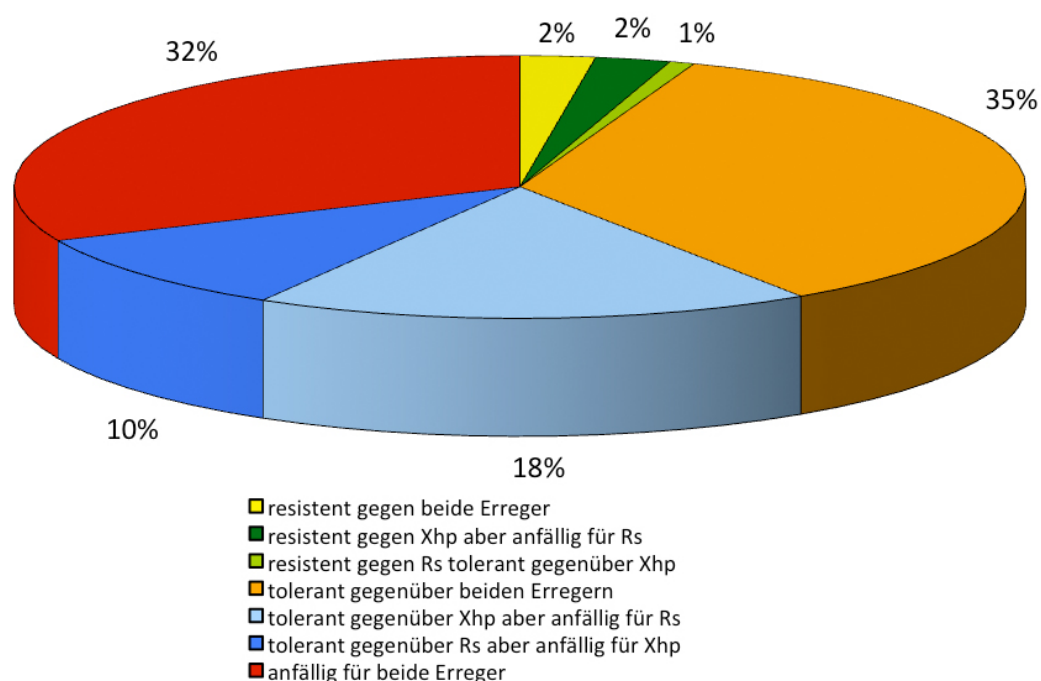


Abb. 3.6: Ergebnisse der Resistenztestungen des Pelargonium-Test-Sortimentes (dargestellt ist der Anteil resistenter, toleranter bzw. anfälliger Pelargonium-Genotypen gegenüber *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* in %).

Resistenzen gegen einen oder beide Erreger traten ausschließlich in Arten und Formen auf, die sich nicht mit *Pelargonium x hortorum* kreuzen lassen.

## Ergebnisse

Die Resistenzträger sind vor allem den Duftpelargonien zuzuordnen. Toleranzen gegenüber beiden Erregern waren in Wildarten und auch in Edelpelargonien (*Pelargonium grandiflorum*-Hybriden) weit verbreitet, aber nicht immer im gleichen Genotyp.

### 3.2 Protoplastenisolierung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus drei verschiedenen Geweben, der Pelargonien-Genotypen 503 (*Pelargonium x hortorum*, anfällig für *Ralstonia* und *Xanthomonas*) und 609 (Wildform, resistent gegenüber *Ralstonia* und *Xanthomonas*) erfolgreich Protoplasten isoliert werden (Abb. 3.7).

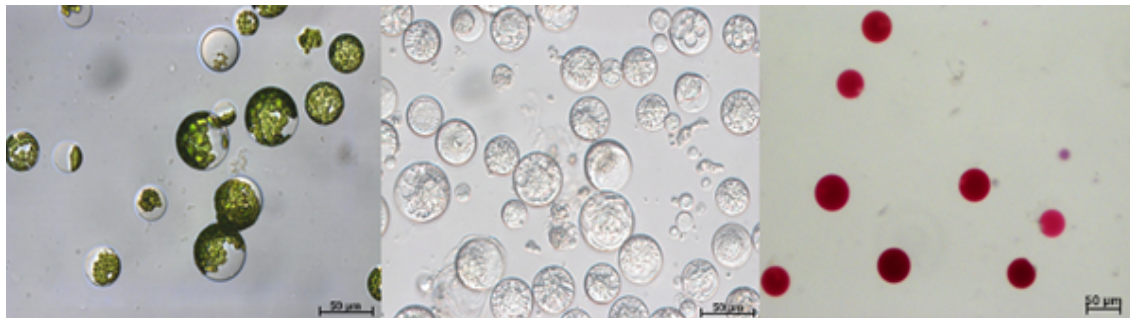


Abb. 3.7: Isolierte Mesophyllprotoplasten (links) und Suspensionsprotoplasten (Mitte) des Genotyps 609 (resistent gegenüber *Rs* und *Xhp*), Isolierte Petalenprotoplasten (rechts) des anfälligen Genotyps (503)

Die Stabilität und Regenerationsfähigkeit der erhaltenen Protoplasten war stark vom verwendeten Gewebe abhängig. Für die Beurteilung der Stabilität der Protoplasten wurden die intakten, runden Protoplasten den Protoplastenbruchstücken und deformierten Zellen gegenüber gestellt und ausgezählt. Protoplasten, die aus dem Mesophyllgewebe (isoliert wurden, konnten erfolgreich zu vollständigen Pflanzen regeneriert werden. Aus Suspensionskulturen konnten sehr stabile Protoplasten isoliert werden, die sich jedoch nur bis zum Kallus entwickelten (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Regenerationsfähigkeit der Protoplasten der Pelargonien-Genotypen 503 und 609. Die Protoplasten wurden aus unterschiedlichen Geweben (Mesophyll, Suspensionskultur und Petalen) isoliert.

Gewebe	Stabilität nach der		Ergebnis
	Isolierung	Regenerationsfähigkeit	
Mesophyll	gut	sehr gut	Pflanze
Suspension	sehr gut	gut	Kallus
Petalen	gut	schlecht	Zellteilung

Die Protoplasten der unterschiedlichen Gewebe, ermöglichten auf Grund ihrer unterschiedlichen Beschaffenheiten (Farbe, Größe) eine Beobachtung der Fusion im Lichtmikroskop. Zusätzlich zu den Mesophyll- und Suspensionsprotoplasten wurden Protoplasten aus Petalen isoliert. Diese dienten ebenfalls der Beobachtung und möglichen Optimierung des Fusionsprozesses. Die isolierten Petalenprotoplasten waren nicht in der Lage zu regenerieren. Es konnten nur vereinzelt Zellteilungen festgestellt werden.

### 3.2.1 Isolierung von Mesophyllprotoplasten

Die Isolierung der Mesophyllprotoplasten wurde wie unter 2.3.1 beschrieben durchgeführt.

Es wurden Protoplastenausbeuten von  $9 \times 10^5$  Protoplasten/g Frischgewicht (Genotyp 503) und  $5 \times 10^5$  Protoplasten/g Frischgewicht (Genotyp 609) ermittelt (Abb. 3.8).

Bei den Mesophyllprotoplasten beider Genotypen wurde eine Vitalitätsrate von 75% erreicht. Die Teilungsaktivität 10 Tage nach der Isolierung betrug beim Genotyp 609 im Durchschnitt 25% und beim Genotyp 503 durchschnittlich 32%.

Sowohl die Protoplastenausbeute als auch die Vitalität der Protoplasten wird durch den Prozess des enzymatischen Zellwandabbaus essentiell beeinflusst. Mit dem Ziel einer weiteren Optimierung wurden Faktoren wie Enzym und Einfluss des Schüttelns während des enzymatischen Abbaus untersucht.

Blattmaterial der Genotypen 503 und 609 wurde wie unter 2.3.1 beschrieben inkubiert. (Methode1).

## Ergebnisse

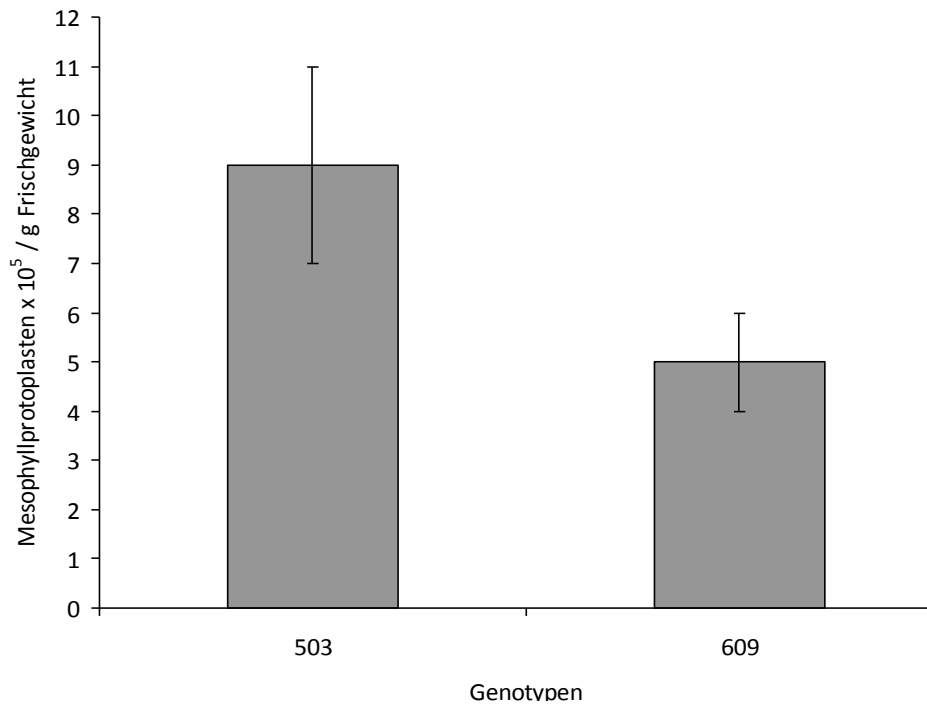


Abb. 3.8: Protoplastenausbeute an Mesophyllprotoplasten der Genotypen 503 und 609 (Dargestellt sind die Mittelwerte aus N=9 Wiederholungen und die Standardabweichungen)

Die Variation der Methode 2 bestand lediglich darin, dass während des Zellwandabbaus nicht geschüttelt wurde, sondern nur zum Ende der Inkubationszeit 15 min mit 30 UpM.

Mit der Methode 2 war im Durchschnitt eine Steigerung der Protoplastenausbeute beim Genotyp 503 festzustellen. Beim Genotyp 609 konnte eine höhere Protoplastenausbeute bei der Methode 1 nachgewiesen werden. Die ermittelten durchschnittlichen Vitalitätsraten waren bei beiden Genotypen (503 und 609) bei der Methode 2 um fünf Prozent höher (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Gegenüberstellung der zwei Protoplasten-Isolierungsmethoden. Dargestellt sind die Protoplastenausbeute und die Vitalitätsrate der Pelargonien-Genotypen 503 und 609 (Durchschnittswerte aus 6 Wiederholungen).

Genotyp	Methode 1		Methode 2	
	El + Inkubation 15 h bei 30 Upm [Pp/g FG]	Vitalität [%]	El + Inkubation 15 h + 10 min Schütteln [Pp/g FG]	Vitalität [%]
503	$1,5 \times 10^5$	45	$1,9 \times 10^5$	50
609	$1,4 \times 10^5$	40	$1,3 \times 10^4$	45



Beim Enzymversuch wurde zusätzlich zum Standard-Enzym (2.3.1) die Enzymlösung E-N/D (Tab. 8.7.5) verwendet. Bei dem Enzymversuche wurden keine weiteren Parameter der Isolierungsmethode verändert, um zu überprüfen welchen Einfluss die verschiedenen Enzymlösungen auf die Protoplastenausbeute und die Vitalität haben. Mit dem Enzym E-N/D konnte beim Genotyp 503 eine höhere Protoplastenausbeute erreicht werden, während beim Genotyp 609 durch den Einsatz des Enzyms EI mehr Protoplasten/g Frischgewicht isoliert wurden (Tab. 3.6). In Bezug auf die Vitalität konnten keine Unterschiede zwischen den Enzymen nachgewiesen werden (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Enzymversuch zur Protoplastenisolierung aus Blattmaterial  
(Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus 8 Wiederholungen  $\pm$  Standardabweichungen )

Genotyp	Enzym EI [Pp/g FG]	Standard-Enzym		Enzym E-N/D	
		Standard- abweichung	Vitalität [%]	Standard- abweichung	Vitalität [%]
503	$6,38 \times 10^4$	$\pm 2,8$	28	$2,7 \times 10^5$	$\pm 5,1$ 30
609	$4,7 \times 10^6$	$\pm 1,3$	75	$3,9 \times 10^6$	$\pm 1,3$ 75
585	$1,7 \times 10^6$	$\pm 0,2$	68	$1,0 \times 10^6$	$\pm 2,7$ 75
662	$1,0 \times 10^6$	$\pm 3,5$	80	$8,4 \times 10^5$	$\pm 2,0$ 78

Um zu testen, ob die Versuchsparameter auf die weiteren resistenten Genotypen (585, 662) übertragbar sind, wurden diese in den Enzymversuch mit einbezogen. Die Ausbeute und Vitalität der Protoplasten weichen nicht von den Werten der Genotypen 609 und 503 ab. Es war jedoch zu erkennen, dass die Protoplasten des Genotyps 662 vitaler waren als die Protoplasten der anderen Genotypen.

### 3.2.2 Isolierung von Suspensionsprotoplasten

Die Protoplastenausbeute der Suspensionskulturen lag zwischen  $13,8 \times 10^5$  Protoplasten/g Frischgewicht (Genotyp 503) und  $23,8 \times 10^5$  Protoplasten/g Frischgewicht (Genotyp 609) (Abb.3.9).

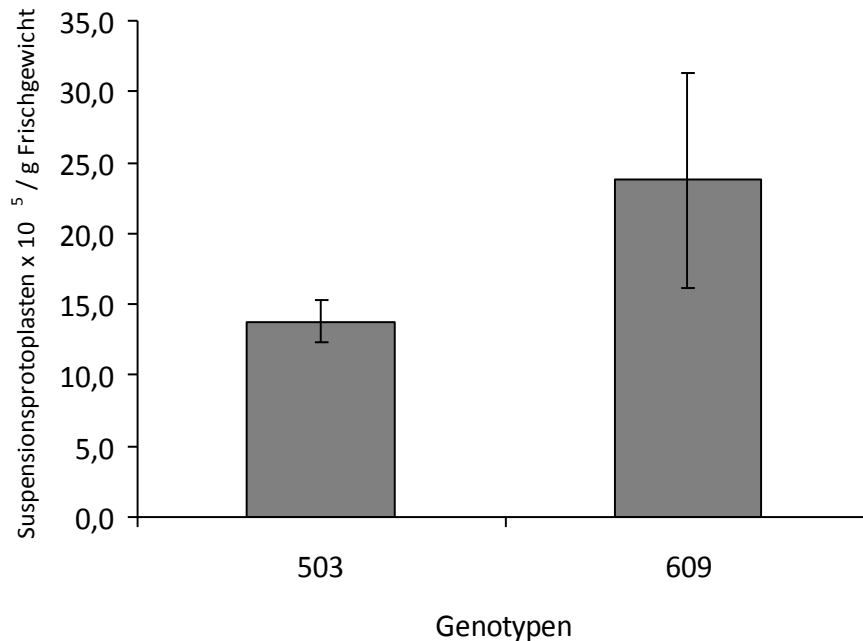


Abb. 3.9: Protoplastenausbeute an Suspensionsprotoplasten der Genotypen 503 und 609 (Dargestellt sind die Mittelwerte aus N=10 Wiederholungen und die Standardabweichungen)

Nach 7 Tagen Kultivierung wurden die Teilungsraten von den Suspensionsprotoplasten der einzelnen Genotypen ermittelt. Die Teilungsrate des Genotyps 609 lag bei 19%, beim Genotyp 503 betrug die Teilungsrate 10%.

Für die Vitalitätsbestimmung wurden die Suspensionsprotoplasten, wie unter 2.4.3 beschrieben, mit FDA gefärbt und im Mikroskop beurteilt.

Bei beiden Genotypen (503, 609) konnte eine Vitalitätsrate der Suspensionsprotoplasten von 90% bestimmt werden.

Zur Anfärbung der Suspensionsprotoplasten eigneten sich die Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin G und CellTracker Blue (2.3.3). Die gefärbten Protoplasten konnten bis zum Kallus weiter kultiviert werden. Es gab weder zeitliche noch morphologische Unterschiede im Regenerationsverlauf zu den nicht gefärbten Kontrollen (Abb.3.10).

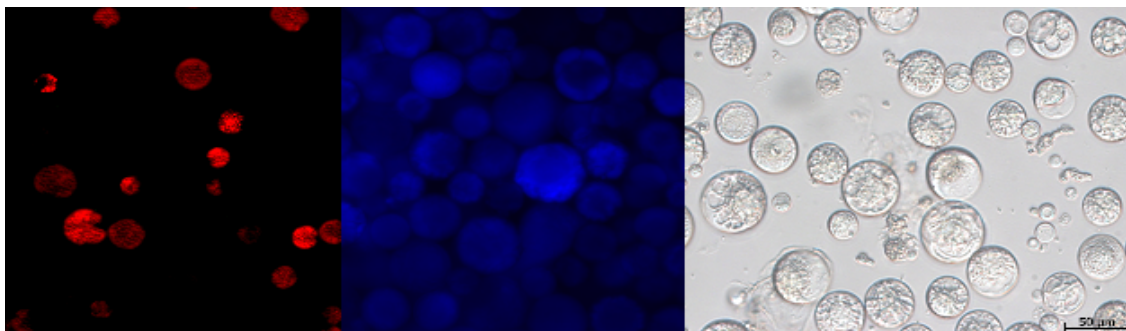


Abb.3.10: Vergleich der gefärbten Suspensionsprotoplasten (rechts = Rhodamin G, Mitte = Cell Tracker Blue) mit den ungefärbten Suspensionsprotoplasten (links). Die gefärbten Protoplasten wurden im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioskop) ausgewertet, die ungefärbten Protoplasten wurden mit Hilfe des Lichtmikroskopes dargestellt.

### 3.2.3 Isolierung von Petalenprotoplasten

Aus den Petalen des Genotyps 503 konnten ebenfalls erfolgreich Protoplasten isoliert werden. Besonders eigneten sich junge Blüten. Es wurden durchschnittlich  $5 \times 10^5$  Protoplasten/g Frischgewicht isoliert.

### 3.3 Protoplastenfusionen

Die Protoplastenfusionen wurden, wie unter 2.4.1 beschrieben, mit Protoplasten aus unterschiedlichen Geweben der Pelargonie durchgeführt. Während des Fusionsprozesses mit Hilfe von PEG kam es zur Zusammenlagerung und auch Verschmelzung der Protoplasten (Abb.3.11).

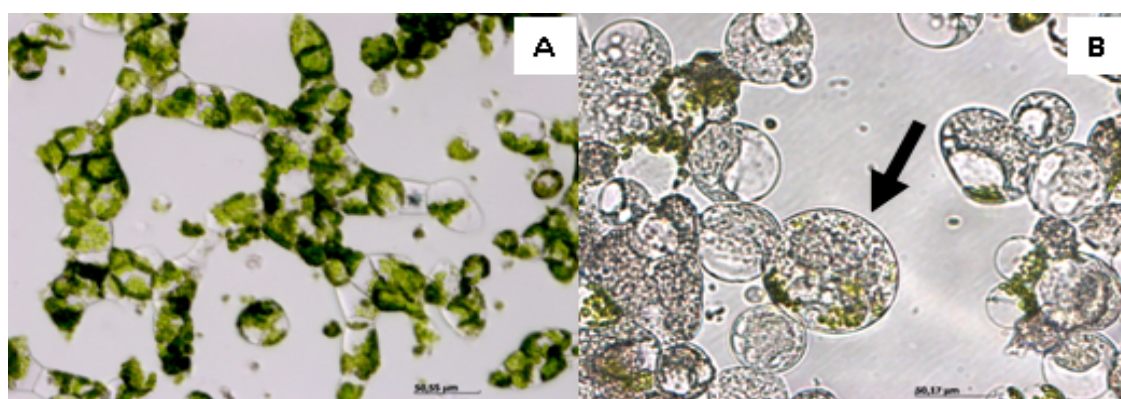


Abb. 3.11: Formveränderung und Verschmelzung der Protoplasten, während einer Fusion (A: 503 Mesophyll (+) 609 Mesophyll) und nach einer Fusion (B: 503 Suspension (+) 609 Mesophyll, Pfeil zeigt Fusionszelle)

## Ergebnisse

Die Methode der chemischen Protoplastenfusion wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert. Dafür sind verschiedene Lösungen und Fusionsparameter getestet worden. Zunächst wurden Fusionen mit sehr kleinen Tropfen (40 µl) durchgeführt. Hierfür wurden die Tropfen mit dem Protoplastengemisch mit 60 µl PEG-Lösung (40% PEG 1500, 0,3 M Glucose, 50 M CaCl<sub>2</sub>) überschichtet. Nach einer Einwirkzeit von 5 min erfolgte die Zugabe der im Verhältnis 1:1 gemischten FM1/FM2-Lösung, die die Fusionstropfen vorsichtig umschließen sollte. Nach einer Inkubationszeit von 25 min bei 30 °C wurde die Fusionslösung durch PPM 1 Medium ersetzt. Bei dieser Methode erhielt man sehr viele zerstörte Protoplasten nach dem Fusionsprozess, so dass keine Regeneration erfolgen konnte.

Weitere chemische Fusionen wurden mit der Methode von NASSOUR und DORION (2003) durchgeführt (2.4.1). Bei dieser Methode wurden die Protoplasten nicht so stark beschädigt, so dass eine Regeneration nach der Fusion möglich war.

Nach erfolgreicher Fusion der Suspensionsprotoplasten des Genotyps 503 mit den Mesophyllprotoplasten des Genotyps 609 konnte eine Differenzierung zwischen Homo- und Heterofusionaten durchgeführt und die Fusionsrate ermittelt werden (2.4.3). Die Fusionsrate lag zwischen 1–3%. Bei Fusionen, bei denen ausschließlich Mesophyllprotoplasten verwendet wurden, konnten keine Fusionsraten ermittelt werden, da auf Grund der optischen Gleichheit mikroskopisch kein Unterschied zwischen Homo- und Heterofusionaten festzustellen war. Auch bei der Elektrofusion konnten keine eindeutigen Heterofusionate identifiziert werden.

### 3.4 Protoplastenregeneration

Insgesamt wurden mit den Protoplasten der *Pelargonium*-Genotypen 503 und 609 13 Fusionen durchgeführt (Tab. 3.7). Davon waren neun chemische Fusionen mit PEG (2.4.1) und vier Elektrofusionen (2.4.2).

Tab. 3.7: Zusammenfassende Darstellung der durchgeführten Protoplastenfusionen und Fusionsmethoden mit den *Pelargonium*-Genotypen 503 und 609, sowie die jeweiligen Ergebnisse.

Fusion	Fusionspartner	Methode	Ergebnis
1	503 Susp (+) 609 Meso	PEG sym	im Kallusstadium abgestorben
2	503 Susp (+) 609 Meso	PEG sym	im Kallusstadium abgestorben
6	503 Meso (+) 609 Meso	PEG sym	als Aggregate abgestorben
11	503 Meso (+) 609 Susp	PEG sym	als Aggregate abgestorben
12	503 Meso (+) 609 Meso	PEG sym	im Kallusstadium abgestorben
13	503 Susp (+) 609 Susp	PEG sym	im Kallusstadium abgestorben
3	503 Susp (+) 609 Mesol	PEG asym	im Kallusstadium abgestorben
4	503 Susp (+) 609 Meso	PEG asym	im Kallusstadium abgestorben
5	503 Susp (+) 609 Meso	PEG asym	im Kallusstadium abgestorben
7	503 Meso (+) 609 Meso	ELFU sym	als Aggregate abgestorben
8	503 Meso (+) 609 Meso	ELFU sym	248 Pflanzen ins Gewächshaus überführt
9	503 Meso (+) 609 Meso	ELFU sym	106 Pflanzen ins Gewächshaus überführt
10	503 Meso (+) 609 Meso	ELFU sym	als Aggregate abgestorben

PEG = Fusion mit Polyethylenglycol

ELFU = Elektrofusion

Meso = Mesophyll;

Susp = Suspension

Sym = symmetrisch;

Asym = asymmetrisch

Bei den chemischen Fusionen mit PEG konnten weder aus den asymmetrischen Fusionen noch auch aus den symmetrischen Fusionen Pflanzen regeneriert werden (Abb.3.12). Bei zwei von vier Elektrofusionen war das jedoch möglich (Tab. 3.7).

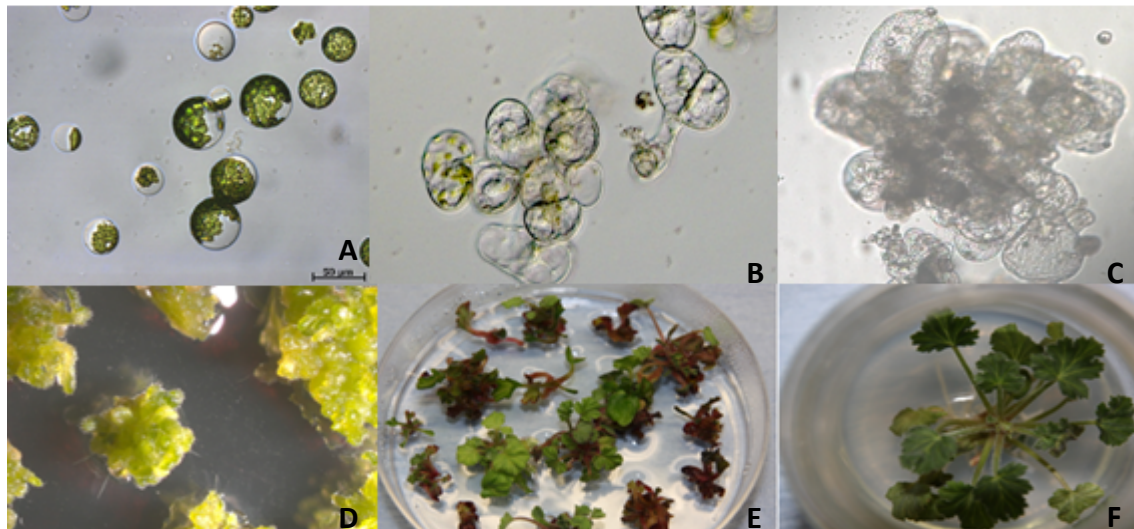


Abb. 3.12: Regenerationsschema vom Protoplasten (A) bis zur vollständig regenerierten Pflanze (F). Dargestellt sind die einzelnen Zellteilungen und Regenerationsschritte über Mikrocallus und Kallus zur Pflanze des Pelargonien-Genotyps 609.

Nach drei bis fünf Tagen waren je nach Genotyp die ersten Zellteilungen sichtbar (Abb.3.12 B). Nach einer Elektrofusion konnten erste Teilungen bereits nach 2 Tagen beobachtet werden. Bei der PEG Fusion verzögerte sich der Regenerationsprozess, aber nach spätestens 7 Tagen waren Teilungen zu beobachten.

Die Beschaffenheit der Mikrokolonien war stark abhängig vom Genotyp. Während Protoplasten des Genotyps 609 kompakte, kleine Mikrokolonien bildeten, waren die Mikrokolonien des Genotyps 503 locker angeordnet und größer. Nach einer PEG Fusion zerplatzten und verklumpten deutlich mehr Protoplasten des Genotyps 503. Nach der Elektrofusion waren deutlich mehr intakte Protoplasten vorhanden als nach einer PEG Fusion. Auch die Regeneration nach einer Elektrofusion erfolgte schneller. Nachdem die aus Protoplasten regenerierten Pflanzen bewurzelt waren, wurden sie, wie unter 2.5.4 dargestellt, ins Gewächshaus überführt.

### 3.4.1 Einfluss verschiedener Zusatzstoffe auf die Protoplastenregeneration

Wie unter 2.5.3 beschrieben, wurden während der Regeneration verschiedene Substanzen eingesetzt, um die Regeneration zu fördern bzw. selektiv zu beeinflussen.

Die Kallusse konnten erfolgreich auf Medien, die mit Phytigel verfestigt, waren regenerieren, so dass für die Regenerationsmedien ausschließlich Phytigel verwendet wurde. Anfangs wurde Agar zur Verfestigung verwendet, da aber keine Regeneration stattfand, wurde Phytigel eingesetzt.

Bei einer Phytohormonkombination von IAA (5,71  $\mu\text{M}$ ) und Kinetin (4,6  $\mu\text{M}$ ) im PMSV Medium wurden insgesamt 354 Pflanzen aus Kallus regeneriert. Im Gegensatz dazu konnten auf PMSV Medium ohne Hormone keine Pflanzen regeneriert werden (Tab.3.8). Nach der Regeneration der Kallusse auf dem PRM 10 Medium, wurden diese auf die unterschiedlichen Varianten des PMSV Mediums übertragen und weiter kultiviert.

Nitroprussid konnte keine Steigerung bzw. Verbesserung der Regeneration gegenüber dem Standard PMSV Medium bewirken. Weder bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  noch bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  war eine Regeneration erfolgreich, alle 400 Kallusse waren nach ca. 4 Wochen abgestorben (Tab. 3.8).

Chitosan wirkte sich ebenfalls nicht positiv auf die Regeneration der Pelargonien-Kallusse aus. Nach 4 Wochen Kultivierung auf PMSV Medium mit Chitosan waren alle 600 Kallusse (2 Wiederholungen) abgestorben. Es konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Chitosanherkünften festgestellt werden (Tab. 3.8).

Als Kontrolle wurden pro Mediumkombination je 50 Kallusse (je 25 pro Wiederholung) auf PMSV Medium mit IAA und Kinetin kultiviert. Von den 400 Kontroll-Kallussen konnten 354 Pflanzen regeneriert werden.

Tab.3.8: Übersicht der Regeneration von Pflanzen aus Fusionen auf verschiedenen Medien.

Eingesetzt wurde das Grundmedium PMSV mit den jeweils angegebenen Zusatzstoffen um den Einfluss auf die Regeneration zu testen.

Medium	Kallusse	Regeneration (%)
PMSV + 5,71 $\mu\text{M}$ IAA + 4,6 $\mu\text{M}$ Kinetin	400	88,5
PMSV ohne Hormone	200	0
PMSV + 30 $\mu\text{M}$ Nitroprussid	200	0
PMSV + 60 $\mu\text{M}$ Nitroprussid	200	0
PMSV + Chitosan (Kapsel)	200	0
PMSV + Chitosan (niederviskos)	200	0
PMSV + Chitosan (mittelviskos)	200	0

## Ergebnisse

Als weitere Zusatzstoffe wurden die durch Lyophilisation gewonnenen bakteriellen Toxine (2.1.4) dem Regenerationsmedium zugegeben um eine frühzeitige Selektion auf resistente Regenerate durchführen zu können. Alle Kallusse (150) auf den mit den Bakterientoxinen versetzten Medien sind jedoch abgestorben (Ergebnisse nicht dargestellt).

### **3.5 Charakterisierung der Regenerate aus Protoplastenfusionen**

Die Charakterisierung der Regeneratpflanzen erfolgte zum einen durch eine phänotypische Bewertung und zum anderen durch zellbiologische und molekulare Untersuchungen.

#### **3.5.1 Phänotypische Charakterisierung der Regenerate**

Die phänotypische Charakterisierung wurde nach der Überführungsphase an gut adaptierten Pflanzen im Gewächshaus vorgenommen. Die Überführungsrate lag im Mittel bei 90 %. Insgesamt wurden 320 Pflanzen in das Gewächshaus überführt.

Für eine phänotypische Charakterisierung wurden der Habitus und die Blattformen der Regeneratpflanzen mit den Ausgangspflanzen verglichen. 277 Regeneratpflanzen konnten phänotypisch der Wildform 609 zugeordnet werden.

Die restlichen 43 Pflanzen zeigten phänotypische Veränderungen. Keine Regeneratpflanze zeigte phänotypisch eindeutige Merkmale von *Pelargonium x hortorum* (503) (Abb.3.13).



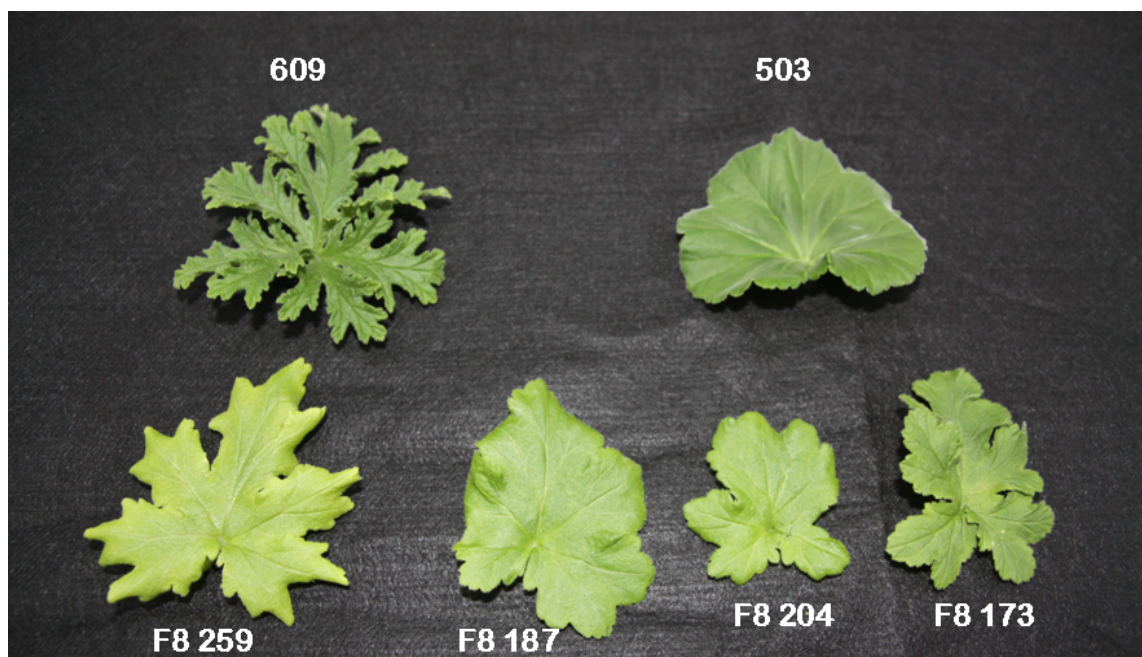


Abb. 3.13: Phänotypischer Vergleich der Pelargonien-Ausgangspflanzen (609 und 503) und den nach Protoplastenfusion regenerierten Pflanzen (F8 259, F8 187, F8 204, F8 173)

Insgesamt konnten 43 Pflanzen mit phänotypischen Auffälligkeiten in Blattform und -struktur identifiziert werden. Unter anderem wiesen die Pflanzen deutliche Merkmale einer Polyploidisierung auf, wie zum Beispiel dickere und größere Blätter sowie eine gedrungene Wuchsform.

### 3.5.2 Messung des DNA – Gehaltes mittels Flowcytometrie (FCM)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte der DNA-Gehalt der Pflanzen bestimmt werden. Die Messungen wurden in zwei Wiederholungen durchgeführt.

Zwei Probenaufarbeitungsmethoden konnten getestet werden. Zum einen wurden die Proben in der Mühle zermahlen (2.2.3) und zum anderen wurden die Proben mit einer Rasierklinge zerhackt. Im Vergleich waren die Peaks der Proben, die mit der Mühle aufgearbeitet wurden, von besserer Qualität (Daten nicht dargestellt).

Durch die Vergleichsmessungen der Ausgangspflanzen und der aus Protoplastenfusion regenerierten Pflanzen, konnten Abweichungen in den DNA-Gehalten festgestellt werden. Gemessen wurden insbesondere phänotypisch auffällige Regeneratpflanzen.

## Ergebnisse

Insgesamt wurden 43 Regeneratpflanzen untersucht von denen 22 eine Veränderung im DNA-Gehalt im Vergleich zu den Ausgangspflanzen aufwiesen (Tab 3.9).

Tab. 3.9: Ergebnisse der flowzytometrischen Messungen der phänotypisch auffälligen Pelargonien-Regeneratpflanzen. Es wurden sowohl höhere als auch niedrigere DNA-Gehalte als bei den Ausgangspflanzen der Genotypen 503 und 609 festgestellt.

Anzahl bonitierter Pflanzen	Pflanzen mit phänotypischen Veränderungen	Durchflusszytometrisch untersuchte Pflanzen	Pflanzen mit niedrigerem DNA-Gehalt	Pflanzen mit höherem DNA-Gehalt
320	43	43	2	20

Es konnten 20 Pflanzen mit einem höheren DNA-Gehalten und 2 mit niedrigeren DNA-Gehalten detektiert werden (Abb. 3.14). Bei 21 Pflanzen wurde der DNA-Gehalt des Genotyps 609 nachgewiesen.

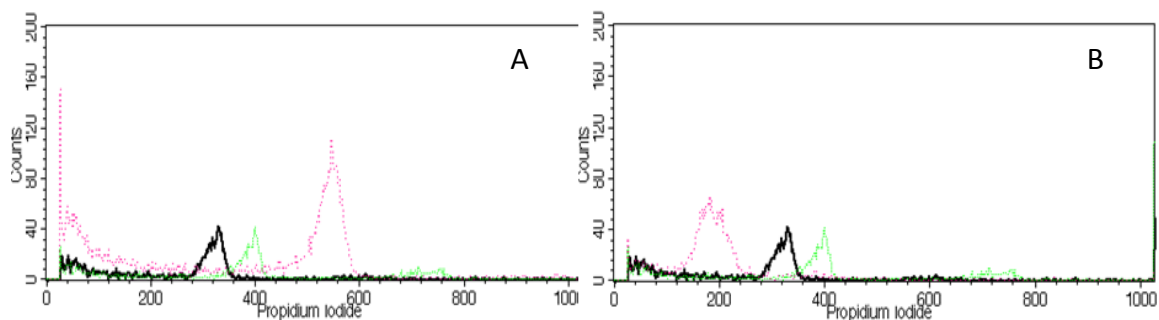


Abb. 3.14: Vergleich der Histogramme zur Bestimmung des DNA-Gehalts der Regenerate im Vergleich zu den Ausgangspflanzen 609 (schwarz) und 503 (grün) mit den Regeneraten (rot) A mit höherem DNA-Gehalt und B mit einem niedrigeren DNA-Gehalt.

Zur genaueren Charakterisierung wurde der DNA-Gehalt einzelner Regeneratpflanzen mit Hilfe des Standards *Raphanus sativus* nach der flowcytometrischen Messung berechnet (Tab. 3.10).

Tab. 3.10: DNA-Gehalt ausgewählter Genotypen

Genotyp	DNA-Gehalt [pg] 2C	CV-Wert
<i>Raphanus sativus</i>	1,38 (SCHRADER PERS. MITTEILUNG)	
<i>Pelargonium radula</i>	16,2 (BENNETT UND LEITCH 1995)	
<i>Pelargonium x hortorum</i> (503)	5,53	2,99
Pelargonie Wildtyp (609)	4,46	2,51
Regenerat 1	3,55	2,34
Regenerat 2	3,70	2,10
Regenerat 3	6,76	2,71
Regenerat 4	7,74	1,82
Regenerat 5	8,44	2,62
Regenerat 7	9,20	1,84

Der DNA-Gehalte der Ausgangspflanzen betragen 5,53 pg (Genotyp 503) und 4,46 pg (Genotyp 609). Bei den Regeneratpflanzen variierte der DNA-Gehalt von 3,55 pg-9,20 pg.

Um festzustellen, welchen Einfluss die Kultivierungsbedingungen auf die flowzytometrischen Messungen haben, wurden Pflanzenproben aus dem Gewächshaus mit Proben von In-vitro-Pflanzen verglichen (Abb. 3.15).

Mit Hilfe der Software des Flowzytometers werden der Mittelwert sowie der Variationskoeffizient (CV-Wert) ermittelt und die Daten werden in Form eines Histogramms dargestellt. Je kleiner der CV-Wert ist, desto genauer ist die Messung (DOLEZEL und BARTOS 2005)

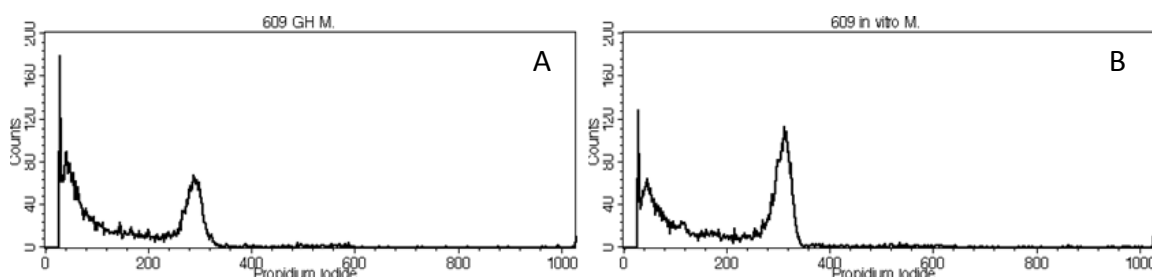


Abb. 3.15: Vergleichsmessung von Pelargonien Gewächshaus-Pflanzen (A) und Pelargonien In-vitro-Pflanzen(B) des Genotyps 609 im Flowzytometer

Der Aufbau und die Struktur der Peaks waren bei den In-vitro-Pflanzen von besserer Qualität. Es wurden jedoch keine quantitativen Änderungen nachgewiesen.

### **3.5.2 Molekulargenetische Untersuchung**

Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden mit Hilfe von Mikrosatelliten (vgl. 2.6.1.2) durchgeführt. Keine der untersuchten Regeneratpflanzen konnte mittels Mikrosatelliten als Hybridpflanze identifiziert werden. In Tab. 3.11 und Tab 3.12 ist eine Auswahl getesteter Pflanzen dargestellt.

Tab. 3.11: Ergebnisse der Mikrosatellitentestung der Ausgangs- und Fusionspflanzen der Pelargonien-Genotypen 503 und 609 der Fusionen F8 und F9.

Mikrosatellit	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
PhSSR 13 (IRD 700)	503	140 bp	145 bp	155 bp	160 bp			
	609	-	-	-	-			
	F8 58	-	-	-	-			
	F8 174	-	-	-	-			
	F8 178	-	-	-	-			
	F8 185	-	-	-	-			
	F8 188	-	-	-	-			
	F8 189	-	-	-	-			
	F8 191	-	-	-	-			
	F8 198	-	-	-	-			
	F8 200	-	-	-	-			
	F8 204	-	-	-	-			
	F8 213	-	-	-	-			
	F8 216	-	-	-	-			
	F8 217	-	-	-	-			
	PhSSR 17 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
503						182 bp	185 bp	
	609	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp			
	F8 58	140 bp	-	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 174	140 bp	-	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 178	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 185	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 188	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 189	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 191	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 198	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 200	140 bp	-	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 204	140 bp	-	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 213	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 216	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F8 217	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
PhSSR 21 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	140 bp	150 bp	153 bp				
	609	-	-	-				
	F8 58	-	-	-				
	F8 174	-	-	-				
	F8 178	-	-	-				
	F8 185	-	-	-				
	F8 188	-	-	-				
	F8 189	-	-	-				
	F8 191	-	-	-				
	F8 198	-	-	-				
	F8 200	-	-	-				
	F8 204	-	-	-				
	F8 213	-	-	-				
	F8 216	-	-	-				

## Ergebnisse

PhSSR 21 (IRD 700)	F8 217	-	-	-				
PhSSR 26 (IRD 800)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	-	-	-				
	609	-	-	-				
	F8 58	-	-	-				
	F8 174	-	-	-				
	F8 178	-	-	-				
	F8 185	-	-	-				
	F8 188	-	-	-				
	F8 189	-	-	-				
	F8 191	-	-	-				
	F8 198	-	-	-				
	F8 200	-	-	-				
	F8 204	-	-	-				
	F8 213	-	-	-				
	F8 216	-	-	-				
	F8 217	-	-	-				
PhSSR 45 (IRD 800)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	75 bp	77 bp	80 bp	84 bp	150 bp	152 bp	157 bp
	609	-	-	-	-	-	-	-
	F8 58	-	-	-	-	-	-	-
	F8 174	-	-	-	-	-	-	-
	F8 178	-	-	-	-	-	-	-
	F8 185	-	-	-	-	-	-	-
	F8 188	-	-	-	-	-	-	-
	F8 189	-	-	-	-	-	-	-
	F8 191	-	-	-	-	-	-	-
	F8 198	-	-	-	-	-	-	-
	F8 200	-	-	-	-	-	-	-
	F8 204	-	-	-	-	-	-	-
	F8 213	-	-	-	-	-	-	-
	F8 216	-	-	-	-	-	-	-
	F8 217	-	-	-	-	-	-	-
PhSSR 49 (IRD 800)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande		
	503	130 bp	135 bp	220 bp				
	609	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 58	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 174	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 178	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 185	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 188	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 189	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 191	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 198	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 200	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 204	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 213	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 216	-	-	-	300 bp	305 bp		
	F8 217	-	-	-	300 bp	305 bp		

PhSSR 13 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	140 bp	145 bp	155 bp	160 bp			
	609	-	-	-	-			
	F8 218	-	-	-	-			
	F8 219	-	-	-	-			
	F8 220	-	-	-	-			
	F8 221	-	-	-	-			
	F8 222	-	-	-	-			
	F8 234	-	-	-	-			
	F8 253	-	-	-	-			
	F8 250	-	-	-	-			
	F8 255	-	-	-	-			
	F8 258	-	-	-	-			
	F8 260	-	-	-	-			
	F8 264	-	-	-	-			
	F8 265	-	-	-	-			
PhSSR 17 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503						182 bp	185 bp
	609		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 218		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 219	135 bp	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 220		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 221	135 bp	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 222		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 234		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 253			148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 250		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 255			148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 258			148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 260		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 264		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
	F8 265		140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-
PhSSR 21 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	140 bp	150 bp	153 bp				
	609	-	-	-				
	F8 218	-	-	-				
	F8 219	-	-	-				
	F8 220	-	-	-				
	F8 221	-	-	-				
	F8 222	-	-	-				
	F8 234	-	-	-				
	F8 253	-	-	-				
	F8 250	-	-	-				
	F8 255	-	-	-				
	F8 258	-	-	-				
	F8 260	-	-	-				
	F8 264	-	-	-				
	F8 265	-	-	-				

# Ergebnisse

PhSSR 26 (IRD 800)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	111 bp	115 bp	120 bp				
	609	-	-	-				
	F8 218	-	-	-				
	F8 219	-	-	-				
	F8 220	-	-	-				
	F8 221	-	-	-				
	F8 222	-	-	-				
PhSSR 26 (IRD 800)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	F8 234	-	-	-				
	F8 253	-	-	-				
	F8 250	-	-	-				
	F8 255	-	-	-				
	F8 258	-	-	-				
	F8 260	-	-	-				
	F8 264	-	-	-				
PhSSR 45 (IRD 800)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	150 bp	157 bp					
	609	-	-					
	F8 218	-	-					
	F8 219	-	-					
	F8 220	-	-					
	F8 221	-	-					
	F8 222	-	-					
	F8 234	-	-					
	F8 253	-	-					
	F8 250	-	-					
	F8 255	-	-					
	F8 258	-	-					
	F8 260	-	-					
	F8 264	-	-					
F8 265	-	-						
PhSSR 49 (IRD 800)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	130 bp	135 bp	220 bp				
	609	-	-	-				
	F8 218	-	-	-				
	F8 219	-	-	-				
	F8 220	-	-	-				
	F8 221	-	-	-				
	F8 222	-	-	-				
	F8 234	-	-	-				
	F8 253	-	-	-				
	F8 250	-	-	-				
	F8 255	-	-	-				
	F8 258	-	-	-				
	F8 260	-	-	-				
	F8 264	-	-	-				
F8 265	-	-	-					



PhSSR 13 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	145 bp	155 bp	160 bp				
	609	-	-	-				
	F9 11	-	-	-				
	F9 12	-	-	-				
	F9 14	-	-	-				
	F9 43	-	-	-				
	F9 45	-	-	-				
	F9 74	-	-	-				
	F9 75	-	-	-				
	F9 82	-	-	-				
	F9 83	-	-	-				
	F9 86	-	-	-				
	F9 88	-	-	-				
	F9 89	-	-	-				
	F9 103	-	-	-				
	F9 104	-	-	-				
	F9 106	-	-	-				
	F9 107	-	-	-				
	F9 95	-	-	-				
PhSSR 17 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503					182 bp	185 bp	
	609	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 11	140 bp			152 bp	-	-	
	F9 12	Ausfall				-	-	
	F9 14	140 bp		150 bp	152 bp	-	-	
	F9 43	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 45	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 74	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 75	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 82	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 83	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 86	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 89	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 103	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 106	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 107	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
	F9 95	140 bp	148 bp	150 bp	152 bp	-	-	
PhSSR 21 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	140 bp	150 bp	153 bp				
	609	-	-	-				
	F9 11	-	-	-				
	F9 12	-	-	-				
	F9 14	-	-	-				
	F9 43	-	-	-				
	F9 45	-	-	-				
	F9 74	-	-	-				
	F9 75	-	-	-				
	F9 82	-	-	-				
	F9 83	-	-	-				

## Ergebnisse

PhSSR 21 (IRD 700)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	F9 86	-	-	-				
	F9 88	-	-	-				
	F9 89	-	-	-				
	F9 103	-	-	-				
	F9 104	-	-	-				
	F9 106	-	-	-				
	F9 107	-	-	-				
	F9 95	-	-	-				
PhSSR 26 (IRD 800)	Pflanze	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande	Bande
	503	111 bp	115 bp	120 bp				
	609	-	-	-				
	F9 11	-	-	-				
	F9 12	-	-	-				
	F9 14	-	-	-				
	F9 43	-	-	-				
	F9 45	-	-	-				
	F9 74	-	-	-				
	F9 75	-	-	-				
	F9 82	-	-	-				
	F9 83	-	-	-				
	F9 86	-	-	-				
	F9 88	-	-	-				
	F9 89	-	-	-				
	F9 103	-	-	-				
	F9 104	-	-	-				
	F9 106	-	-	-				
	F9 107	-	-	-				
F9 95	-	-	-					

erwartete Banden laut  
Literatur

auffällig, fehlende Bande

- keine Bande

Tab.3.12: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen mit Hilfe der sechs ausgewählten Mikrosatelliten. Dargestellt sind die Anzahl Banden der Ausgangspflanzen (Pelargonien-Genotypen 503 und 609) sowie die Anzahl der Banden der Regeneratpflanzen zur Feststellung möglicher Hybride.

Mikro-satellit	Fusions-kombination	Anzahl der Banden des Genotyps 503	Anzahl der Banden des Genotyps 609	Anzahl möglicher Hybride
PhSSR 13	503 (Meso) (+) 609 (Meso) Symmetrisch ELFU	4	0	0
PhSSR 17	503 (Meso) (+) 609 (Meso) Symmetrisch ELFU	2	4	0
PhSSR 21	503 (Meso) (+) 609 (Meso) Symmetrisch ELFU	3	0	0
PhSSR 26	503 (Meso) (+) 609 (Meso) Symmetrisch ELFU	3	0	0
PhSSR 45	503 (Meso) (+) 609 (Meso) Symmetrisch ELFU	1	0	0
PhSSR 49	503 (Meso) (+) 609 (Meso) Symmetrisch ELFU	3	2	0

Meso = Mesophyll, ELFU = Elektrofusion

Beim Genotyp 609 konnten bei PhSSR 13, 21, 26 und 45 keine Amplifikationprodukte detektiert werden. Dieser Genotyp besitzt demzufolge für diese 4 Mikrosatelliten ein Nullallel bzw. die Mikrosatelliten sind spezifisch an dieser Stelle für *P x hortorum*, aber offensichtlich nicht geeignet für den Wildtyp 609.

In Abb. 3.16 sind die typischen Bandenmuster der Eltern-Genotypen und der Regeneratpflanzen dargestellt.

## Ergebnisse

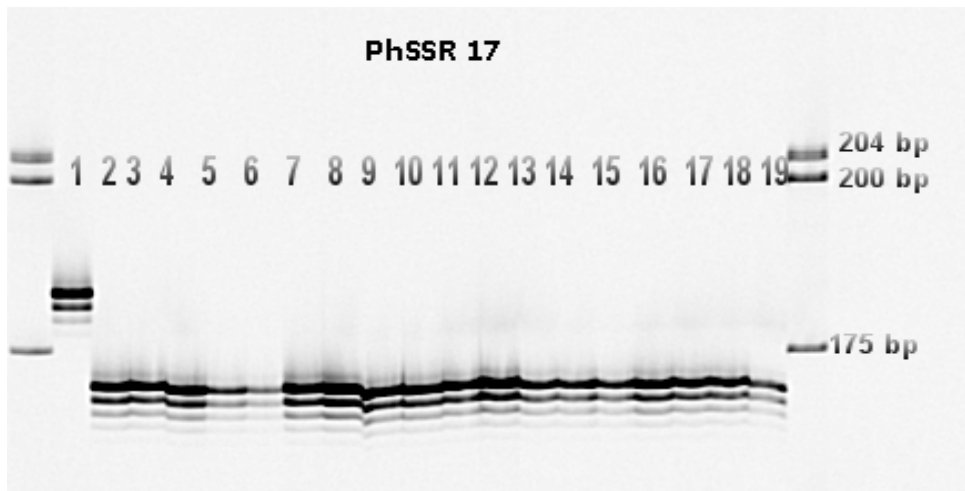


Abb. 3.16: Auftrennung der mit PhSSR 17 erhaltenen Amplifikationsprodukte (1=503, 2=609, 3 bis 19=Pflanzen aus Fusionsexperimenten).

Anhand der molekularen Ergebnisse wurden alle Pflanzen dem Wildtyp-Genotyp 609 zugeordnet.

### 3.5.4 Zytologische Charakterisierung der Fusionate mittels GISH

Bei 6 phänotypisch auffälligen Genotypen wurden Chromosomenpräparate angelegt, um die Chromosomenzahlen mit denen der Ausgangsgenotypen zu vergleichen und festzustellen, ob es Abweichungen im Chromosomensatz in Bezug auf die Ausgangspflanzen gibt. Beim Genotyp 503 wurden 36 Chromosomen und beim Genotyp 609 88 Chromosomen gezählt. *Pelargonium x hortorum* (503) ist tetraploid und besitzt 36 Chromosomen, während der Wildtyp (609) diploid ist und 88 Chromosomen besitzt (ALBERS und VAN DER WALT 1984). Unsere Daten der Chromosomenpräparate bestätigten die Angaben aus der Literatur (Abb. 3.17).

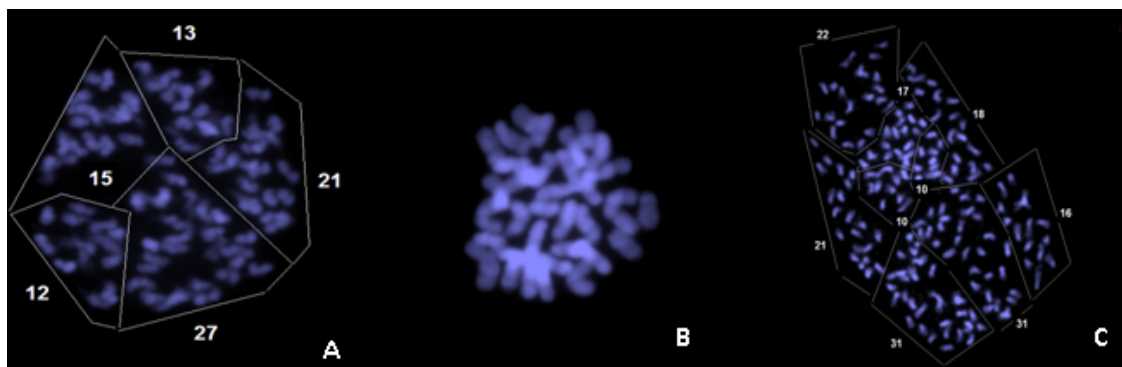


Abb. 3.17: Zytologische Aufnahmen vom Genotyp 609 (A, 88 Chromosomen), 503 (B, 36 Chromosomen) und eines Regenerates (C, 175-178 Chromosomen)

Regeneratpflanzen, die phänotypische Merkmale einer Polyploidisierung aufwiesen, wurden für eine Chromosomenzahlbestimmung ausgewählt. Die Anzahl der Chromosomen lag zwischen 175 bis 178.

Bei der GISH wurden keine homologen Abschnitte mit *P. x hortorum* nachgewiesen (Ergebnisse nicht dargestellt). Es wurden zwar mehrere Chromosomenpräparate angefertigt, ein Präparat war jedoch nur für die Auswertung geeignet.

### 3.5.5. Inhaltsstoffanalyse

Zur weiteren Charakterisierung der Regeneratpflanzen wurde eine Analyse der flüchtigen Inhaltsstoffe der Blätter (2.6.3) durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen konnten die flüchtigen Substanzen nachgewiesen werden, die von den Pflanzen in die Umgebung abgegeben wurden. Sowohl von der Wildform als auch von der Kulturform und den Regeneraten erfolgte eine Analyse. Es wurden Substanzen, die nur in der Wildform und den Regeneratpflanzen enthalten waren, gefunden. Des Weiteren wurden Substanzen nachgewiesen, die nur in der Kulturform *P. x hortorum* vorhanden waren. Es konnten aber auch Substanzen detektiert werden, die nur in der Kulturform und in dem Regenerat nachweisbar waren (alpha-Caryophyllen, Benzoesäure), sowie Substanzen die nur in den Regeneratpflanzen vorhanden waren. Insgesamt wurden 94 flüchtige Inhaltsstoffe detektiert, 39 wurden in Tab. 3.13 aufgelistet.

## Ergebnisse

Für die Analyse (2.6.3) erfolgte pro Pflanze eine dreifache Wiederholung. Getestet wurden zudem noch weitere Methoden zur Probennahme. In einer Testvariante wurde der Twister direkt über die Blattoberfläche (ein Twister pro Blatt) der jeweiligen Testpflanzen gerollt, anschließend erfolgte die Messung in der Gaschromatographie. Beim letzten beprobten Blatt einer Pflanze war ein Anstieg in der Intensität der Substanzen zu beobachten, so dass es bei der Analyse sogar zu einer Überlagerung einzelner Inhaltsstoffe kam. Aufgrund dieser Überlagerungen wurde deshalb die unter 2.6.3 aufgeführte, modifizierte Methode verwendet.

Tab. 3.13: Zusammenstellung nachgewiesener flüchtiger Inhaltsstoffe

	Substanzen	Kulturform	Regenerat	Wildtyp
1	alpha Pinen	RT	x	x
2	beta-Pinen	RT	x	
3	beta-Myrcen	RT	x	x
4	Terpinolen	RT		x
5	Limonen	RT	x	x
6	beta-Phellandren		x	x
7	(Z)-Ocimen		x	x
8	(Z)-3-Hexen-1-ylacetate	RT	x	x
9	6-Methyl-5-Hepten-2-on	RT	x	
10	Alloocimen		x	x
11	Nonanal		x	
12	Acetic acid	RT		x
13	Copaen		x	
14	p-Menthan-3-on II			x
15	beta-Bourbonen		x	x
16	Linalool	RT	x	x
17	beta-Cubeben		x	
18	beta-Caryophyllen	RT	x	x
19	2,6-Dimethyl-2.6-octadiene		x	x
20	alpha-Caryophyllen	RT	x	
21	(Z)-Citral	RT	x	x
	Substanzen	Kulturform	Regenerat	Wildtyp
22	Ledene		x	
23	Germacren D		x	x
24	alpha-Armophene		x	
25	Piperiton	RT		x
26	Geranial		x	x
27	alpha-Farnesene	RT	x	x
28	beta-Citronellol		x	x
29	2.7-Dimethyl-2.6-octadien-1-ol			x
30	Citronellylpropionat		x	x
31	Caryophyllenoxid		x	
32	Citonellyl		x	
33	Geranyl		x	
34	Bicyclosesquiphellandren		x	x
35	1-Bromo-naphthalen		x	
36	Citonic acid		x	x
37	Decanoic acid			x
38	Geranic acid		x	x
39	Benzoic acid		x	

Die Substanzen Nr. 1,2,3,4,5,8,9,12,16,18,20,21,25,27 wurden zusätzlich durch Koelution authentischer Referenzsubstanzen identifiziert (RT).

## Ergebnisse

Um den Einfluss von Berührungen auf die Intensität und evtl. auf die Zusammensetzung des Inhaltsstoffmusters zu prüfen, wurde dies in einer weiteren Testung berücksichtigt. Dazu wurden drei Blätter einer Pflanze mit je einem Twister beprobt. Es wurden keine Unterschiede in der Zusammensetzung der flüchtigen Inhaltstoffe zwischen der Probenentnahme vor und nach mechanischer Reizung der Pflanze festgestellt. Jedoch waren Peaks der nachgewiesenen Substanzen bei den Proben, die nach der Berührung genommen wurden, deutlich größer.

### 3.6 Testung von Regeneratpflanzen

Die durch die Protoplastenfusion entstandenen Pflanzen wurden verklont und im Rahmen eines Resistenztest hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften gegenüber *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* und *Ralstonia solanacearum* getestet. Für diese Versuche wurden die Isolate – Gemische von Xhp (Xhp 4, Xhp 6, Xhp 10) und Rs (Rs 13, Rs 19, Rs20) verwendet

(Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Ergebnisse der Resistenztestung der Regenerate

Fusionspflanzen	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>
F8 185	tolerant	tolerant
F8 198	resistent	resistent
F8 216	tolerant	tolerant
F8 253	resistent	resistent
F8 255	resistent	resistent
F8 264	resistent	resistent

Bei der Testung von Regeneratpflanzen nach somatischer Hybridisierung 503 (anfällig) + 609 (resistent) erwiesen sich die verklonten Einzelpflanzen der vier Genotypen F8 198, F8 253, F8 255 und F8 264 als resistent und die zwei Genotypen F8 185 und F8 216 wurden als tolerant gegenüber beiden Erregern eingestuft.



## 4. Diskussion

### 4.1 Resistenzevaluierung

*Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* gelangt in der Natur durch Wunden und Stomata in die Wirtspflanze. In der Praxis erfolgt die Übertragung des Erregers hauptsächlich während der vegetativen Vermehrung, unter anderem durch nicht eingehaltene phytosanitäre Maßnahmen, wie das Desinfizieren der Messer vor jedem Stecklingsschnitt. Die Inokulationsmethode von GRIESBACH und OLBRICHT (2002), die daran angelehnt war, hat den Nachteil, dass hier nach dem Schneiden mit einem Skalpell, 30 µl einer Bakteriensuspension auf die Schnittfläche getropft wurden. Die Flüssigkeit kann jedoch am Trieb herunter laufen oder abtropfen, wenn die Pflanze anschließend berührt bzw. zur Seite gestellt wird. Deshalb wurde bei den *Xanthomonas* Inokulationen eine handelsübliche Gartenschere (2.1.1.1) benutzt, deren Klingen vor jedem Schnitt in die Bakteriensuspension eingetaucht wurden. Die Handhabung dieser Methode war sehr gut für die Bewältigung eines hohen Probendurchsatzes geeignet und lieferte reproduzierbare Ergebnisse.

Für die *Ralstonia*-Testung musste eine völlig neue Methode erarbeitet werden, da bisher keine Resistenzprüfungen von Pelargonien gegenüber diesem Erreger bekannt waren. Zur Entwicklung des Resistenztests wurden zwei Methoden auf ihre Praktikabilität und Reproduzierbarkeit getestet (2.1.1.2). Sie sollten der in der Praxis vorkommenden Erregerausbreitung sehr nahe kommen. Auf Grund der Ergebnisse fand die Methode B im Rahmen der Resistenztestung Anwendung. Auch bei dieser Testmethode wurde die natürliche Übertragung durch kontaminiertes Gießwasser in den Testungen berücksichtigt. Die Verletzung der Wurzeln förderte das Eindringen des Erregers in die Pflanze, was sich auch in der Auswertung der Versuchsergebnisse bemerkbar machte (Abb. 3.1). Bei der Inokulation ohne anschließende Wurzelverletzung waren die Symptomausprägungen wesentlich geringer. Durch das Mitführen der Wasserkontrollen konnte ausgeschlossen werden, dass die Welkeerscheinungen durch die Wurzelverletzungen hervorgerufen wurden und dass eine latente Infektion des Pflanzenmaterials vorlag.

## Diskussion

Da die Testung der Pelargonien in mehreren Sätzen erfolgte, wurde zur stetigen Überprüfung der Virulenz des jeweiligen Isolategemisches immer ein anfälliger Standard mit inokuliert. Durch die schnelle Optimierung der Inokulationsmethoden war es überhaupt erst möglich, im Untersuchungszeitraum 114 Genotypen gegenüber *X. hortorum* pv. *pelargonii* und *Ralstonia solanacearum* zu testen.

Bei *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* waren deutliche Virulenzunterschiede zwischen den einzelnen Isolaten nachweisbar. Die 17 Isolate wurden mit Boniturnoten von 5–9 bewertet, für die Resistenztestungen wurden die Isolate *Xhp* 4, *Xhp* 6 und *Xhp* 10 ausgewählt. Obwohl alle von befallenen Pelargonien gewonnen wurden, waren Virulenzunterschiede nachweisbar (Abb. 3.2). Einige Untersuchungen von COPLIN und COOK (1990) mit *Xanthomonas* zeigten, dass Mutationen, die für einen Rückgang der Exopolysaccharidsynthese und –ausscheidung sorgten, gleichzeitig für eine reduzierte Virulenz verantwortlich waren. Somit spielen Exopolysaccharide eine wichtige Rolle im pathogenetischen Prozess COPLIN und COOK (1990). Die Isolate verschiedener Herkunft unterschieden sich vermutlich im Exopolysaccharidmuster und zeigten daher unterschiedliche Virulenzausprägungen. Um eine geeignete Inokulumdichte zu bestimmen, wurden drei verschiedene Verdünnungsstufen der Einzelisolate und des Isolategemisches am anfälligen Genotyp 501 getestet. Im Isolatevergleich (Abb. 3.3) ist zu erkennen, dass das Isolat *Xhp* 10 bei einer Inokulumdichte von  $1 \times 10^8$  cfu/ml eine sehr starke Symptomausprägung hervorruft. Trotz der hohen Virulenz des Einzelisolates wurde ein Isolategemisch eingesetzt, um konstante und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen und eine größer Abdeckung der Isolatevielfalt zu erreichen.

Bei der Virulenzanalyse der *Ralstonia* - Isolate zeigten sich erhebliche Unterschiede im Virulenzverhalten (ENGEL *et al.* 2008). Es wurden schwach virulente (BN 2-3), virulente (BN 5-7) und hoch virulente (BN 9) Isolate identifiziert. Die Isolate stammten von unterschiedlichen Wirtspflanzen und wurden an Pelargonien getestet. Von den hoch virulenten Isolaten wurden drei (*Rs* 13, *Rs* 19, *Rs* 20) für die Resistenztestung ausgewählt.

Zusätzlich zu den Stämmen aus der Stammsammlung des Instituts für Resistenzforschung und der DSMZ wurden Isolate eines aktuellen Gewässermonitorings mit in die Testungen einbezogen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollten weitere hoch virulente Isolate bestimmt werden, die zur Resistenztestung an Pelargonien eingesetzt werden sollten. Da die Virulenz bei den Isolaten aus dem Monitoring geringer war als bei den bereits geprüften Isolaten, wurden diese nicht in die Resistenzprüfung mit einbezogen. Es erfolgte lediglich die Charakterisierung des Virulenzverhaltens am anfälligen *Pelargonium* - Genotyp 501 (ENGEL *et al.* 2008).

Zur Bestimmung der geeigneten Inokulumdichte wurden die Konzentrationen von  $1 \times 10^6$  cfu/ml bis  $1 \times 10^8$  cfu/ml einander gegenübergestellt (Abb.3.5). Bei einer Verdünnung von  $1 \times 10^7$  cfu/ml ist das Isolategemisch nicht so stark virulent wie das Einzelisolat Rs 20. Diese Beobachtung wurde schon häufiger auch bei anderen Bakterienstämmen in Konzentration von  $1 \times 10^5$  cfu/ml bis  $1 \times 10^7$  cfu/ml gemacht (RICHTER, persönliche Mitteilung). Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte die antagonistische Wirkung der einzelnen Isolate untereinander sein, die unter bestimmten Bedingungen (Zelldichte, Umwelteinflüsse) auftritt. Antagonistische Wirkungen sind aber offenbar nicht nur bei eng verwandten Mikroorganismen von Bedeutung. Im biologischen Pflanzenschutz gewinnt der Einsatz von Mikroorganismen immer mehr an Bedeutung. So werden avirulente Stämme eingesetzt, um die Infektion mit virulenten Stämmen zu unterdrücken (BRATHWAITE und DICKEY 1970). Der Einsatz unterschiedlicher Bakterien mit antagonistischer Wirkung ist bereits erfolgreich durchgeführt worden. In der Schweiz wurde zum Beispiel *Bacillus subtilis* während der Kernobstblüte eingesetzt. *B. subtilis* besiedelte die Blüten, dadurch wurde die Ansteckung mit dem Erreger des Feuerbrandes *Erwinia amylovora* verhindert (JORDI 2008). Weitere antagonistische Wirkungen, sowohl *in vitro* als auch *in planta*, von epiphytischen Bakterien gegen *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* wurden von MAY *et al.* (1997) und von VÖLKSCH und MAY (2001) beschrieben. Obwohl die eingesetzten epiphytischen Mikroorganismen anderen Taxa angehören als die phytopathogenen Erreger ist nicht auszuschließen, dass auch immerhalb von Gattungen und Arten antagonistische Wirkungen auftreten. Die Bildung von Bacteriocinen ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung (LAVERMICOCCA *et al.* 2002).

Das Isolategemisch wurde mit einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  cfu/ml eingesetzt, bei dieser Konzentration trat keine Verringerung der Virulenz auf.

## Diskussion

Das *Ralstonia* - Isolat Rs 15 zeigte eine Auffälligkeit im Virulenzverhalten. Nach ersten Testungen erwies sich das Isolat als hoch virulent (BN 9). In einem weiteren Test war bereits die Koloniemorphologie des Erregers auffällig. Sie war im Gegensatz zu den bisherigen Kolonien nicht so stark schleimig und das Isolat zeigte auch nach Inokulation in *Pelargonium x hortorum* (anfälliger Genotyp 501) keine Symptome. *Ralstonia solanacearum* produziert eine  $\beta$ -1,4 Endoglucanase, eine Endopolygalacturonase, zwei Exopolygalacturonasen, eine  $\beta$ -1,4 Cellobiohydrolase und eine Pektinmethylesterase. Diese Enzyme werden durch das Typ II Sekretionssystem ausgeschieden (DENNY *et al.* 1990) und gehören zu den Virulenzfaktoren. Sie sind für den Abbau der Zellwände und der Mittellamelle verantwortlich und verursachen die typischen Welkesymptome. GOSTI *et al.* (1991) berichteten über die Besonderheit, dass der Erreger unter bestimmten Kulturbedingungen spontan eine nichtmucoide, avirulente Mutante hervorbringen kann. Die Ursache für den Verlust der Virulenz wurde vor allem in der veränderten Exopolysaccharidsynthese gefunden (KAO und SEQUEIRA 1991).

Bei der Testung von 114 *Pelargonium* Genotypen konnten drei selektiert werden, die gegen beide Pathogene resistent waren, das heißt, die keine Symptome zeigten und in denen auch keine Bakterienvermehrung und –ausbreitung festgestellt werden konnte. Darüber hinaus gab es zahlreiche Formen, die gegenüber einem oder auch beiden Erregern tolerant reagierten sowie Genotypen, die anfällig für beide Erreger waren (Abb. 3.6). Die getesteten Genotypen stammten aus unterschiedlichen *Pelargonium*-Sektionen. Zum Teil waren viele Pelargonien im Testsortiment enthalten, die den Duftpelargonien zugeordnet werden konnten. Viele der resistenten und toleranten Genotypen gehörten zu dieser Gruppe. Aufgrund des Resistenzverhaltens der stark duftenden Genotypen, lies sich darauf schließen, dass unterschiedliche Inhaltsstoffe einen Einfluss auf das Resistenzverhalten haben. LIS-BALCHIN *et al.* (1996, 1998) belegten in ihren Untersuchungen, dass Pelargonien Pflanzeninhaltsstoffe mit antibakterieller Wirkung besitzen. Sie fanden Substanzen wie zum Beispiel Citral, Geraniol und Linalol, die das Wachstum von Bakterien und Pilzen *in vitro* hemmten. Auch die Verwendung von ätherischen Ölen für Versuche zur Biofumigation zeigte, dass das Wachstum von *Ralstonia solanacearum* durch ätherische Komponenten gehemmt wurde (PARET *et al.* 2010).

Bei einigen Pflanzen konnten nach Inokulation mit *Xanthomonas* Verkorkungen am Stängel beobachtet werden, die zu einer Abschnürung des oberen Stängelstücks (Inokulationsstelle) führten. Diese Lignifizierung ist als Resistenzmechanismus bekannt und verhindert die Ausbreitung der Bakterien in der Pflanze (Hock *et al.* 1995).

Nach wie vor ist für die Einstufung von Befall der Erregernachweis von großer Bedeutung. Eines der ältesten Verfahren zum Pathogennachweis ist die Isolierung von Bakterien auf Agar - Medium (BERKELMANN und WOHANKA 1993). Ein Nachteil dieses Erregernachweises ist vor allem bei Pelargonien, die Zusammensetzung der Zellinhaltsstoffe zu nennen, die bakteriozide Wirkungen besitzen. Eine Vielzahl antimikrobieller pflanzeigener Verbindungen stellt eine chemische Barriere für die Erreger dar. ANDERSON (1982) zählte die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe darunter besonders Phenole, Glykoside und Alkaloide zu den Resistenzfaktoren. Die antimikrobiell wirkenden Inhaltsstoffe liegen häufig als inaktive Glykoside in der Pflanzenzelle vor. Wird die Zellstruktur mechanisch oder durch die Infekteinwirkung verletzt, werden mittels pflanzeigener Glykosidasen die inaktiven Glykoside in aktive Substanzen mit antibakterieller Wirkung umgewandelt und hemmen das Bakterienwachstum. Weitere Probleme beim Erregernachweis können durch apathogene Bakterien hervorgerufen werden, die durch eine höhere Vermehrungsrate die nachzuweisenden Bakterien überwachsen. Die Dauer bis zum Erhalt des Testergebnisses (mind. 2 Tage) stellt einen weiteren negativen Punkt dar. Die Vorteile dieses Nachweisverfahrens sind jedoch der geringe Material Aufwand, ein damit verbundener geringer Kostenfaktor und die Durchführbarkeit in jedem Labor ohne hohe Anschaffungskosten von Zusatzgeräten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl der Presssaft als auch Stängelstücke inokulierter Pflanzen für den Erregernachweis auf Kulturmedium verwendet, um auszuschließen das antibakterielle Substanzen das Wachstum der zu reisolierenden Erreger hemmen. Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse waren in allen Versuchsdurchläufen reproduzier- und auswertbar.

Bei den Duftpelargonien gab es Unterschiede im Rahmen der Erregerisolation. Bei einigen Genotypen konnten keine Bakterien im Presssaft nachgewiesen, jedoch aus den Stängelstücken der gleichen Pflanze isoliert werden. Daher wurden beide Methoden parallel durchgeführt. Bei unklaren Ergebnissen wurden zusätzlich mit Hilfe eines Agglutinationstestes serologische Untersuchungen durchgeführt (2.1.1.1).

## Diskussion

Anschließend wurde die Reinkultur der reisolierten Bakterien am anfälligen Standard erneut auf ihre Virulenz geprüft, um die Koch'schen Postulate zu erfüllen.

Für den Nachweis von *Xanthomonas* wurde 1981 von SANDER und WINKLER ein ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) entwickelt. Die erste PCR für den *X. hortorum* pv. *pelargonii* Nachweis in Pflanzenmaterial wurde von SULZINSKI *et al.* (1996) beschrieben. Aber auch bei diesem Nachweis stellten die Inhaltsstoffe der Pelargonie Probleme dar. Es kam zu negativen PCR Ergebnissen, die man nicht eindeutig zuordnen konnte. Es war fraglich, ob die Pflanzen wirklich pathogenfrei waren oder die PCR durch Hemmstoffe, die in der Pelargonie enthalten waren, zu einem negativen Ergebnis geführt haben (GLICK *et al.* 2002). Im Jahr 2002 wurde eine PCR Methode von GLICK *et al.* entwickelt, die es ermöglichte, *Xanthomonas* und *Ralstonia* simultan in der Pflanze nachzuweisen. Der Erregernachweis mittels PCR wurde an *P. x hortorum*, *P. domesticum*, *P. peltatum* und *P. graveolens* entwickelt und durchgeführt. Da es sich hierbei hauptsächlich um Kulturformen handelt, in unseren Testungen aber auch viele Wildformen und Genotypen die zu den Duftpelargonien gehören mit einbezogen wurden, ist die PCR-Methode nicht verwendet worden. Weil viele Inhaltsstoffe der Wild- und Duftpelargonien einen negativen Einfluss auf die PCR haben, hätten keine vergleichbaren Ergebnisse erzielt werden können.

Die statistische Auswertung der Resistenztestungen ließ erkennen, dass die Boniturzeiträume sehr wichtig sind, um latente Infektionen zu detektieren, da diese erst nach längerer Inkubationszeit sichtbar werden. Zusätzlich geht eine große Gefahr von den toleranten Genotypen aus, bzw. letztere sind Träger der Infektion, visuell sind sie jedoch symptomlos und können daher als Überträger dienen und in Beständen mit anfälligen Genotypen für erhebliche Schäden sorgen.

Nach dem ersten Boniturtermin (14 dpi) lies sich - sowohl bei den Inokulationsversuchen zu *Ralstonia* als auch bei den Versuchen zu *Xanthomonas* - zum Großteil noch keine Gruppierung der resistenten, toleranten und anfälligen Genotypen erkennen (Tab. 3.2 und Tab. Anhang 8.10.1). Erst 21 Tage nach der Inokulation konnten die Genotypen vorläufig in die entsprechenden Gruppen (resistent, tolerant, anfällig) eingeteilt werden. Eine endgültige Eingruppierung (tolerant, resistent) erfolgte erst nach der Aufarbeitung und Reisolation des jeweiligen Erregers.

Die statistischen Daten bestätigten die Annahme, dass es signifikante Unterschiede zwischen den resistenten und anfälligen Genotypen gibt.

Die gefundenen Resistenzen sollten in die anfällige Kultursorte *P. x hortorum* eingekreuzt werden. Eine Kreuzung zwischen den resistenten Genotypen und *P. x hortorum* wurde jedoch aufgrund des phylogenetischen Abstands zwischen den einzelnen Genotypen nicht in Betracht gezogen, da bereits Kreuzungen mit diesen Genotypen vergeblich durchgeführt wurden (mündliche Mitteilung PETERKA, JKI Quedlinburg).

Als Alternative wurde deshalb die Methode der Protoplastenfusion weiterentwickelt und verwendet.

## 4.2 Protoplastenfusion

Protoplasten können aus Blättern (NAGATA und TAKEBE 1971), Blütenblättern (OH und KIM 1994), Sprossmaterial (BINDING *et al.* 1981), Wurzeln (COCKING 1960), Kotyledonen (DAVID und DAVID 1979), Mikrosporen und Pollen (BAJAJ 1974) sowie aus Kallus von Zellsuspensionen (KAO *et al.* 1971) gewonnen werden. Als schonende Methode für die Aufarbeitung/Ernte der intakten Protoplasten, stellte sich das von YE und EARLE (1991) genutzte Aufbereitungsverfahren heraus. Bei dieser Methode erfolgte die Aufreinigung mit Hilfe eines Saccharose-Gradienten (2.3.1).

Um die Methode zur Protoplastenisolierung zu optimieren, wurden zwei Isolationsvarianten mit dem Enzym EI getestet (Tab. 3.4). Bei der Ermittlung der Protoplastenausbeute konnte festgestellt werden, dass es bei beiden Methoden beim Genotyp 503 nur geringe Abweichungen in der Anzahl der Protoplasten gab. Für den Genotyp 609 wurde die Methode 1 als geeigneter angesehen, da hier die Protoplastenausbeute höher war. Die Vitalitätsrate war bei beiden Genotypen nach der Isolierungsmethode 2 um fünf Prozent gestiegen, so dass man davon ausgehen kann, dass durch das kontinuierliche Schütteln (15 h, 30 UpM) bei der Isolierungsmethode 1 die Protoplasten stärker geschädigt werden und dadurch an Vitalität verlieren.

## Diskussion

Zur weiteren Optimierung der Protoplastenisolierungsmethode wurde ein modifiziertes Enzym (Enzym E-N/D) von NASSOUR und DORION (2002) im Vergleich zu dem im Labor etablierten Enzym (EI) eingesetzt. Bei diesem Versuch konnten die Versuchsparameter auf weitere Genotypen, die im Verlaufe der Arbeiten ebenfalls als resistent gegen beide Erreger eingestuft wurden, übertragen werden. Es stellte sich heraus, dass das Enzym E-N/D keine deutliche Steigerung der Protoplastenausbeute und auch keine gesteigerte Vitalität bewirkte.

Ein weiterer Punkt, der Einfluss auf die Beschaffenheit der Protoplasten hatte, war die In-vitro-Kulturdauer der Ausgangspflanzen. So nahmen die Vitalität und die Regenerationsfähigkeit der isolierten Protoplasten mit zunehmender Kulturdauer ab, trotz regelmäßiger Überführung der Ausgangspflanzen auf frisches Medium. Besonders auffällig war dies beim resistenten Genotyp 609. Nach 12 Monaten In-vitro-Kultur, waren die Protoplasten hinsichtlich ihrer Vitalität und Regenerationsfähigkeit qualitativ schlechter als 2 Monate nach der In-vitro-Kulturetablierung (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Genotypen 585 und 662 wurden erst zum Ende der Arbeit als doppelt resistent identifiziert und wurden zeitnah in die In-vitro-Kultur übernommen, 2 Monate nach der Überführung wurden vitale und regenerationsfähige Protoplasten isoliert. Der Genotyp 503 stand über die gesamte Dauer der Arbeit als In-vitro-Pflanze zur Verfügung. Zwischenzeitlich konnten von diesem Genotyp keine Protoplasten isoliert werden, da die Ausgangspflanzen nicht die gewünschte Qualität aufwiesen. Für den schlechten Zustand der Ausgangspflanzen des Genotyps 503 könnte ebenfalls die lange Periode der In-vitro-Kultivierung als Ursache angesehen werden. Aber auch die Jahreszeit scheint einen Einfluss auf die In-vitro-Kultur zu haben. KESKITALO (2001) erkannte einen Zusammenhang zwischen der jahreszeitlichen Rhythmik und der Protoplastenausbeute von *Tanacetum*. Im Winter und im Frühling konnte eine höhere Protoplastenausbeute erzielt werden. Um den Einfluss der Kulturdauer und des jahreszeitlichen Rhythmus auf die Protoplastengewinnung bei *Pelargonium* zu überprüfen und endgültig zu bestätigen, müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

Während der Versuchsdurchführung stellte sich heraus, dass nur Fusionen, die im Mai, Juni und August durchgeführt wurden, zu vollständigen Pflanzen regenerierten.



Es lies sich eine jahreszeitliche Abhängigkeit feststellen. Im Frühling und Sommer war die Regenerationsfähigkeit der Protoplasten am höchsten.

Bei den Suspensionskulturen konnte eine Abnahme der Vitalität und Regenerationsfähigkeit mit zunehmender Kulturdauer nicht nachgewiesen werden. Allerdings war die Regeneration von Protoplasten aus Suspensionskulturen langwieriger als bei Mesophyllprotoplasten. Die Ergebnisse von NASSOUR und DORION (2002) weisen ebenfalls darauf hin, dass sich bei Pelargonien Mesophyllprotoplasten am besten für eine Fusion und Regeneration eignen. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine Suspensionsprotoplasten mit in die Testung einbezogen.

Aus den unterschiedlichen Geweben (Kallus, Petalen und Mesophyll) der Pelargonie wurden Protoplasten isoliert, die sich in Stabilität, Regenerationsfähigkeit und Größe unterschieden. Zudem waren die Eigenschaften der Protoplasten stark vom Genotyp abhängig. Zum Beispiel unterschieden sich isolierte Protoplasten aus dem Mesophyllgewebe verschiedener Genotypen in Größe und Gewicht. Die Protoplastenausbeute variierte ebenfalls von Genotyp zu Genotyp (3.2). Im Vergleich der Genotypen 503 und 609 wurde eine höhere Protoplastenausbeute beim Genotyp 503 ermittelt. Die Vitalitätsrate lag bei beiden Genotypen bei 75 %. Die Mesophyllprotoplasten des Genotyps 503 waren größer und schwerer als die Protoplasten des Genotyps 609. Dies erschwerte eine Fusion der beiden Partner, vor allem mit der Methode der Elektrofusion. Die Protoplasten der beiden Genotypen des Protoplastengemisches befanden sich in der Küvette in unterschiedlichen Ebenen. Daher traten Homofusionen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit auf als eine Heterofusion.

Bei der chemischen Methode der Protoplastenfusion befanden sich durch die Tropfen-Methode und die Zugabe von PEG alle Pelargonien-Protoplasten in einer Ebene. Daraus ergab sich eine höhere Wahrscheinlichkeit, Heterofusionen zu erhalten. Für den eigentlichen Fusionsprozess war die chemische Fusionsmethode sehr geeignet, da man die Fusion im Lichtmikroskop verfolgen und Heterofusionate bestimmen konnte. Ein erheblicher Nachteil dieser Methode war die Schädigung der Protoplasten und die damit verbundene schlechte Regenerationsfähigkeit.

Daher wurde die Elektrofusionsmethode getestet. Erfolge mit dieser Fusionsmethode wurden bereits unter anderem bei *Oryza sativa* (TORIYAMA und HINATA 1988), *Rudbeckia* (AL-ATABEE *et al.* 1990) und *Medicago* (DAMIANI *et al.* 1988, GILMOUR *et al.* 1989) beschrieben. In Versuchen mit *Solanum* wurde gezeigt, dass die Elektrofusion eine sehr effektive Methode darstellt (PEHU *et al.* 1989, GREPLOVA *et al.* 2008). Eine Fusionsrate von 30 % wurde von SERRAF *et al.* (1991) bei *Solanum* erreicht.

Bei der Elektrofusion mit Mesophyllprotoplasten der Pelargonie konnten keine eindeutigen Fusionate identifiziert werden. Die Regenerationsfähigkeit war jedoch deutlich höher als bei der chemischen Fusion (Es sind nur Pflanzen aus den ELFU Versuchen entstanden). Möglicherweise ist dies auf die stimulierende Wirkung des Elektroimpulses zurückzuführen, ähnliche Beobachtungen wurden bereits von RECH *et al.* (1987) beschrieben. Durch den Elektroimpuls wurden die Zellmembranen porös. Dadurch konnten leichter Vitamine und Phytohormone aus dem Kulturmedium in die Zelle gelangen. Dies führte zu einer schnelleren Teilungs- und Regenerationsrate (RATHORE und GOLDSWORTHY 1985 a, b).

### **4.2.1 Protoplastenkultur und –regeneration**

Es bestand die Notwendigkeit, für die Protoplasten geeigneten Kulturbedingungen zu entwickeln, welche die Lebens- und Regenerationsfähigkeit der Protoplasten erhalten und unterstützen. Für die Protoplastenkultivierung wurden verschiedene Methoden beschrieben, unter anderem die Kultur der Protoplasten in einem dünnen Flüssigkeitsfilm (POIRIER-HAMON *et al.* 1974). Weitere Kulturtechniken wurden von CELLA und GALUN 1980 (Feeder-Technik) und von ARCIONI *et al.* 1982 (Agartropfentechnik) beschrieben.

Während der Regeneration von Protoplasten zu vollständigen Pflanzen werden folgende Entwicklungsschritte durchlaufen: die Zellwandregeneration, die Zellteilung, die Aggregatbildung bis hin zur Bildung von Mikrocallussen. Wie bereits von MEYER (1974) beschrieben, war die Dauer der einzelnen Phasen stark abhängig vom physiologischen Zustand des Ausgangsmaterials.

Bei den verwendeten Pelargonien-Genotypen betrug die Zeit von der Protoplastenisolierung bis zur Überführung einer regenerierten Pflanze ins Gewächshaus im Durchschnitt 6 Monate. Die ersten Teilungen der Protoplasten waren nach der Elektrofusion bereits nach 2 Tagen zu beobachten, während bei den Kontrollen und den PEG Fusionen erste Teilungen frühestens nach 3-4 Tagen festgestellt werden konnten. Diese Ergebnisse sprechen auch dafür, dass der Elektroimpuls eine positive Wirkung auf die Regeneration hatte. Nur die Protoplasten der Kontrollen und der Elektrofusionsversuche waren in der Lage, zu Pflanzen zu regenerieren, obwohl es sich um einheitliches Pflanzenausgangsmaterial handelte. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die chemische Fusion, so wie sie angewendet wurde, eine zu große Schädigung der Protoplasten verursachte und somit eine Regeneration verhinderte.

Die Regeneration erfolgt zunächst, wie unter 2.5.1 beschrieben, in Flüssigkultur; im weiteren Verlauf der Regeneration wurden die Mikrokalluse auf festem Medium kultiviert. Um die Zuführung neuer Nährstoffe und die langsame Absenkung der Osmolarität zu gewährleisten, wurden die Flüssigkulturen regelmäßig verdünnt. Eine Regeneration nur in Flüssigkultur war jedoch nicht geeignet, da die Kalluse zu Boden sanken und dadurch nur noch ein geringer Gasaustausch erfolgen konnte (LÖRZ *et al.* 1983). Diese Faktoren wirkten sich negativ auf die Weiterentwicklung der Regenerate aus und führten zum Absterben der Pelargonien-Kalluse. Daher wurden die Regenerate als Mikrokalluse auf festes Medium überführt.

Das Verfestigungsmittel spielte eine entscheidende Rolle im Prozess der Protoplastenregeneration. SHINA und GALIGARI (2005) haben am Beispiel von Tabak und Lupinen nachweisen können, dass ein besseres Wachstum auf Medium erfolgte, welches mit Agarose verfestigt war, als auf Medium das mit Agar verfestigt wurde. In den Arbeiten von NASSOUR und DORION (2002, 2003) wurde das Regenerationsmedium für Pelargonien mit Gelrite anstelle von Agar verfestigt. Durch den direkten Vergleich von Agar und Phytigel (Daten nicht dargestellt) stellte sich heraus, dass Phytigel für die Protoplastenregeneration von Pelargonien besser geeignet ist als Agar. Daher wurde für die Regenerationsmedien nur Phytigel eingesetzt. Phytigel ist ein von *Pseudomonas elodea* synthetisiertes Polysaccharid.

## Diskussion

Bei diesem Verfestigungsmittel handelt es sich um ein Polymer aus Glucose – Glucuronsäure- und Rhamnose - Einheiten, welches ein klares farbloses Gel bildet. Die Verfestigung war abhängig von der  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  Konzentration (4-8 mM) im Medium (EVANS *et al.* 2003). Zur Dauerkultivierung und Wurzelbildung bei Pelargonien wurde Agar verwendet, da in diesem Stadium der Kultivierung das Verfestigungsmittel keinen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung hatte und Agar wegen seiner unkomplizierten Handhabung Vorteile aufweist. Die Kulturmedien sind auf der Basis von MS-Medium (MURASHIGE und SKOOG, 1962) hergestellt worden.

Weitere Versuche zur Regeneration wurden mit Nitroprussid und Chitosan durchgeführt (3.4). Bei Chitosan handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Polyaminosaccharid, das u. a. einen positiven Einfluss auf das Wachstum von In-vitro-Orchideen hat (NGE *et al.* 2006, PORNPIENPAKDEE *et al.* 2008). Aber auch im Fall einer In-vitro-Kultur von *Vitis vinifera* wurde eine stimulierende Wirkung von Chitosan nachgewiesen (AIT BARKA *et al.* 2004). Die Konzentrationen und stimulierende Wirkungen auf das Pflanzenwachstum sind stark Spezies abhängig (UTHAIRATANAKY *et al.* 2007). PORNPIENPAKDEE *et al.* (2010) verwendeten 10 mg/l und 20 mg/l für ihre Orchideenkulturen. Mit beiden Konzentrationen wurden gute Ergebnisse erzielt. Als optimal stellte sich eine Konzentration von 20 mg/l heraus. Über die Wirkung von Chitosan auf *Pelargonium*-Kallusse gab es bisher noch keine Ergebnisse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Chitosanpräparate (2.5.3) in einer Konzentration von 15 mg/l eingesetzt. Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob Chitosan eine positive Wirkung auf die Regeneration von *Pelargonium*-Kallussen hat und eventuell zu einer Beschleunigung der Regeneration führt. Nach ersten Versuchen konnte die Wirkung von Chitosan als Pflanzenstärkungsmittel für Pelargonien nicht bestätigt werden. Alle Kallusse, die auf mit Chitosan versetztem Medium kultiviert wurden, waren nach 4 Wochen abgestorben. Bei den Kontrollen auf dem Medium ohne Chitosan erfolgte eine normale Regeneration. Womöglich war das Stadium der Regeneration, in dem das Chitosan eingesetzt wurde, noch zu früh, so dass Chitosan anstatt einer fördernden eine hemmende Wirkung hatte und somit die Regeneration stoppte und ein Absterben der Kallusse verursachte. Eine weitere Ursache für das Absterben der Kallusse auf dem mit Chitosan versetztem Medium könnte aber auch eine zu hohe Chitosankonzentration gewesen sein.

Um diese These zu bestätigen, müssten weitere Versuche mit *Pelargonium*-Kallussen durchgeführt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich sagen, dass Chitosan keine positive Wirkung auf die Regeneration hatte.

Nitritoxid ist ebenfalls bekannt als bioaktives Molekül, welches viele biologische Vorgänge reguliert (NEILL *et al.* 2002, TUN *et al.* 2008). Unter anderem fördert NO das Pflanzenwachstum und die Pflanzenentwicklung, stimuliert die Keimung und das Sämlingswachstum und verzögert die Seneszenz bei *Arabidopsis* (LIBOUREL *et al.* 2005, KOLBERZ *et al.* 2008). Die Akkumulation von NO in den Wurzeln bewirkt eine Auxin-Induktion, die laterale Wurzelbildung (CORREA-ARAGUNDE *et al.* 2006; HAN *et al.* 2008; PAGNUSSAT *et al.* 2002, 2003; TEWARI *et al.* 2008) sowie die Entwicklung von Wurzelhaaren (LOMBARDO *et al.* 2006).

Aufgrund der beschriebenen positiven Wirkungen auf das Pflanzenmaterial wurde Sodyumnitroprussid (SNP) als NO-Donor dem Regenerationsmedium in einer Konzentration von 30 und 60  $\mu\text{M}$  zugesetzt (2.5.3). Xu *et al.* (2009) konnten bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  feststellen, dass die Kallusinduktion und die Sprossdifferenzierung bei *Dioscorea opposita* positiv unterstützt wurde. Bei den Pelargonien-Kallussen konnte keine positive Wirkung auf die Regeneration festgestellt werden, weder bei der geringen Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  NO noch bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$ . Bei allen Kallussen traten nach 4, spätestens nach 6 Wochen Braunverfärbungen auf, die anschließend zum Absterben der Kallusse führten. Die Braunfärbung der Kallusse wurde vermutlich hauptsächlich durch eine Überproduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  – möglicherweise verstärkt gebildet nach Stresssituationen - hervorgerufen. FOYER *et al.* (1994) beschrieben die Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Alarmsignal, welches zu Veränderungen in der Genexpression und im Metabolismus führte. Die Zugabe von SNP sollte zu einer Verbesserung der antioxidativen Aktivitäten bei In-vitro-Kulturen führen (Xu *et al.* 2009). Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, da die Kallusse der Kontrollen ohne Zusatz von SNP regenerierten, die mit SNP versetzten Proben jedoch nicht. Eventuell war eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  SNP zu hoch für *Pelargonium*-Kallusse und wirkte sich daher negativ auf die Regeneration aus, so dass die ansonsten positive Wirkung von SNP in zu hoher Konzentration das Gegenteil bewirkte und zusätzlich Stress auslöste.

Durch einen gezielten Einsatz von Phytohormonen konnte die Regeneration positiv beeinflusst werden. Nach der Isolierung und Fusion wurden die Protoplasten in PPM 1 Medium überführt. In diesem Medium war die Auxin Konzentration hoch, in den folgenden Verdünnungsschritten mit PPM 2 Medium wurde die Zytokininkonzentration langsam gesteigert. Im PPM 3 Medium (Tab. 8.4) waren Auxin und Zytokinin im Verhältnis 1:11 enthalten, diese Kombination induzierte die Sprossbildung. Im weiteren Regenerationsverlauf wurden die Kalluse auf PRM 10 Medium (Tab. 8.5) überführt. In diesem Regenerationsmedium war die Konzentration der Zytokinine anteilig niedriger als im PPM 3 Medium. Dies bewirkte ebenfalls eine Sprossinduzierung bzw. eine Sprossverlängerung. Das PMSV Medium (Tab. 8.6) wurde speziell für die Sprossverlängerung entwickelt und enthielt sowohl Auxin als auch Zytokinin im Verhältnis 1:1. Die Bewurzelung der Regenerate erfolgte auf Kad 3 Medium (Tab. 8.2). Diesem Medium wurde nur Auxin zugesetzt, welches die Wurzelbildung induzierte. Mit Hilfe dieses Regeationsprogrammes (Abb. 2.3) wurden erfolgreich Pflanzen aus zuvor isolierten Protoplasten regeneriert. Ähnliche Regenerationsprotokolle für Pelargonien wurden von HASSANEIN und DORION (2006) beschrieben.

### **4.3 Charakterisierung der Regeneratpflanzen**

Für die Charakterisierung der Regeneratpflanzen wurden zunächst die phänotypischen Merkmale betrachtet und ausgewertet. Pflanzen mit starken Auffälligkeiten im Phänotyp waren besonders interessant, weil der Phänotyp Hinweise auf eventuelle Veränderungen im Genotyp gab. Im Verlauf der Regeneration kann es zur Eliminierung von Chromosomen kommen (GLEBA *et al.* 1988) und somit zu einer abnormalen Entwicklung und einem abnormalen Wachstum bei Hybriden aus asymmetrischen Fusionen. Ein Grund für das Auftreten dieser Veränderungen ist der hohe Anteil von Fremd-DNA im Kern, der zu einer Unverträglichkeit zwischen den Genomen führen kann (LIU *et al.* 2005). Diese Beobachtungen könnten eine Ursache für die phänotypischen Abweichungen der Regeneratpflanzen (Abb. 3.12) sein.

Aber auch der Ploidiegrad des Ausgangsmaterials hat einen Einfluss auf die geno- und phänotypischen Merkmale der Regeneratpflanzen. Der Ploidiegrad der Fusions-Ausgangspflanzen war bereits zu Beginn der Arbeit bekannt. Der Wildtyp war diploid ( $2x = 88$ ) und die Kulturform *Pelargonium x hortorum* tetraploid ( $4x = 36$ ). Diese Angaben konnten durch flowcytometrische Messungen bestätigt werden und dienten als Grundlage für die Charakterisierung potentieller Fusionshybride.

Bei den Regeneratpflanzen aus Fusionen von diploiden Ausgangspflanzen wurden bei 22 Pflanzen Veränderungen im DNA-Gehalt nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse traten zum Beispiel bei Petunien auf. Ein veränderter DNA-Gehalt konnte bei über 85% der Regenerate festgestellt werden, wenn die Fusions-Ausgangspflanzen diploid waren (OH *et al.* 1995). Während bei tetraploidem Ausgangsmaterial keine Regenerate mit verändertem DNA-Gehalt nachgewiesen werden konnten.

Mit Hilfe der flowzytometrischen Untersuchungen wurde ebenfalls festgestellt, dass von den 20 Regeneraten höherem DNA-Gehalt bei 6 Pflanzen der DNA-Gehalt etwas geringer war als die Summe der DNA-Gehalte der Ausgangspflanzen 503 und 609. Eine Ursache war möglicherweise der Verlust einzelner Chromosomen, wie es zum Beispiel von MIZUHIRO *et al.* (2001) bei *Primula* beschrieben wurde. Die Durchflusszytometrie beruht auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung. Durch enzymatische und mechanische Prozesse freigesetzte Zellkerne werden mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. In dieser Arbeit wurde PI (Propidiumiodid) verwendet. PI bindet durch Interkalierung zwischen den einzelnen Basen an die DNA und färbt diese an (DOLEŽEL und BARTOS 2005). Die in Pelargonien vorhandenen phenolischen Komponenten und Sekundärstoffe haben einen negativen Einfluss auf die mit PI gefärbten Präparate. Daher wurde dem Extraktionspuffer PVP zugesetzt. PVP ist in der Lage diese Substanzen zu binden und dadurch die Fehlerquote bei den Messungen zu reduzieren (YOKO *et al.* 2000, THIEM und SLIWINSKA 2003). Es konnte jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass durch die Sekundärstoffe Probleme im Bereich der Anfärbung auftraten und daher manche Messungen nicht auswertbar waren. Eine weitere Fehlerquelle in der Flowcytometrie ist die Einwirkzeit des PI, längere Einwirkzeiten sorgen nicht für eine Verstärkung der Intensität der angefärbten Bereiche, sondern färben zusätzlich Zellbruchstücke an, die die Chromatogramme durch Überlagerungen unauswertbar machten.

## Diskussion

Laut Literatur (MICHAELSON *et al.* 1991a, BARRE *et al.* 1996) werden Inkubationszeiten von 2 bis 20 min empfohlen. Um auch diese Fehlerquelle auszuschließen, wurde das zu analysierende Pflanzenmaterial sofort nach der Aufbereitung flowzytometrisch vermessen (max. nach 5 min). Die angefärbten Zellkerne werden an einer Lichtquelle vorbeigeführt und mit Hilfe eines Detektors dargestellt. Die emittierte Strahlung korreliert mit der im Zellkern enthaltenen DNA-Menge. Eine spezielle Software ermittelt den Mittelwert und den Variationskoeffizienten und stellt die Daten in Form eines Histogramms dar. Je kleiner der Wert des Variationskoeffizienten (CV) ist, desto genauer ist die Messung. Wenn DAPI für die Anfärbung der Kerne genommen wurde, gilt ein CV-Wert von 1-3 % als ideal. Bei einer Anfärbung mit Propidiumiodid können die Werte etwas höher sein (DOLEŽEL und BARTOS 2005). Die während der flowzytometrischen Analyse ermittelten CV-Werte befanden sich im Rahmen der angegebenen Größen (1,82-1,99) und verifizieren die Aussagen der Messungen.

Neben durchflusszytometrischen Untersuchungen können molekulargenetische Untersuchungen Hinweise auf mögliche Hybride geben. Als mögliche Methoden standen die RAPD Analyse (Random Amplified Polymorphic DNA) und die Analyse mit Hilfe von Mikrosatelliten (SSRs Single Sequence Repeats) zur Verfügung. RAPD Analysen werden auf Grund ihrer einfachen Handhabung häufig zum Nachweis von Hybriden eingesetzt. Ein großer Nachteil der RAPD Analysen ist die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (SKROCH und NIENHUIS 1995, JONES *et al.* 1997). Anfangs wurde im Rahmen dieser Arbeit die RAPD Methode genutzt, um die erhaltenen Regenerate zu charakterisieren, da durch die Untersuchungen jedoch keine eindeutigen und reproduzierbaren Ergebnissen erhalten wurden, sind andere Techniken verwendet worden.

Für die Hybrid-Testungen wurden die molekulargenetischen Untersuchungen mit Hilfe von speziell für Pelargonien entwickelten Mikrosatelliten durchgeführt (BECHER *et al.* 2000). Bei Mikrosatelliten handelt es sich um kurze nicht kodierende DNA-Sequenzen, die im Genom eines Organismus verteilt vorliegen. Diese DNA-Sequenzen bestehen aus 2-4 Nucleotiden und können in 10-100facher Wiederholung auftreten (LAGERCRANTZ *et al.* 1993). Mit Hilfe der PCR-Technik und der Möglichkeit der gelelektrophoretischen Auftrennung konnten durch den Einsatz von Mikrosatelliten mögliche Hybridpflanzen untersucht werden.



Die Vorteile der Mikrosatelliten als DNA-Marker sind die gleichmäßige Verteilung im Genom, der ausgeprägte Polymorphismus und der einfache Nachweis mit Hilfe von PCR-Verfahren (LAGERCANTZ *et al.* 2003). Die verwendeten Pelargonien - spezifischen Primer amplifizierten, wie erwartet, bei *P. x hortorum* Genotyp 503. Beim Wildtyp 609 konnten nur bei einigen Primerkombinationen Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden. Diese unterschieden sich jedoch von denen des Genotyps 503. In den untersuchten Regeneratpflanzen wurden ausschließlich die Amplifikate wie beim Genotyp 503 generiert. Somit konnte mit diesen Markern kein Hybridnachweis erbracht werden. Diese molekularen Ergebnisse lassen damit erst einmal nur den Schluss zu, dass die gefundenen phänotypischen Auffälligkeiten nur auf einem veränderten Ploidiegrad beruhen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass mit den Markern nur ein geringer Teil des Genoms charakterisiert wurde.

Um weitere Erkenntnisse über die genetische Zusammensetzung der Fusionsprodukte zu erlangen, könnte eine Genomsequenzierung der Ausgangspflanzen und der Fusionsprodukte durchgeführt werden. In den letzten 10 Jahren haben sich die die Kosten für DNA-Sequenzierung enorm reduziert (COLLIN 2010). Die Basenabfolge zahlreicher Genome kann heute in relativ kurzer Zeit und mit überschaubaren Kosten ermittelt werden (FEUILLET *et al.* 2011). Durch die Größe des Pflanzengenoms ist es jedoch nicht so trivial, eine komplette Sequenzierung des gesamten Genoms durchzuführen (HUANG *et al.* 2009). Zwei weitere Faktoren erschweren zusätzlich die Sequenzierung; zum einen ist das die Heterozygotie (JAILLON *et al.* 2007, ZHARKITH *et al.* 2008) und zum anderen die Polyploidie (PAUX *et al.* 2008).

Die unter anderem aus der Zellkultur bekannte somaklonale Variation könnte eine weitere Ursache für die phänotypischen Veränderungen sein (LI *et al.* 2010). LARKIN und SCOWCROFT (1981) prägten zum ersten Mal den Begriff somaklonale Variation und beschrieben unter anderem Veränderungen an Pelargonien, die auf die In-vitro-Kultivierung zurückzuführen waren. Bei der somaklonalen Variation handelt es sich um genetische Veränderungen, die während der Zellkultivierung entstehen. Häufig wurden diese auf spontane Mutationen, die auf einer Destabilisierung des Genoms beruhten, zurückgeführt. Die genetischen Veränderungen wurden von Punktmutationen bzw. numerischen oder strukturellen Veränderungen der Chromosomen ausgelöst (EVANS *et al.* 2003).

## Diskussion

Wichtige Faktoren für das Auftreten von somaklonaler Variation waren vor allem die rege Zellteilung, die Kulturzeit, die Phytohormone und deren Konzentration sowie mechanische Einwirkungen (GUADAGNINI *et al.* 1998). Aber auch Transposons wurden immer häufiger als Ursache für die somaklonale Variation angesehen. Bei den Transposons handelt es sich um mobile DNA-Elemente, die Genmutationen auslösen, indem sie sich in den jeweiligen Genabschnitt integrieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass während der In-vitro-Kultivierung Transposons aktiviert wurden (HIROCHIKA *et al.* 1996; KOMATSU *et al.* 2003; JIANG *et al.* 2003) und somit häufiger in neue Genabschnitte integrierten. Der Nachweis ob es sich bei den phänotypisch auffälligen Pelargonien-Regeneratpflanzen um somaklonale Variationen handelt, wurde nicht durchgeführt. GODWIN *et al.* (1997) führten Untersuchungen an acht Reispopulationen mit Hilfe von RAPD's durch, um diese auf somaklonale Variationen zu testen. Insgesamt konnten während dieser Versuche 28 polymorphe Banden identifiziert werden. Zur weiteren Charakterisierung der Regeneratpflanzen wurden die Methode Genomische *in situ* Hybridisierung (GISH) genutzt, um einen eindeutigen Hybridnachweis zu erhalten. Es wurden ca. 10 Wurzelspitzenpräparate von phänotypisch auffälligen Pflanzen angefertigt. Von diesen Präparaten waren 3 für eine Hybridisierung im Rahmen der GISH geeignet. Die Auswertung der GISH ergab, dass es sich bei den phänotypisch und in der Flowzytometrie auffälligen Regeneratpflanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit um Homofusionate handelte (Abb. 3.17c). Es wurden doppelt so viele Chromosomen gezählt (176-178) als beim Wildtyp 609 (88). Bei der Homofusion fusionierten Protoplasten des gleichen Genotyps, in diesem Fall des Genotyps 609, miteinander.

Um das Resistenzverhalten der Regeneratpflanzen zu charakterisieren, wurden 6 ausgewählte Regeneratpflanzen vegetativ vermehrt und anschließend der Resistenzprüfung unterzogen. Die Resistenzprüfung war notwendig, da in den meisten Fällen bestimmte, auch gewünschte Eigenschaften während der Fusion verloren gehen können. Die Regeneratpflanzen zeigten Unterschiede im Resistenzverhalten, von den sechs getesteten Regeneraten waren vier resistent und zwei tolerant gegenüber beiden Erregern (Tab. 3.1). Anhand der Ploidie der Regenerate konnte keine Schlussfolgerung auf das Resistenzverhalten gezogen werden.

Resistent bzw. tolerant verhielten sich sowohl Pflanzen mit dem gleichen DNA-Gehalt wie der resistente Eltern-Genotyp 609 als auch Pflanzen mit höherem DNA-Gehalt.

Die Wirkung der Pelargonien-Inhaltsstoffe wurde ausführlich von LIS-BALCHIN und DEANS (1996, 1997) und von LIS-BALCHIN *et al.* (1998) untersucht. In diesen und weiteren Untersuchungen (SHIN und LIM 2004, ROSATO *et al.* 2007) konnte eine antifungale und antibakterielle Wirkung der Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Eine Pestizidwirkung wurde von MATSUDA *et al.* (1996) beschrieben. Auch in der Medizin (KOŁODZIEJ 2007, 2008), Kosmetik und Parfümindustrie finden die Inhaltsstoffe verschiedener Pelargonien Anwendung. Daher sind die Inhaltsstoffe der Pelargonien durchaus auch von wirtschaftlicher Bedeutung. Wenn durch den Prozess der Fusion und Regeneration eine verstärkte Bildung von Inhaltsstoffen ermöglicht werden kann bzw. neue Substanzen in den Regeneratpflanzen synthetisiert werden, könnte dies in Zukunft für die Medizin und Parfümindustrie eine zusätzliche Bereicherung darstellen.

Für die Charakterisierung der Regeneratpflanzen, waren vor allem die Substanzen interessant, die in beiden Fusionspartnern vorkamen und die, die allein in den Regeneratpflanzen nachgewiesen werden konnten. Neue Substanzen deuteten auf Abweichungen vom ursprünglichen Biosyntheseweg hin. Die Analyse der flüchtigen Inhaltsstoffe wurde mit der Twister Methode (2.6.4) durchgeführt. Diese Technik fand bisher Verwendung in der Nahrungs- und Genußmittelindustrie, der Aroma- und Duftstoffindustrie, der Umweltanalytik von Wasser und Abwasser, der Qualitätskontrolle und in der Spurenanalytik.

Die identifizierten Substanzen (Z-Ocimen, alpha Caryophyllen, Benzoesäure), die sowohl in der Kulturform als auch im Regenerat detektiert wurden, könnten einen Hinweis auf eine mögliche Fusion geben. Bis auf die phänotypische Auswertung deuteten alle verwendeten Untersuchungsmethoden (Durchflusszytometrie, Mikrosatelliten, GISH) allerdings auf eine Homofusion des Wildtyps oder nur auf eine normale Regeneration des Wildtyps hin. Es ist denkbar, dass die Unterschiede im Inhaltsstoffmuster durch die Ploidieveränderungen aufgetreten sind. Ploidieveränderungen sind häufig nicht nur die Ursache für einen veränderten Phänotyp, sondern können auch zu Veränderungen in Bereichen wie der Krankheitsresistenz, der Biomasseproduktion und der Inhaltsstoffkonzentration führen (DHAWAN und LAVANIA 1996, OSBORN *et al.* 2003).

## Diskussion

Chromosomenverdopplungen haben oft Änderungen im Sekundärstoffwechsel zur Folge. Erklärungen für diese Beobachtungen wurden von DHAWAN und LAVANIA (1996) postuliert. Das Verhältnis von Kernmembran und Chromatin ist durch die Verdopplung der Chromosomen geringer als bei Pflanzen ohne Ploidieveränderung. Dadurch wird die Genaktivität gesteigert und dies wiederum beeinflusst den Hormon- und Wasserhaushalt der Pflanze sowie die Photosyntheserate. Damit verbunden ist der Sekundärstoffwechsel der Pflanze, wodurch eine variierte Biosynthese verschiedener Pflanzeninhaltsstoffe bedingt sein kann (DHAWAN und LAVANIA 1996). Weitere Untersuchungen zeigten, dass tetraploide Pflanzen wie *Salvia miltiorrhiza* Bge, *Petunia* Mitchell und *Chamomilla recutita* mehr Flavonoide und Terpenoide pro Gramm Pflanzenmaterial produzierten als ihre diploiden Vergleichspartner (GAO et al. 1996, GRIESBACH und KAMO 1996, ŠVEHLÍKOVÁ und REPČÁK 2000). Auch bei tetraploiden *Artemisia annua* Pflanzen wurde eine Konzentrationserhöhung des gegen Malaria eingesetzten Artemisinin um 38 % gegenüber den diploiden Vergleichspflanzen festgestellt (DE JESUS-GONZALEZ und WEATHERS 2003).

Da die untersuchten Pelargonium-Regenerate mit höherer Ploidie, Veränderungen im Inhaltsstoffmuster in Bezug auf die Ausgangspflanzen aufwiesen, kann abgeleitet werden, dass durch die Ploidieveränderung andere Biosynthesewege aktiviert wurden. Oder quantitative Veränderungen auftraten, so dass mehr DNA von bestimmten Bereichen abgelesen wurde, was sich wiederum auf die Synthesewege/-produkte auswirkte.

Nicht nur die Polyploidisierung auch Stress während des Fusions- und Regenerationsprozesses könnte eine Ursache für Aktivierung neuer Biosynthesewege sein. Aber auch die Aktivierung der sogenannten „silent metabolisms“ könnte als eine Ursache für Veränderungen im Inhaltsstoffmuster angesehen werden. Diese Stoffwechselwege werden zum einen während unterschiedlicher Phasen des Entwicklungsprozesses der Pflanze und zum anderen durch Umwelteinflüsse und genetische Manipulationen aktiviert (LEWINSOHN und GIJZEN 2009). Dadurch kann die Konzentration bestimmter Metabolite deutlich erhöht, aber auch „neue“ Substanzen synthetisiert werden.

## **Ausblick**

Es sind weitere Resistenztestungen nötig um Genotypen zu selektieren, bei denen eine Übertragung der Resistenz eventuell auch durch Einkreuzungen möglich ist.

Des Weiteren sollte an der Erschließung neuer Quellen für die Protoplastengewinnung gearbeitet werden, um effektiver und schneller Pflanzen regenerieren zu können. Bereits im Test befand sich die Gewinnung von Protoplasten aus dem Hypokotyl.

Auch die Fusionstechniken und die Regenerationsprotokolle müssen weiterentwickelt und verbessert werden um eine größere Anzahl Fusionate zu erhalten.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Charakterisierung der Fusionsprodukte. Vor allem bei den phänotypisch auffälligen Pflanzen, ist es von großem Interesse die Ursache für die Veränderungen zu klären.

Wie die Charakterisierung neuer Inhaltsstoffe ist auch die Frage nach der Nutzbarkeit der Inhaltsstoffe zu klären. Eventuell besteht die Möglichkeit Pflanzen mit verändertem Inhaltsstoffmuster für die Produktion ätherischer Öle zu nutzen.

## 5. Zusammenfassung

Die bakterielle Schleimkrankheit hervorgerufen durch *Ralstonia solanacearum*, sowie die bakterielle Pelargonienwelke, verursacht durch *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, sind zwei bedeutende Bakteriosen an Pelargonien. Für beide Krankheiten gibt es keine zugelassenen Bekämpfungsmethoden, so dass diese nur durch Einhalten phytosanitärer Maßnahmen kontrolliert werden können. Vor allem in Jungpflanzenbetrieben verursacht das Auftreten dieser beiden Schaderreger erhebliche finanzielle Einbußen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein breites *Pelargonium*-Sortiment hinsichtlich der Resistenz gegen *X. hortorum* pv. *pelargonii* und *R. solanacearum* zu testen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Es konnten effektive Inokulationsmethoden entwickelt werden, die es ermöglichten reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Von insgesamt 114 getesteten Pelargonien-Genotypen konnten drei Genotypen mit einer Resistenz gegen beide Schaderreger selektiert werden. Das heißt, dass die Pflanzen nach der Inokulation mit dem jeweiligen Erreger keine Symptome zeigten und auch eine Bakterienvermehrung und -ausbreitung in der Pflanze nicht nachgewiesen werden konnte. Erstmals wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Resistenz in Pelargonien gegenüber *Ralstonia solanacearum* nachgewiesen.
2. Die gefundenen Resistenzen sollten anschließend in die anfällige Kultursorte *Pelargonium x hortorum* eingekreuzt werden. Eine Kreuzung zwischen den resistenten Genotypen und *P. x hortorum* konnte – jedoch nach mehreren Versuchen- aufgrund des phylogenetischen Abstands zwischen den einzelnen Genotypen nicht erfolgreich durchgeführt werden. Als Alternative zur natürlichen Kreuzung wurde die Protoplastenfusion verwendet. Hierfür wurden zunächst In-vitro-Kulturen von den resistenten und den anfälligen Ausgangspflanzen angelegt.

3. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl chemische Fusionen mit Hilfe von PEG als auch Elektrofusionen mit *Pelargonium*-Protoplasten durchgeführt.
4. Durch eine Weiterentwicklung des Regenerationssystems für *Pelargonium* konnten erfolgreich Pflanzen aus der Protoplastenfusion regeneriert werden. Insgesamt wurden 320 Regeneratpflanzen aus der In-vitro-Kultur ins Gewächshaus überführt. Davon zeigten 43 Pflanzen phänotypische Auffälligkeiten, 277 Pflanzen konnten vom Phänotyp der Wildform (609) zugeordnet werden.
5. Im Rahmen des Regenerationsprozesses wurden diverse Zusatzstoffe hinsichtlich ihrer fördernden Eigenschaften getestet. Unter anderem wurde die Wirkung von Chitosan unterschiedlicher Herkunft sowie zwei Konzentrationen von Nitroprussid auf die Regeneration geprüft.

Die Regeneratpflanzen wurden ins Gewächshaus überführt und phänotypisch, molekular mit Mikrosatelliten, flowzytometrisch mit GISH sowie anhand des Inhaltsstoffmusters charakterisiert. 13 Pflanzen zeigten phänotypische Auffälligkeiten in der Blattform und -struktur, die auf eine Polyploidisierung des Materials hinweisen. Sechs der auffälligen Regeneratpflanzen wurden verklont und in einem Resistenztest hinsichtlich ihrer Eigenschaften gegenüber *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* getestet. Ein Teil der Pflanzen waren resistent gegen beide Erreger die restlichen Pflanzen wurden als tolerant gegen beide Erreger eingestuft. Im Rahmen der molekularen Untersuchungen wurden bisher Homofusionate des resistenten Genotyps ermittelt. Die untersuchten *Pelargonium*-Regenerate mit höherer Ploidie wiesen des Weiteren Veränderungen im Inhaltsstoffmuster in Bezug zu den Ausgangspflanzen auf.

## 6. Summary

*Pelargonium* is one of the most important ornamental plants in home and garden. Cultivars are propagated vegetatively. The two bacterial pathogens *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Xhp) and *Ralstonia solanacearum* (Rs) cause bacterial wilt and blight and result in high economic losses. The characteristic symptoms of both diseases are wilting leaves. Because the infection pathway for the two pathogens is different, one aim of this study was the development of a reliable inoculation method for both pathogens.

1. The screening methods were developed on plant material provided by Elsner pac® Dresden. 114 species of different sections were tested. Based on this inoculation methods 3 genotypes with resistance against *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Xhp) and *Ralstonia solanacearum* (Rs) were identified.
2. Studies were realized to transfer the resistance, which was detected in a wild species to *P. x hortorum*. As sexuell crossings cannot be achieved protoplast fusions were conducted by developing and adapting respective protocols.
3. The protoplast fusions were realized chemically (with Polyethylenglycol) and electrophysically.
4. As a result 320 plants could be regenerated by improving the protocoll. 43 plants were phenotypically interesting based on their habitus and their leave structure. 277 plants equate the wild type phenotypically.
5. For the regeneration some additives like Chitosan and Nitroprussid were testet in regard to the influence on the growth of the calli.

The regenerated plants were cultivated in the greenhouse and characterized phenotypically, molecularly and with GISH and Flowcytometry.

Besides this, volatile ingredients were determined. Until now all regenerated plants derived from homofusionates of the wild type.



## 7. Literatur

- AIT BARKA EA, EULLAFFROY P, CLEMENT C, VERNET G (2004) Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Rep* 22:608-614
- AL-ATABE JS, MULLIGAN BJ, POWER JB (1990) Interspecific somatic hybrids of *Rudbeckia hirta* and *R. laciniata* (Compositae). *Plant Cell Rep* 8:517-520
- ALBERS F, VAN DER WALT JJA (1984) Untersuchungen zur Karyologie und Mikrosporogenese von *Pelargonium* (Geraniaceae). *Pl Syst Evol* 147:177-188
- ANDERSON AJ (1982) Performed resistance mechanism. In: Mount MS, Lacy GH (Eds) *Phytopathogenic Prokaryotes*. Academic Press, New York Vol 2:119-136
- ARCIONI S, DAVEY MR, SANTOS AVP, COCKING EC (1982) Somatic embryogenesis in tissues from mesophyll and cell suspension protoplasts of *Medicago coerulea* and *M. glutinosa* Z. *Pflanzenphysiol* 106:105-106
- ARAUD-RAZOU I, VASSE J, MONTROZIER H, ETCHEBAR C, TRIGALET A (1998) Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. *Eur J Plant Pathol* 104:795-809
- BAJAJ YPS (1974) Isolation and culture studies on pollen tetrad and pollen mother-cell protoplasts. *Plant Sci Lett* 3:93-99
- BAKKER FT, CULHAM A, DAUGHTREY LC, GIBBY M (1999) A trnL-F based phylogeny for species of *Pelargonium* (Geraniaceae) with small chromosomes. *Plant Syst Evol* 126:309-324
- BAKKER FT, CULHAM A, PANKHURST CE, GIBBY M (2000) Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *Am J Bot* 87:727-734
- BALLVORA A, PIERRE M, VAN DEN ACKERVEKEN G, SCHORNACK S, ROSSIER O, GANAL M, LAHAYA T, BONAS U (2001) Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *AvrBs4* protein. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:629-638
- BARRE P, NOIROT M, LOURAN J, DUPERRAY C, HANNON S (1996) Reliable flow cytometric estimation of Nuclear DNA content in coffee trees. *Cytometry* 24:32-38
- BASAVARAJ SH, SINGH VK, SINGH ATUL, SINGH ASHUTOSH, SINGH ANITA, ANAND D, YADAV S, ELLUR RK, SINGH D, KRISHNAN SG, NAYARAJAN M, MOHAPATRA T, PRABHU KV, SINGH AK (2010) Marker-assisted improvement of bacterial blight resistance in parental lines of Pusa RH 10, a superfine grain aromatic rice hybrid. *Mol Breeding* 26:293-305

## Literatur

- BECHER SA, STEINMETZ K, WEISING K, BOURY S, PELTIER D, RENOU J-P, KAHL G, WOLFF K (2000) Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. Theor Appl Genet 101:643-651
- BENNETT MD, LEITCH IJ (1995) Nuclear DNA amounts in Angiosperms. Ann Bot 76:113-176
- BENTVELSEN GCM, STEMKENS HGW, TJERTES P (1990) Interspecific crosses in *Pelargonium* and the application of embryo rescue methods. Proc Symp Eucarpia, Section Ornamentals, Wageningen:104-109
- BERKELMANN B, WOHANKA W (1993) Was leisten Nachweismethoden? Deutscher Gartenbau 19:1244-1247
- BHOJWANI SS, RADZAN MK (1996) Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Verlag, Amsterdam
- BINDING H (1974) Regeneration von haploiden und diploiden Pflanzen aus Protoplasten von *Petunia hybrida* L.. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 74:327-356
- BINDING H, NEHLS R, KOCK R, FINGER J, MORDHORST G (1981) Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the Dicotyledonae class. Z Pflanzenphysiol 101:119-130
- BONAS U, CONRADSSTRAUCH J, BALBO I (1993) Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific genes *avrBs3*. Mol Gen Genet 238:261-269
- BRADBURY JF (1986) Guide to plant pathogenic bacteria. C. A. B. International, Farnham House, Farnham Royal, Slough SL2 3BN, Großbritannien:159
- BRATHWAITE CWD, DICKEY RS (1970) Synergism between *Pseudomonas caryophylli* and a species of *Corynebacterium*. Phytopathol 60:1046-1051
- BRISSEON LF, TENHAKEN R, LAMB C (1994) Function of oxidative cross linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell 6:1703-1712
- BRÖTHER H (1979) Zur Rolle bakterieller Krankheitserreger an Pelargonien. Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR 33:225-228
- BUCHANAN REGNE (1974) Bergey's manual of determinative Bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore
- CANTEROS B, MINSAVAGE G, BONAS U, PRING D, STALL R (1991) A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. Mol Plant-Microbe Interact 4:628-632

- CHINACHIT W (1991) Die somatische Hybridisierung von hemmstoffresistenten Wildkarotten und Kulturkarotten (*Daucus carota*, L.) und die Charakterisierung der Hybriden. Dissertation Institut für Pflanzenernährung der Justus-Liebig-Universität Gießen:33, 44
- CELLA R, GALUN E (1980) Utilization of irradiated carrot cell suspensions as feeder layer for cultured *Nicotiana* cells and protoplasts. *Plant Sci Lett* 19:243-252
- COCKING EC (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187:962-963
- COLLIN F (2010) Has the revolution arrived? *Nature* 464:674-675
- COLLONIER C, FOCK I, DAUNAY MC, SERVAES A, VEDEL F, SILJAK-YAKOVljeV S, SOUVANNVONG V, SIHACHACKR D (2003) Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium* as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Sci* 164:849-861
- COPLIN DL, COOK D (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 3:271-279
- CORREA-ARAGUNDE N, GRAZIANO M, CHEVALIER C, LAMATTINA L (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J Exp Bot* 57:581-588
- DAMIANI F, PEZZOTTI M, ARCIONI S (1988) Electric field mediated fusion of protoplasts of *Medicago sativa* L. and *Medicago arborea* L. *J Plant Physiol* 132:474-479
- DARLINGTON CD, WYLIE AP (1955) Chromosome atlas of flowering plants. Allen and Urwin Ltd. London
- DAVID A, DAVID H (1979) Isolation and callus formation from cotyledon protoplasts of pine (*Pinus pinasteo*). *Z Pflanzenphysiol* 94:173-178
- DE JESUS-GONZALEZ L, WEATHERS PJ (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep* 21:809-813
- DENIS-PEIXOTO L, CADIC A, RENOJ JP (1997) Interspecific crosses between *Pelargonium x hortorum* and *P. quinquelobatum* using embryo rescue and molecular characterization of hybrids by an endogenous *chs* probe. *Plant Breeding* 116:177-180
- DENNY T, CARNEY B, SCHELL M (1990) Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Mol Plant Microbe Interact* 3:293-300

## Literatur

- DHAWAN OP, LAVANIA UC (1996) Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica* 87:81-89
- DOLEŽEL J, BARTOŠ J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot* 95:99-110
- DORION N, JOUIRA HB, GALLARD A, HASSANEIN A, NASSOUR M, GRAPIN A (2010) Methods for In vitro propagation of *Pelargonium x hortorum* and others: From meristems to protoplasts. In: Jain SM, Ochatt SJ (eds), *Protocols for In vitro propagation of ornamental plants*, *Methods in Molecular Biology* 589:197-211
- DUNBAR KB, STEPHENS CT (1991) Plant-regeneration from callus derived protoplasts of *Pelargonium x domesticum*. *Plant Cell Rep* 10:417-420
- ENGEL, J; POSCHENRIEDER, G; RICHTER, K (2008) „Ermittlung der Virulenz von *Ralstonia solanacearum* – Isolate an *Pelargonium*“ Poster 084, 56. Deutsche Pflanzenschutztagung
- ELSNER W, LOESER H, BIERMANN W (1995) *Gärtner-Handbuch Pelargonien*. Haymarket Media
- EPPO Bulletin (2004) *Ralstonia solanacearum* 34:173-178
- ETTEN VAN HD, MANSFIELD JW, BAILEY JA, FARMER EE (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell* 6:1191-1192
- EVANS DA, COCKING EC (1977) Isolated plant protoplasts. In: Street HE, *Plant Cell Tiss Org*:187
- EVANS DE, COLEMAN JOD, KEARNS A (2003) *Plant cell culture*. BIOS Scientific Publishers:18
- FELIX G; DURAN D, VOLKO S, BOLLER T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18:265-276
- FEUILLET L, LEACH JE, ROGERS J, SCHNABLE PS, EVERSOLE K (2011) Crop genomes sequencing: Lessons and nationales. *Trends in Pl Sci* 16:77-88
- FICKE W (1989) Aufgaben und Ziele der Resistenzzüchtung. In: Kleinhempel H, Naumann K, Spaar D (Eds): *Bakterielle Erkrankungen der Kulturpflanzen*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena:239-244
- FLAHERTY JE, HARBAUG BK, JONES JB, SOMODI GC, JACKSON LE (2001) H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of Geranium. *Hortscience* 36:98-100

- FOYER CH, DESCOURVIERS P, KUNERT KJ (1994) Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism in transgenic plants. *Plant Cell Environ* 17:507-523
- GAO SL, ZHU DN, CAI ZH, XU DR (1996) Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 47:73-77
- GARCIA-BRUGGER A, LAMOTTE O, VANDELLE E, BOURQUE S, LECOURIEUX D, POINSSOT B, WENDEHENNE D, PUGIN A (2006) Early signalling events induced by elicitor of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 19:711-724
- GILMOUR DM, DAVEY MR, COCKING EC (1989) Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. *Plant Cell Rep* 8:29-32
- GLEBA YY, HINNISDAELS S, SIDOROV VA, KALEDA VA, PAROKONNY AS, BORYSHUK NV, CHEREP NN, NEGRUTIU I, JACOBS M (1988) Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by "gamma fusion". *Theor Appl Genet* 76:760-766
- GLICK DL, COFFEY CM, SULZINSKI MA (2002) Simultaneous PCR detection of the two major bacterial pathogens of Geranium. *J Phytopathol* 150:54-59
- GLIMELIUS K (1984) High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts of some *Brassicaceae*. *Physiol Plantarum* 61:38-44
- GODWIN JD, SANGDUEN N, KUNANUVATCHAIDACH R, PIPERIDES G, ADKINS SW (1997) RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. *indica*) somaclonal progenies. *Plant Cell Rep* 16:320-324
- GOSTI F, HUANG Y, SEQUEIRA L (1991) Molecular analysis of a gene that effects extracellular polysaccharide production and virulence in *Pseudomonas solanacearum*. In: HENNECKE HuDPS, Verma (eds) Proceedings of the 5th international symposium on the molecular genetics of plant-microbe interactions. Kluwer Academic Publishers
- GREPLOVÁ M, POLZEROVÁ H, VLASTNIKOVÁ H (2008) Electrofusion from *Solanum tuberosum*, *S. bulbocastanum* and *S. pinnatisectum*. *Acta Physiol Plant* 30:787-796
- GRIESBACH E, OLBRICHT K (2002) Resistance to *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* in the genus *Pelargonium*. *J Plant Dis Protect* 109:553-568
- GRIESBACH E, TYRACH A, OLBRICHT K (1999) Resistenz bei *Pelargonium*-Arten und Hybriden gegen *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 46:285-292

## Literatur

- GRIESBACH RJ, KAMO KK (1996) The effect of induced polyploidy on the flavonoids of *Petunia* Mitchell. *Phytochemistry* 42:361-363
- GRIMES HD, BOSS WF (1985) Intercellular calcium and calmodulin involvement in protoplast. *Plant Physiol* 79:253-258
- GROSSE JE, GARRETT ME (1963) Observations on lysogeny in plant pathogens *Pseudomonas morsprunorum* and *Ps. syringae*. *J Appl Bacteriol* 26:27-34
- GUAN QZ, GUO YH, WEI YX, MENG TZ, ZHANG ZX (2010) Regeneration of somatic hybrids of ginger via chemical protoplast fusion. *Plant Cell Tis Org* 102:279-284
- HAHN MG, DARVILL AG, ALBERSHEIM P (1991) Host-pathogen interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol* 68:1161-1169
- HAN X, YANG H, DUAN K, ZHANG X, ZHAOH, YOU S, JIANG Q (2008) Sodium nitroprusside promotes multiplication and regeneration of *Malus hupehensis* in vitro plantlets. *Plant Cell Tis Org* 96:29-34
- HASSANEIN A, DORION N (2005) Efficient plant regeneration system from leaf discs of zonal (*Pelargonium x hortorum*) and two scented (*P. capitatum* and *P. graveolens*) geraniums. *Plant Cell Tis Org* 83:231-240
- HASSANEIN A, DORION N (2006) High efficiency colony formation and whole plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Pelargonium x hortorum* 'Panaché Sud'. *J Hortic Sci Biotech* 81:714-720
- HASSANEIN A, HAMAMA L, LORIDON K, DORION N (2009) Direct gene transfer study and transgenic plant regeneration after electroporation into mesophyll protoplasts of *Pelargonium x hortorum*, 'Panaché Sud'. *Plant Cell Rep* 28:1521-1530
- HAYWARD AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann Rev Phytopath* 29:65-87
- HIROCHIKA H, SUGIMOTO K, OTSUKI Y, TSUGAWA H, KANDA M (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7783-7788
- HOCK B, ELSTNER EF (1995) *Schadwirkung auf Pflanzen : Lehrbuch der Pflanzentoxikologie*. 3.Aufl. Spektrum Akad Verl., Heidelberg
- HORN W (1994) Interspecific crossability and inheritance in *Pelargonium*. *Plant Breed* 113:3-17
- HUANG S ET AL. (2008) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat Genet* 41:1275-1281

- JAILLON O (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-467
- JIANG N, BAO Z, ZHANG X, HIROCHIKA H, EDDY SR, MCCOUCH SR, WESSLER SR (2003) An active DNA transposon family in rice. *Nature* 421:163-167
- JONES CJ, EDWARDS KJ, CASTIGLIONE S, WINFIELD MO, SALA F, VAN DE WEIL C, BREDEMEIJER G, VOSMAN B, MATTHES M, DAILY A, BRETTSCHEIDER R, BETTINI P, BUIATTI M, MAESTRI E, MALCEVSKIL A, MARMIROLI N, AERT R, VOLCKAERT G, RUEDA J, LINACERO R, VAZQUEZ A, KARP A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR marker in plants by a network of European laboratories. *Mol Breeding* 3:381-390
- JONES JD, DANGL JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329
- JORDI J (2008) Bekämpfung der Pflanzenkrankheit Feuerbrand. Eidgenössisches Volkswirtschaftsdepartement EVD Schweiz, Bundesamt für Landwirtschaft [www.swisscofel.ch/uploads/tx\\_frpnewsandinfos/Dossier\\_BLW\\_29.01.2008.pdf](http://www.swisscofel.ch/uploads/tx_frpnewsandinfos/Dossier_BLW_29.01.2008.pdf)
- KAHN MA, DUFFY B, GESSLER C, PATOCCHI A (2006) QTL mapping of fire blight resistance in apple. *Mol Breeding* 17:299-306
- KAMEYA T (1975) Culture of protoplasts from chimera plant tissue nature. *Jpn J Genet* 50:417-420
- KAO KN, GAMBORG OL, MILLER RA, KELLER WA (1971) Cell division in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature New Biol* 232:124-125
- KAO KN, MICHAYLUK MR (1974) A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115:355-367
- KAO CC, SEQUEIRA L (1991) A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* 173:7841-7847
- KELLER WA, MELCHERS G (1973) The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Zeitung für Naturforschung* 28c:737-741
- KENNEDY BW, PFLEGER FL, DENNY R (1987) Bacterial leaf and stem rot of geranium in Minnesota. *Plant Dis* 71:821-823
- KESKITALO M (2001) Can protoplast production from in vitro cultured shoots of *Tanacetum* vary during the seasons? *Agr Food Sci Finland* 10:145-151

## Literatur

- KIVILAAN A, SCHEFFER RP (1958) Factors affecting development of bacterial stem rot of *Pelargonium*. *Phytopathol* 48:185-191
- KLEINHEMPEL H, NAUMANN K, SPAAR D (1989) Bakterielle Erkrankungen der Kulturpflanzen. Gustav Fischer Verlag Jena,
- KOLBERZ Z, BARTHA B, ERDEI L (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J Plant Physiol* 165:967-975
- KOLODZIEJ H, KAYSER O, GUTMANN M (1995) Arzneilich verwendete Pelargonien aus Südafrika. *Deutsche Apotheker Zeitung* 10:853-864
- KOLODZIEJ H (2007) Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo. *Phytomedicine* 14:9-17
- KOLODZIEJ H (2008) Aqueous ethanolic extract of the roots of *Pelargonium sidoides* - new scientific evidence for an old anti-infective phytopharmaceutical. *Planta Med* 74:661
- KOMATSU M, SHIMAMOTO K, KYOZUKA J (2003) Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice LINE-type retrotransposon Karma. *Plant Cell* 15:1934-1944
- KREBS EK (1992) *Xanthomonas* - wichtigster Schaderreger an *Pelargonium*. *GbGw* 37:1803-1805
- LAGERCRANTZ U, ELLEGRENN H, ANDERSON L (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res* 21:1111-1115
- LARKIN PJ, SCOWCROFT WR (1981) Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197-214
- LAVERMICOCCA P, LONIGRO SL, VALERIO F, EVIDENTE A, VISCONTI A (2002) Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. *Appl Environ Microbiol* 68:1403-1407
- LEQUET F (1888) La maladie des *Pelargonium zonale et inquinans* hybrides. *Rev Hortic* 60:166-168
- LEWINSOHN E, GIJZEN M (2009) Phytochemical diversity: The sound of silent metabolism. *Plant Sci* 176:161-169
- L'HÉRITIER, DE BRUTELLE CL (1792) *Geraniologia*



- LI R, BRUNEAU AH, QU R (2010) Tissue culture-induced morphological somaclonal variation in St. Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt) Kuntze]. *Plant Breeding* 129:96-99
- LIBOUREL IGL, BETHKE PC, DE MICHELE R, JONES RL (2005) Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta* 223:813-820
- LIS-BALCHIN M, BUCHBAUER G, RIBISCH K, WENGER MT (1998) Comparative antibacterial effects of novel *Pelargonium* essential oils and solvent extracts. *Lett Appl Microbiol* 27:135-141
- LIS BALCHIN M, DEANS SG (1996) Antimicrobial effects of hydrophilic extracts of *Pelargonium* species (Geraniaceae). *Lett Appl Microbiol* 23:205-207
- LIS-BALCHIN M, DEANS SG (1997) Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 82:759-762
- LIU J, XU X, DENG X (2005) Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell Tiss Org* 82:19-44
- LOMBARDO MC, GRAZIANO M, POLACCO J, LAMATTINA L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* 1:28-33
- LÖRZ H, LARKIN PJ, THOMSON J, SCOWCROFT WR (1983) Improved protoplast culture and agarose media. *Plant Cell Tiss Org* 2:217-226
- MATSUDA BM, SURGEONER GA, HEAL JD, TUCKER AO, MACIARELLO MJ (1996) Essential oil analysis and field evaluation of the citrosa plant "*Pelargonium citrosum*" as a repellent against populations of *Aedes mosquitoes*. *J Am Mosquito Contr* 12:69-74
- MAY R, VÖLKSCH B, KAMPMANN G (1997) Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in vitro and in planta. *Microb Ecol* 34:118-124
- MELCHERS G, SACRISTAN MD, HOLDER AA (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res Comm* 43:203-218
- MENCZEL L, NAGY F, KISS ZR, MALIGA P (1981) Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor Appl Genet* 59:191-195
- MEYER Y (1974) Isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts using a saline medium. *Protoplasma* 81:363-372

## Literatur

- MICHAELSON MJ, PRICE HJ, ELLISON JR, JOHNSTON JS (1991a) Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *Am J Bot* 78:183-188
- MIZUHIRO M, ITO K, MII M (2001) Production and characterization of interspecific somatic hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*. *Plant Sci* 167:489-496
- MOLTMANN E, POSCHRIEDER G (2001) Welke an Pelargonien *Deutscher GB* 55:40-42
- MOREL G, WETMORE RH (1951) Tissue culture of monocotyledons. *An J Bot* 38:141-143
- MÜLLER P, BRIELMAIER-LIEBETANZ U (2007) Nationale Leitlinien über Maßnahmen zur Verhinderung eines Befalls mit *Ralstonia solanacearum* bei der Kultur von Pelargonien. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 59:101-106
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 57:35-41
- NAGATA T, TAKEBE I (1971) Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99:12-20
- NAMETH ST, DAUGHTREY ML, MOORMAN GW, SULZINSKI MA (1999) Bacterial blight of Geranium: A history of diagnostic challenges. *Plant Dis* 83:204-212
- NASSOUR M, DORION N (2002) Plant regeneration from protoplasts of micropropagated *Pelargonium x hortorum* Alain: effect of some environmental and medium factors on protoplast system efficiency. *Plant Sci* 163:169-176
- NASSOUR M, DORION N (2003) Somatic hybridisation between *Pelargonium x hortorum* and *P. x domesticum* towards resistance to *Xanthomonas pelargonii*. *Acta Hort* 612:75-81
- NEILL SJ, DESIKAN R, CLARKE A, HURST RD, HANCOCK JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53:1237-1247
- NGE KL, NWE N, CHANDRKRACHANG S, STEVENS WF (2006) Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Sci* 170:1185-1190
- NITSCH JP, NITSCH C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87
- NÜRNBERGER T, BRUNNER F (2002) Innate immunity in plants and animals emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* 5:318-324
- NÜRNBERGER T, SCHELL D (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* 6:372-379

- O'CONNELL MA, HANSON MR (1987) Regeneration of somatic plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon penellii*. *Theor Appl Genet* 75:83-89
- OH MH, CHOI DW, KWON YM, KIM SG (1995) An assessment of cytological stability in protoplast cultures of tetraploid *Petunia hybrida*. *Plant Cell Tiss Org* 41:243-248
- OH MH, KIM SG (1994) Plant regeneration from petal protoplast culture of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Tiss Org* 36:275-283
- OLIVARES-FUSTER O, DURAN-VILA N, NAVARRO L (2005) Electrochemical protoplast fusion in citrus. *Plant Cell Rep* 24:112-119
- OSBORN TC, PIRES JC BIRCHLER JA, AUGER DL, CHEN ZJ, LEE H-S, COMAI L, MADLUNG A, DOERGE RW COLOT V, MARTIENSSEN RA (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet* 19:141-147
- PAGNUSSAT GC, LANTERI ML, LAMATTINA L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* 132:1241-1248
- PAGNUSSAT GC, SIMONTACCHII M, PUNTARULA S, LAMATTINA L (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* 129:954-956
- PARET ML, CABOS R, KRATKY BA, ALVAREZ AM (2010) Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* Race 4 and bacterial wilt of edible Ginger. *Plant Dis* 94:521-527
- PAUX E, SOURDILLE P, SALSE J, SAINTENAC C, CHOLET F, LEROY P, KOROL A, MICHALAK M, KIANIAN S, SPIELMEYER W, LAGUDAH E, SOMERS D, KILIAN A, ALAUX M, VAUTRIN S, BERGES H, EVERSOLE K, APPELS R, SAFAR J, SINKOVA H, DOLEZEL J, BERNARD M, FEUILLET C (2008) A physical map of the 1-Gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* 322:101-104
- PEHU E, KARP A, MOORE K, STEELE S, DUNCKLEY R, JONES MGK (1989) Molecular, cytogenic and morphological characterization of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens*. *Theor Appl Genet* 78:696-704
- PODWYSZYNSKA M, OLSZEWSKI T (1995) Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by in vitro culture of rose, cordyline and homalomena. *Sci Hortic - Amsterdam* 64:77-84
- POIRIER-HAMON S, RAO PS, HARADA H (1974) Culture of mesophyll protoplasts and stem segments of *Antirrhinum majus* (Snapdragon), Growth and organization of embryoids. *J Exptl Bot* 25:752-760

## Literatur

- POREBSKI S, BAILEY LG, BAUM BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. *Plant Mol Biol Rep* 15:8-15
- PORNPIENPAKDEE P, SINGHASURASAK R, CHAIYASAP P, PICHYANGKURA R, BUNJONGRAT R, CHACHAWAN S, LIMPANAVECH P (2010) Improving the micropropagation of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. *Sci Hortic* 124:490-499
- RATHORE KS, GOLDSWORTHY A (1985 a) Electrical control of shoot regeneration in plant tissue cultures. *Nat Biotechnol* 3:1107-1109
- RATHORE KS, GOLDSWORTHY A (1985 b) Electrical control of growth in plant tissue cultures. *Nat Biotechnol* 3:253-254
- RECH EL, OCHATT SJ, CHAND PK, POWER JB, DAVEY MR (1987) Electro-enhancement of division of plant protoplast-derived cells. *Protoplasma* 141:169-176
- REUTHER G (1982) Gewebekultur Die Vermehrung von Pelargonienmutterpflanzen. *Gärtnerbörse und Gartenwelt* 32:727-734
- RIEDEL M, KECK M (1992) In vitro Versuche zur Bekämpfung der bakteriellen Pelargonienwelke (*Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*). *Pflanzenschutzberichte* 53:51-59
- RYSCHKA U (2007) Entwicklung geeigneter Methoden zur somatischen Hybridisierung von *Pelargonium* als Voraussetzung für die Erschließung neuer genetischer Ressourcen. Abschlussbericht zum Forschungsprojekt BAZ-1169
- ROBICHON MP, RENOU J-P, JALOUZOT R (1997) Plant regeneration of ivy leaved geranium through shoot organogenesis. *Plant Cell Tiss Org* 49:209-212
- ROMANTSCHUK M (1992) Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Ann Rev Phytopath* 30:225-243
- ROSATO A, VITALI C, DE LAURENTIS N, ARMENISE D, MILILLO MA (2007) Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* 14:727-732
- SANDER E, WINKLER I (1981) Nachweis von *Xanthomonas pelargonii* mit dem ELISA. *Mittlg BBA* 203:122
- SCHAAD WN, VIDAVER AK, LACY GH, RUDOLPH K, JONES JB (2000) Evaluation of proposed amended names of several Pseudomonads and Xanthomonads and recommendations. *Phytopathol* 90:208-213
- SCHAFFER WH, GOODMAN RN (1985) Appearance of Streptomycin resistant *Erwinia amylovora* in Missouri apple orchards. *Phytopathol* 75:1281

- SHELL MA (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory array. *Ann Rev Phytopathol* 38:263-292
- SCHOLZ M, RUGE-WEHLING B, HABEKUß A, SCHRADER O, PENDINA G, FISCHER K, WEHLING P (2009) Ryd4Hb: a novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the *barley yellow dwarf virus*. *Theor Appl Genet* 119:837-849
- SERRAF I, SIHACHAKR D, DUCREUX G, BROWN SC, ALLOT M, BARGHI N, ROSSIGNOL L (1991) Interspecific somatic hybridisation in potato by protoplast electrofusion. *Plant Sci* 76:115-126
- SHIN S, LIM S (2004) Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton spp.* *J Appl Microbiol* 97:1289-1296
- SINHA A, CALIGARI PDS (2005) Enhanced protoplast division by encapsulation in droplets: An advance towards somatic hybridisation in recalcitrant white lupin. *Ann Appl Biol* 146:441-448
- SKROCH P, NIENHUIS J (1995) Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor Appl Genet* 91:1086-1091
- STONE GE, SMITH RE (1898) A disease of the cultivated Geranium. *Mass Agric Exp Stn Annu Rep Bot* 19:164
- SULZINSKI MA, MOORMAN GW, SCHLAGNHAUFER B, ROMAINE CP (1996) Characteristics of a PCR-based assay for in planta detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*. *J Phytopathol* 144:393-398
- SUNDBERG E, GLIMELIUS K (1986) A method for production of interspecific hybrids within Brassicaceae via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Sci* 43:155-163
- SVEHLÍKOVÁ V, REPČÁK M (2000) Variation of apigenin quantity in diploid and tetraploid *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Plant Biol* 2:403-407
- SZCZERBAKOVA A, MACIEJEWSKA U, ZIMNOCH-GUZOWSKA E, WIEGALT B (2002) Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity. *Plant Cell Rep* 21:577-584
- TEMPELAAR MJ, JONES MGK (1974) Directed electrofusion between protoplasts with different responses in a mass fusion system. *Plant Cell Rep* 4:92-95

## Literatur

- TERADA K, YAMASHITA Y, NISHIBAYASHI S, SHIMAMOTO K, (1987) Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *Theor Appl Genet* 76:379-384
- TEWARI RK, KIM SY, HAHN EJ, PAEK KY (2008) Involvement of nitric oxide-induced NADPH oxidase in adventitious root growth and antioxidant defense in *Panax ginseng*. *Plant Biotech Rep* 2:113-122
- THIEM B, SLIWINSKA E (2003) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L) *in vitro* cultures. *Plant Sci* 164:129-134
- TORIYAMA K, HINATA K (1988) Diploid somatic-hybrid plants regenerated from rice cultivars. *Theor Appl Genet* 76:665-668
- TSUJIMOTO S, NAKAHO K, ADACHI M, OHNISHI K, KIBA A, HIKICHI Y (2008) Contribution of the type II secretion system in systemic infectivity of *Ralstonia solanacearum* through xylem vessels. *J Gen Plant Pathol* 74:71-75
- TUN NN, LIVAJA M, KIEBER JJ, SCHERER GFE (2008) Zestatin induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component genes. *New Phytol* 178:515-531
- UTHAIRATANAKIJ A, TEIXEIRA DA SILVA JA, OBSUWAN K (2007) Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Sci Biotechnol* 1:1-5
- VASSE J, FREY P, TRIGALET A (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 8:241-251
- VAUTERIN L, HOSTE B, KERSTER K, SWINGS J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 45: 472-489
- VORWERK S, SOMERVILLE E S, SOMERVILLE C (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* 9:203-209
- VÖLKSCH B, MAY R (2001) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. *Microb Ecol* 41:132-139
- WAARA S, WALLIN A, ERIKSON T (1991) Production and analysis of intraspecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci* 75:107-115
- WAGENITZ G (1996) Wörterbuch der Botanik: Morphologie, Anatomie, Taxonomie. Gustav Fischer Verlag Jena S. 198f
- WIDHOLM JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47:189-194

- XU J, YIN H, WANG W, MI Q, LIU X (2009) Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea opposita*. *Plant Growth Regul* 59:279-285
- YANG XY, ZHANG XI, SHUANG J (2007) Production and characterization of asymmetric hybrids between upland cotton Coker 201 (*Cossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss). *Plant Cell Tiss Org* 89:225-235
- YE GN, EARLE D (1991) Effect of cellulase on spontaneous fusion of maize protoplasts. *Plant Cell Rep* 10:213-216
- YOKOYA K, ROBERTS AV, MOTTLEY J, LEWIS R, BRANDHAM PE (2000) Nuclear DNA amounts roses. *Ann Bot* 85:557-561
- ZHARKITH A, TROGGIO M, PRUSS D, CESTARO A, ELDRDGE G, PINDO M, MITCHELL JT, VEZZULLI S, BHATNAGAR S, FONTANA P, VIOLA R, GUTIN A, SALAMINI F, SKOLNICK M, VELASCO R (2008) Sequencing and assembly of highly heterozygous genome of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir. Problems and solutions. *J Biotechnol* 136:38-43
- ZIEDLER D, ZÄHRINGER U, GERBER I, DUBERY I, HARTUNG T, BORS W, HUTZLER P, DUMER I (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15811-15816
- ZIMMERMANN U, STOPPER H (1987) Elektrofusion und Elektropermeabilisierung von Zellen. *Physik in unserer Zeit* 18:169-177

## 8. Anhang

Tab. 8.1: Medien für die In-vitro-Kultivierung von Pelargonien modifiziert nach REUTHER (1982)

Bestandteil	KAD 0
<b>Makroverbindungen</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Duchefa)	1,5
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Duchefa)	1,5
Kaliumnitrat, $\text{KNO}_3$ (Duchefa)	25,0
Ammoniumnitrat, $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (Duchefa)	21,0
Calciumchlorid, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Serva)	3,0
<b>Mikroverbindungen (Sigma)</b>	<b><math>\mu\text{M}</math></b>
Borsäure, $\text{H}_3\text{BO}_3$	100,00
Mangansulfat, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1000,00
Eisensulfat, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	100,00
Natrium EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2\text{H}_2\text{O}$	130,00
Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	29,91
Natriummolybdat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,03
Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,10
Cobaltchlorid, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,10
Kaliumiodid, KJ	5,00
<b>Vitamine (NITSCH und NITSCH 1969 modif)</b>	<b><math>\mu\text{M}</math></b>
d-Biotin, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (Serva)	0,21
Folsäure, $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$ (Serva)	1,13
Glycin, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (Roth)	13,32
myo-Inosit, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Serva)	560,00
Nicotinsäure, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ (Serva)	40,62
Pyridoxin HCl, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{HCl}$ (Serva)	2,40
Thiamin HCl, $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OSHCl}$ (Serva)	1,40
Saccharose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (Duchefa)	88 mM
Agar (Difco)	9 g
pH-Wert 5.8 - 5.9	



Hormone	KAD 1 Konz [ $\mu$ M]	KAD 2 Konz [ $\mu$ M]	KAD 3 Konz [ $\mu$ M]
Indolessigsäure (IAA), $C_{10}H_9NO_2$ (Serva)	5,71	2,85	2,85
6-Benzylaminopurin (BAP), $C_{12}H_{11}N_5$ (Duchefa)	0,44	0,44	-
6-( $\gamma$ -Dimethylallylamino)purin (2-ip), $C_{10}H_{13}N_5$ (Duchefa)	0,49	0,49	-

Tab. 8.2.1: Medium zur Kallusinduktion für Suspensionskulturen (P-Sus 1)

P-Sus 1 Medium	
Reagenz (Hersteller)	Konzentration
MS Makrosalze 1/2 (Duchefa)	mM
Kaliumhydrogenphosphat, $KH_2PO_4$	0,62
Magnesiumsulfat, $MgSO_4$	0,75
Kaliumnitrat, $KNO_3$	9,40
Ammoniumnitrat, $NH_4NO_3$	10,30
Calciumchlorid, $CaCl_2$	1,50
MS Mikrosalze (Duchefa)	$\mu$ M
Borsäure, $H_3BO_3$	100,27
Mangansulfat, $MnSO_4 \times H_2O$	100,00
Natrium-Eisen(III) EDTA, $C_{10}H_{12}O_8N_2FeNa \times 3H_2O$	100,00
Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7H_2O$	29,91
Natriummolybdat, $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	1,03
Kupfersulfat, $CuSO_4 \times 5H_2O$	0,10
Cobaltchlorid, $CoCl_2 \times 6H_2O$	0,11
Kaliumiod, KI	5,00
Vitamine (Morel und Wetmore, 1951)	$\mu$ M
Thiamin HCl, $C_{12}H_{17}N_4OS \text{ HCl}$ (Serva)	2,96
myo-Inosit, $C_6H_{12}O_6$ (Serva)	554,94
Pyridoxin HCL, $C_8H_{11}NO_3 \text{ HCL}$ (Serva)	4,86
Calciumpantothenat, $C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$ (Duchefa)	2,10
d-Biotin, $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ (Serva)	0,04
Nicotinsäure, $C_6H_5NO_2$ (Serva)	8,12
	M
Saccharose	0,09
	$\mu$ M
1-Naphthalennessigsäure (NAA), $C_{12}H_{10}O_6$ (Serva)	21,50
Thidiazuron (TDZ) $C_9H_8N_4OS$ (Riedel de Haen)	0,41
pH-Wert 5.8	

Tab. 8.2.2: Medien für die Pelargoniumsuspensionsmedien

	TA-Medium	P-Sus 2 Medium
Reagenz (Hersteller)	Konzentration	Konzentration
MS Makro- und Mikrosalze (Duchefa)	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
Calciumchlorid, $\text{CaCl}_2$	2990,00	2990
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1250,00	1250
Kaliumnitrat, $\text{KNO}_3$	18790,00	18790
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4$	1500,00	1500
Ammoniumnitrat, $\text{NH}_4\text{NO}_3$	20610,00	20610
Cobaltchlorid, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,11	0,11
Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,10	0,1
Natrium-Eisen(III) EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_2\text{FeNa} \times 3\text{H}_2\text{O}$	100,00	100
Borsäure, $\text{H}_3\text{BO}_3$	100,00	100
Kaliumiodid, KI	5,00	5
Mangansulfat, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	100,00	100
Natriummolybdat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,03	1,03
Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	29,91	29,91
Vitamine (MURASHIGE und SKOOG 1962)	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
Glycin, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (Roth)	26,64	26,64
myo-Inosit, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Serva)	554,94	554,94
Nicotinsäure, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ (Serva)	4,06	4,06
Pyridoxin HCl, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{HCL}$ (Serva)	2,43	2,43
Thiamin HCl, $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OSHCL}$ (Serva)	0,30	0,30
	M	M
Saccharose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (Duchefa)	0,10	0,09
	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
Ascorbinsäure, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (Serva)	-	284
Citronensäure, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (Duchefa)	-	238
6-Benzylaminopurin (BAP), $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$ (Duchefa)	-	2
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$ (Serva)	4,53	10
	pH-Wert 5.7	pH-Wert 5.6

Tab. 8.3: Protoplastenkulturmedien

	PPM 1	PPM 2	PPM 3*
Reagenz (Hersteller)	Konzentration	Konzentration	Konzentration
MS Makrosalze (Sigma)	mM	mM	mM
Kaliumhydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,31	0,31	0,31
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4$	0,38	0,38	0,38
Kaliumnitrat, $\text{KNO}_3$	4,70	4,70	4,70
Ammoniumnitrat, $\text{NH}_4\text{NO}_3$	5,20	5,20	5,20
Calciumchlorid, $\text{CaCl}_2$	0,75	0,75	0,75
MS Mikrosalze (Sigma)	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
Borsäure, $\text{H}_3\text{BO}_3$	100,27	100,27	100,27
Mangansulfat, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	100,00	100,00	100,00
Eisensulfat, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	100,00	100,00	100,00
Natrium EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2\text{H}_2\text{O}$	130,00	130,00	130,00
Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	29,91	29,91	29,91
Natriummolybdat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,03	1,03	1,03
Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,10	0,10	0,10
Cobaltchlorid, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,11	0,11	0,11
Kaliumjodid, KI	5,00	5,00	5,00
Vitamine (MOREL und WETMORE, 1951)	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
Thiamin HCl, $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS HCl}$ (Serva)	2,9	2,9	2,9
myo-Inosit, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Serva)	560	560	560
Pyridoxin HCl, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \text{HCl}$ (Serva)	4,86	4,86	4,86
Calciumpantothenat, $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{CaN}_2\text{O}_{10}$ (Duchefa)	2,00	2,00	2,00
d-Biotin, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (Serva)	0,04	0,04	0,04
Nicotinsäure, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ (Serva)	8,00	8,00	8,00
	mM	mM	mM
Saccharose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (Duchefa)	15,00	876,00	90,00
Mannit, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ (Duchefa)	520,00	384,00	270,00
PVP 10, $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$ (Duchefa)	500,00	500,00	500,00
MES, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ (Serva)	3,50	3,50	3,50
Glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Duchefa)	-	-	160,00

## Anhang

Phytigel (Sigma)	-	-	2 g/l
	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
1-Naphthalenessigsäure (NAA), $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_6$ (Serva)	5,37	5,37	-
Indolessigsäure (IAA), $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ (Serva)	-	-	0,20
6-Benzylaminopurin (BAP), $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$ (Duchefa)	2,22	4,40	2,22

pH-Wert 5.8

Tab. 8.4: Protoplastenregenerationsmedium (PRM 10)

Bestandteil	Konzentration
MS 1/2 Makro- und Mikrosalze (Duchefa)	$\mu\text{M}$
Calciumchlorid, $\text{CaCl}_2$	1500,00
Kaliumhydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	630,00
Kaliumnitrat, $\text{KNO}_3$	9400,00
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4$	730,00
Ammoniumnitrat, $\text{NH}_4\text{NO}_3$	10300,00
Cobaltchlorid, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,11
Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,10
Natrium-Eisen(III)- EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_2\text{FeNa} \times 3\text{H}_2\text{O}$	100,00
Borsäure, $\text{H}_3\text{BO}_3$	100,00
Kaliumjodid, KI	5,00
Mangansulfat, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	100,00
Natriummolybdat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,03
Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	29,91
Vitamine (MOREL und WETMORE 1951)	$\mu\text{M}$
Thiamin HCl, $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS HCl}$ (Serva)	2,90
myo-Inosit, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Serva)	560,00
Pyridoxin HCL, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{HCl}$ (Serva)	4,86
Calciumpantothenat, $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5$ (Duchefa)	2,00
d-Biotin, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (Serva)	0,04
Nicotinsäure, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ (Serva)	8,00

	mM
Saccharose, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (Duchefa)	87,60
PVP 10, (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) <sub>n</sub> (Duchefa)	50,00
MES, C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S (Serva)	3,5
Mannit, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	137,00
Glucose, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	74,40
Phytigel (Sigma)	2 g/l

	μM
6-Benzylaminopurin (BAP), C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> (Duchefa)	0,44
6-(γγ-Dimethylallylamino)purin (2-ip), C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> (Duchefa)	0,49
Indolessigsäure (IAA), C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> (Serva)	0,57

pH-Wert 5.8

Tab. 8.5: Sprossverlängerungsmedium (PMSV)

Bestandteil	Konzentration
MS Makro- und Mikrosalze (Duchefa)	µM
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	2990,00
Kaliumdihydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1250,00
Kaliumnitrat, KNO <sub>3</sub>	18790,00
Magnesiumsulfat, MgSO <sub>4</sub>	1500,00
Ammoniumnitrat, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20610,00
Cobaltchlorid, CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,11
Kupfersulfat, CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,10
Natrium-Eisen(III)- EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> FeNa x 3H <sub>2</sub> O	100,00
Borsäure, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100,00
Kaliumiodid, KI	5,00
Mangansulfat, MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	100,00
Natriummolybdat, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,03
Zinksulfat, ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	29,91
Vitamine (NITSCH und NITSCH 1969, modifiziert)	µM
d-Biotin, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S (Serva)	0,21
Folsäure, C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> (Serva)	1,13
Glycin, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> (Roth)	13,32
myo-Inositol, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (Serva)	560,00
Nicotinsäure, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> (Serva)	40,62
Pyridoxin HCl, C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> HCl (Serva)	2,43
Thiamin HCl, C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OSHCl (Serva)	1,48
	M
Saccharose, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (Duchefa)	0,09
Phytigel (Sigma)	3 g/l
	µM
Indolessigsäure (IAA), C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> (Serva)	5,71
Kinetin, C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O (Ferak Berlin)	4,60
pH-Wert 5.5	

## 8.6 Lösungen und Enzyme für die Protoplastenisolierung und –fusion

Tab. 8.6.1: TVL-Lösung (GLIMELIUS 1984)

Reagenz (Hersteller)	Konzentration
M	
Sorbit $C_6H_{14}O_6$ , (Duchefa)	0,30
Calciumchlorid $CaCl_2 \times 2H_2O$ (Serva)	0,05
pH-Wert 5.6 - 5.8	

Tab. 8.6.2: Enzymübersicht

Reagenz	Enzym EI Konz. [%]	Enzym N/D (modif. nach NASSOUR und DORION 2002) Konz. [%]	Enzym E VI (modif. nach OH und KIM 1994) Konz. [%]	Enzym Eapi I (modif. nach CHINACHIT 1991) Konz. [%]
Onozuka Cellulase R-10 (Duchefa)	2,0	-	2,0	1,0
Onozuka Cellulase RS (Yakult, Tokio)	-	0,4	-	0,5
Driselase (Fluka)	0,5	-	-	-
Hemicellulase ( Ferak Berlin)	0,5	-	-	-
Macerozym R-10 (Ferak Berlin)	-	-	0,06	1,0
Pektinase (Serva)	1,0	0,2	-	-
gelöst in:	MES	PPM 1 mit 1/2 MS ohne Hormone, Saccharose, Mannit und Glucose	PPM 1 ohne Hormone	WM
pH-Wert	6.0	6.0	6.0	5.8

Tab. 8.6.3: MES-Lösung

MES-Lösung	mM
MES, $C_6H_{13}NO_4S$ (Serva)	3
Natriumdihydrogenphosphat, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ (Duchefa)	7
Calciumchlorid, $CaCl_2 \times 2H_2O$ (Serva)	6
Mannit, $C_6H_{14}O_6$ (Duchefa)	350
Sorbit, $C_6H_{14}O_6$ (Duchefa)	350
pH-Wert 6.0	

Tab. 8.6.4: WM-Medium (CHINACHIT 1991)

Gamborg's B5 (Duchefa) Makro- und Mikrosalze +	
	μM
Kaliumnitrat, KNO <sub>3</sub> (Duchefa)	5000
Nicotinsäure, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> (Serva)	4,06
Thiamin, C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> OS (Serva)	0,30
Pyridoxin, C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> (Serva)	0,49
Mannit, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	250000
Sorbit, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	250000
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub> (Duchefa)	10000
MES, C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S (Serva)	3000
Caseinhydrolysat (Sigma)	250 mg/l

pH-Wert 5.8

Tab.8.6.5: Saccharose-Lösung

Reagenz (Hersteller)	Konzentration
	mM
Saccharose, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (Duchefa)	600
MES, C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S (Serva)	0,9

pH-Wert 5.8

Tab. 8.6.6: W5-Lösung (MENCZEL *et al* 1981)

Reagenz (Hersteller)	mM
Natriumchlorid, NaCl (Roth)	154
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Serva)	125
Kaliumchlorid, KCl (Duchefa)	5
Glucose, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	5

pH-Wert 5.6



Tab. 8.6.7: UV-Lösung

Reagenz (Hersteller)	Konzentration mM
Mannit, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	50
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Serva)	1
pH-Wert 6.6-7.0	

Tab. 8.6.8: Fusionslösungen

	Lösung 2 nach RYSCHKA 2007	FM 1	FM 2	FM 4 nach NASSOUR und DORION 2002	FM 5	Elektro- fusions- lösung
Reagenz	Konz.	Konz.	Konz.	Konz.	Konz.	Konz.
PEG 1500 (Sigma)	40%	-	-	-	-	-
PEG 6000 (Fluka)	-	-	-	40%	-	-
Glucose, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	0,30 M	-	-	-	-	-
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Serva)	0,05 M	-	0,10 M	0,01 M	0,05 M	0,003 M
Glycin, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> (Roth)	-	0,10 M	-	-	0,05 M	-
Mannit, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	-	-	0,50 M	-	0,40 M	0,550 M
Sorbit, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (Duchefa)	-	-	0,50 M	-	-	-
pH-Wert	7.0	10.5	10.5	10.0	10.0	6.2

## Anhang

### 8.7 Messprotokoll Flowzytometer

Cytometer Type: FACSCalibur

Detektor/Amps:

Param	Detector	Voltage	AmGain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Lin
P2	SSC	350	1.00	Lin
P3	FL1	600	1.00	Lin
P4	FL2	450	1.00	Lin
P5	FL3	650	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin

Threshold:

Primary Parameter: FSC

Value: 52

Secondary Parameter: None

Compensation:

FL1	-	0.0	%	FL2
FL2	-	0.0	%	FL1
FL2	-	0.0	%	FL3
FL3	-	0.0	%	FL2

### 8.8 Reagenzien und Puffer für Li-Cor

Tab. 8.8.1: Zusammensetzung des LongRanger Polyacrylamidgels

Reagenz	Konzentration in Lösung
Polyacrylamid-Gellösung 8 %	
LongRanger Gel Solution 50 % (Cambrex Bio Science, Rockland, CA)	8 % (v/v)
Harnstoff, CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O (Roth)	6993 mM
10x TBE LongRun	1x
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	ad 200 ml
Polyacrylamidgel (25 cm, 0,25 mm)	
Gellösung 8 % LongRanger	20 ml
Tetramethylethylendiamin (TEMED), C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> (Roth)	0,1 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 %ig, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (Roth)	1 % (v/v)

## 8.8.2 Zusammensetzung des Ladepuffers

Reagenz	Konzentration in Lösung
Formamid deionisiert, CH <sub>3</sub> NO (Roth)	95 % (v/v)
EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Roth)	10 mM
Parafuchsin, C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> HCl (Fluka)	0,1 % (w/v)
Bromphenolblau Na-Salz, C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> SNa (Roth)	0,01 % (w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	ad 10 ml

## 8.8.3 Zusammensetzung des 10x TBE LongRun Puffers (Ladepuffer)

Reagenz	Konzentration in Lösung
Tris, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> (Roth)	1340 mM
Borsäure, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Roth)	450 mM
EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Roth)	25 mM
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	ad 2 l

8.9 Messprotokoll Gaschromatographie  
(Agilent Technologies 5975 B, VLMSD)

## Oven

Initial temp.: 45 °C

Initial time 5.00 min

Ramps:

	Rate	Final temp	Final time
1	3.00	210	30.00
2	0.0 Off		

Post temp: 0 °C

Post time: 0.00 min

Run time: 90.00 min

## Back Inlet (CIS3)

Mode: Solvent Vent

Initial temp: 250 °C (Off)

Pressure: 58.8 kPa (On)

Vent time: 0.01 min

Vent flow: 30.0 ml/min

Vent pressure: 58 kPa

Purge flow: 15.0 ml/min

Purge time: 0.02 min

Total flow: 19.0 ml/min

Gas saver: On

Saver flow: 15.0 ml/min

Saver time: 3.00 min

Gas type: Helium

## Anhang

### Column 2

#### Capillary Column

Model number: Phenomen ZB Waxplus

30 m x 0.25 mm x 0.50  $\mu\text{m}$

Max temperature: 250  $^{\circ}\text{C}$

Nominal length: 30 m

Nominal diameter: 250  $\mu\text{m}$

Nominal film thickness: 0.50  $\mu\text{m}$

Mode: constant flow

Initial flow: 1.1 ml/min

Nominal init pressure: 58.8 kPa

Average velocity: 38 cm/sec

Inlet: Back Inlet

Outlet: MSD

Outlet pressure: vacuum

### Gerstel CIS

CIS: used

Temperature program

Heater mode: standard

Initial temperature: -150  $^{\circ}\text{C}$

Equilibration time: 0.20 min

Initial time: 0.20 min

### Ramp 1

Rate: 12.0  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$

End temp: 250  $^{\circ}\text{C}$

Hold time: 3.00 min

### Ramp 2

Rate: 0.0  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$

Cryo cooling: used

### Gerstel TDU

#### Temperature program

Initial temperature: 30.0  $^{\circ}\text{C}$

Delay time: 1.00 min

Initial time: 0.00 min

### Ramp 1

Rate 1: 120.0  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

End temp 1: 250  $^{\circ}\text{C}$

Hold time: 5.00 min

### Ramp 2

Rate 2: 0.0  $^{\circ}\text{C}$

### TDU settings

Transfer temp: 280  $^{\circ}\text{C}$

Desorption mode: splitless

## 8.10 Daten der statistischen Auswertung

Tab. 8.10.1: Statistische Auswertung der 1. Bonitur (14 dpi), *Xanthomonas*

Tukey-Test	MW	N	Genotyp	Bemerkung
A	55.000	5	637	anfällig
A	53.571	7	699	anfällig
B A	45.000	5	642	anfällig
B C	37.500	5	639	anfällig
B C D	35.000	10	660	anfällig
E C D	32.500	10	669	anfällig
E F D	26.250	10	501	anfällig
E G F D	25.000	10	671	anfällig
E G F D	25.000	10	664	anfällig
E G F D	25.000	10	678	tolerant
E G F D	25.000	10	656	anfällig
E G F D	25.000	10	661	tolerant
E G F D	25.000	10	672	anfällig
E G F D	25.000	10	677	anfällig
E G F H	22.500	10	616	anfällig
I G F H	20.833	3	612	anfällig
J I G F H	20.000	5	552	anfällig
J I G F H	20.000	5	549	anfällig
J I G F H K	18.750	10	503	anfällig
J I G F H K	18.750	10	505	tolerant
J I G F H K	18.750	10	620	anfällig
J I G F L H K	17.500	5	560	anfällig
J I G F L H K	17.500	10	666	tolerant
J I G M L H K	15.000	10	697	anfällig
J I N M L H K	12.500	5	539	anfällig
J I N M L H K	12.500	10	683	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	628	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	657	tolerant
J I N M L H K	12.500	5	538	anfällig
J I N M L H K	12.500	10	676	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	670	anfällig
J I N M L H K	12.500	10	665	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	679	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	663	anfällig
J I N M L H K	12.500	10	668	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	673	anfällig
J I N M L H K	12.500	10	658	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	613	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	686	anfällig
J I N M L H K	12.500	3	611	anfällig
J I N M L H K	12.500	10	675	tolerant
J I N M L H K	12.500	10	659	anfällig
J I N M L H K	12.500	10	684	tolerant

# Anhang

Tukey-Test	MW	N	Genotyp	Bemerkung
J I N M L H K	12.500	10	688	anfällig
J I N M L H K	12.500	5	535	anfällig
J I N M L O K	11.250	10	667	tolerant
J P N M L O K	10.000	5	540	anfällig
J P N M L O K	10.000	5	533	anfällig
P N M L O K	8.750	10	562	anfällig
P N M L O K	8.750	10	634	anfällig
P N M L O	8.333	9	595	anfällig
P N M L O	7.813	8	594	resistent
P N M O	6.250	10	602	tolerant
P N M O	6.250	4	534	anfällig
P N M O	5.556	9	569	tolerant
P N M O	5.000	20	530	anfällig
P N O	3.409	11	596	anfällig
P O	1.786	21	592	tolerant
P O	1.250	10	532	tolerant
P	0.000	10	585	resistent
P	0.000	10	604	tolerant
P	0.000	10	526	tolerant
P	0.000	10	614	tolerant
P	0.000	10	621	anfällig
P	0.000	10	627	tolerant
P	0.000	10	617	tolerant
P	0.000	10	629	tolerant
P	0.000	10	511	tolerant
P	0.000	10	622	resistent
P	0.000	9	584	tolerant
P	0.000	10	523	tolerant
P	0.000	11	524	tolerant
P	0.000	11	525	tolerant
P	0.000	10	655	tolerant
P	0.000	9	597	tolerant
P	0.000	7	598	tolerant
P	0.000	10	599	tolerant
P	0.000	10	623	tolerant
P	0.000	10	625	tolerant
P	0.000	10	626	tolerant
P	0.000	10	662	tolerant
P	0.000	20	609	resistent
P	0.000	8	610	tolerant
P	0.000	5	541	anfällig
P	0.000	7	519	tolerant
P	0.000	11	522	tolerant
P	0.000	10	558	anfällig
P	0.000	20	615	tolerant

Tukey-Test	MW	N	Genotyp	Bemerkung
P	0.000	10	654	tolerant
P	0.000	4	566	tolerant
P	0.000	10	527	tolerant
P	0.000	8	570	tolerant
P	0.000	9	571	tolerant
P	0.000	10	572	tolerant
P	0.000	9	573	tolerant
P	0.000	8	574	tolerant
P	0.000	9	576	tolerant
P	0.000	10	681	resistent
P	0.000	10	682	tolerant
P	0.000	10	586	tolerant
P	0.000	20	591	tolerant
P	0.000	10	685	tolerant
P	0.000	10	593	tolerant
P	0.000	5	644	anfällig
P	0.000	10	689	anfällig
P	0.000	10	690	anfällig
P	0.000	10	691	anfällig
P	0.000	10	693	tolerant
P	0.000	10	695	tolerant
P	0.000	10	601	tolerant
P	0.000	10	698	anfällig
P	0.000	10	603	tolerant
P	0.000	10	700	tolerant
P	0.000	10	701	tolerant

Tab. 8.10.2: Statistische Auswertung der 1.Bonitur (14 dpi), *Ralstonia*

Tukey-Test				MW	N	Genotyp	Bemerkung
		A		100.000	5	560	anfällig
		A		100.000	10	669	anfällig
B		A		80.000	10	616	anfällig
B		C		75.000	5	612	anfällig
B		C		75.000	5	611	anfällig
B		C	D	70.833	9	602	anfällig
B	E	C	D	62.500	10	656	anfällig
B	E	C	D	62.500	4	558	anfällig
F	B	E	C	60.000	5	532	anfällig
F	B	E	C	58.333	6	501	anfällig
F	H	E	C	55.000	5	523	anfällig
F	H	E	C	55.000	5	549	anfällig
F	H	E	C	52.500	10	678	anfällig
F	H	E	C	52.500	10	679	anfällig
F	H	E	I	51.250	10	623	anfällig

Anhang

Tukey-Test							MW	N	Genotyp	Bemerkung					
F	H	E	J	I	D	G	50.000	4	539	anfällig					
F	H	E	J	I	D	G	50.000	10	664	anfällig					
F	H	E	J	I	K	G	46.875	16	670	anfällig					
F	H	E	L	J	I	K	G	45.000	10	671	anfällig				
F	H	M	E	L	J	I	K	G	40.000	10	659	anfällig			
F	N	H	M	E	L	J	I	K	G	39.286	7	610	anfällig		
F	N	H	M	O	L	J	I	K	G	37.500	10	660	anfällig		
P	N	H	M	O	L	J	I	K	G	36.250	10	676	anfällig		
P	N	H	M	O	L	J	I	K	Q	35.000	10	596	anfällig		
P	N	H	M	O	L	J	I	K	Q	35.000	5	540	anfällig		
P	N	H	M	O	L	J	I	K	Q	35.000	10	677	anfällig		
P	N	R	M	O	L	J	I	K	Q	31.250	10	657	anfällig		
P	N	R	M	O	L	J	I	K	Q	31.250	10	569	tolerant		
S	P	N	R	M	O	L	J	I	K	Q	30.000	5	535	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	J	I	K	Q	30.000	10	668	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	J	T	K	Q	27.778	9	572	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	J	T	K	Q	27.500	5	533	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	J	T	K	Q	27.500	10	675	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	25.000	9	586	tolerant	
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	25.000	10	673	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	25.000	10	503	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	25.000	10	693	tolerant	
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	25.000	10	658	tolerant	
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	25.000	10	672	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	25.000	10	686	anfällig	
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	V	23.750	10	699	tolerant
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	V	23.750	10	541	anfällig
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	V	23.750	10	661	anfällig
S	P	N	R	M	O	L	U	T	K	Q	V	23.750	10	620	anfällig
S	P	N	R	M	O	L	U	T	W	Q	V	22.917	6	598	anfällig
S	P	N	R	M	O	L	U	T	W	Q	V	22.500	10	663	anfällig
S	P	N	R	M	O	L	U	T	W	Q	V	22.500	5	552	anfällig
S	P	N	R	M	O	U	T	W	Q	V	21.250	10	683	anfällig	
S	P	N	R	M	O	U	T	W	Q	V	21.250	10	621	anfällig	
S	P	N	R	M	O	U	T	W	Q	V	20.000	5	534	anfällig	
S	P	N	R	M	O	U	T	W	Q	V	17.500	10	505	tolerant	
S	P	N	R	M	O	U	T	W	Q	V	17.500	10	681	anfällig	
S	P	N	R	M	O	U	T	W	Q	V	17.188	8	666	anfällig	
S	P	N	R	O	U	T	W	Q	V	16.667	3	562	anfällig		
S	P	N	R	O	U	T	W	Q	V	16.250	20	634	anfällig		
S	P	R	O	U	T	W	Q	V	15.000	10	613	tolerant			
S	P	R	O	U	T	W	Q	V	15.000	10	665	anfällig			
S	P	R	O	U	T	W	Q	V	13.750	10	667	anfällig			
S	P	R	O	U	T	W	Q	V	13.750	20	530	tolerant			
S	R	O	U	T	W	Q	V	12.500	10	538	anfällig				



		Tukey-Test				MW	N	Genotyp	Bemerkung
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	654 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	637 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	689 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	695 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	684 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	690 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	20	597 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	701 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	9	593 anfällig
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	7	594 resistent
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	691 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	688 tolerant
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	614 anfällig
S	R	U	T	W	Q	V	12.500	10	615 anfällig
S	R	U	T	W		V	11.250	10	642 tolerant
S	R	U	T	W		V	11.111	9	603 tolerant
S	R	U	T	W		V	9.375	8	682 tolerant
S	R	U	T	W		V	8.333	9	595 anfällig
S		U	T	W		V	7.813	8	601 tolerant
S		U	T	W		V	7.500	10	617 tolerant
S		U	T	W		V	6.818	11	591 tolerant
		U	T	W		V	5.263	19	585 resistent
		U	T	W		V	5.000	10	655 tolerant
		U	T	W		V	5.000	10	639 tolerant
		U	T	W		V	4.688	8	519 tolerant
		U		W		V	2.500	5	522 anfällig
		U		W		V	2.500	10	627 tolerant
		U		W		V	2.500	10	697 tolerant
				W		V	1.563	8	570 tolerant
				W		0.000	9	604 resistent	
				W		0.000	10	662 tolerant	
				W		0.000	10	628 tolerant	
				W		0.000	10	622 anfällig	
				W		0.000	4	566 tolerant	
				W		0.000	10	625 tolerant	
				W		0.000	5	524 tolerant	
				W		0.000	10	576 tolerant	
				W		0.000	8	584 tolerant	
				W		0.000	10	629 tolerant	
				W		0.000	10	626 tolerant	
				W		0.000	10	571 tolerant	
				W		0.000	10	592 tolerant	
				W		0.000	10	573 anfällig	
				W		0.000	20	644 tolerant	
				W		0.000	4	525 tolerant	

Anhang

Tukey-Test	MW	N	Genotyp	Bemerkung
W	0.000	6	526	tolerant
W	0.000	4	527	tolerant
W	0.000	4	511	tolerant
W	0.000	9	599	tolerant
W	0.000	10	685	tolerant
W	0.000	10	698	tolerant
W	0.000	8	574	tolerant
W	0.000	8	700	tolerant
W	0.000	10	609	resistent

Tab. 8.10.3: Statistische Auswertung der 2. Bonitur (21 dpi), *Xanthomonas*

Tukey Test				MW	N	Geno.	Bemerk.			
			A	100.000	10	664	anfällig			
			B	78.571	7	699	anfällig			
			B	75.000	5	637	anfällig			
C			B	72.500	10	669	anfällig			
C			B	D	65.000	5	639	anfällig		
C	E		B	D	60.000	5	642	anfällig		
C	E		B	D	60.000	10	660	anfällig		
C	E		B	D	60.000	5	560	anfällig		
C	E		F	D	55.000	10	501	anfällig		
C	E		F	D	55.000	5	549	anfällig		
C	E		F	D	55.000	10	656	anfällig		
G	E		F	D	52.500	10	659	anfällig		
G	E		F	D	50.000	10	634	anfällig		
G	E		F	D	50.000	10	672	anfällig		
G	E		F	H	41.667	3	612	anfällig		
G			F	H	40.000	10	663	anfällig		
G			F	H	40.000	10	671	anfällig		
G	I		F	H	38.750	10	616	anfällig		
J	G	I	F	H	37.500	10	503	anfällig		
J	G	I	K	H	35.000	5	644	anfällig		
J	G	I	K	H	35.000	10	620	anfällig		
J	L	I	K	H	30.000	10	505	tolerant		
J	L	I	K	H	30.000	5	540	anfällig		
J	L	I	K	H	M	27.500	10	613	tolerant	
J	L	I	K	H	M	27.500	10	678	tolerant	
J	L	I	K	H	M	27.500	5	535	anfällig	
J	L	I	K	H	M	27.500	5	538	anfällig	
J	L	I	K	H	M	27.500	10	562	anfällig	
J	L	I	K	H	M	27.500	10	658	tolerant	
J	L	I	K	N	H	M	25.000	11	596	anfällig
J	L	I	K	N	H	M	25.000	10	676	tolerant

Tukey-Test					MW	N	Geno	Bemerk.				
J	L	I			K	N	H	M	25.000	20	530	anfällig
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	700	tolerant
J	L	I			K	N	H	M	25.000	5	539	anfällig
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	668	tolerant
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	683	tolerant
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	666	tolerant
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	690	anfällig
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	677	anfällig
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	673	anfällig
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	670	anfällig
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	657	tolerant
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	686	anfällig
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	688	anfällig
J	L	I			K	N	H	M	25.000	10	661	tolerant
J	L	I	O		K	N	H	M	23.750	10	665	tolerant
J	L	P	I	O	K	N	H	M	22.500	10	667	tolerant
J	L	P	I	O	K	N	H	M	22.222	9	595	anfällig
J	L	P	I	O	K	N	Q	M	20.000	5	533	anfällig
J	L	P	I	O	K	N	Q	M	20.000	10	628	tolerant
J	L	P	I	O	K	N	Q	M	20.000	5	552	anfällig
J	L	P	R	O	K	N	Q	M	18.750	10	621	anfällig
	L	P	R	O	K	N	Q	M	17.500	10	697	anfällig
	L	P	R	O	K	N	Q	M	16.250	10	558	anfällig
	L	P	R	O	K	N	Q	M	16.250	10	691	anfällig
	L	P	R	O	K	N	Q	M	15.625	4	534	anfällig
	L	P	R	O		N	Q	M	15.000	10	532	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	15.000	10	698	anfällig
	L	P	R	O		N	Q	M	15.000	10	614	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	15.000	10	617	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	13.750	10	693	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	675	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	679	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	599	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	654	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	685	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	682	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	3	611	anfällig
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	684	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	623	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	9	597	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	689	anfällig
	L	P	R	O		N	Q	M	12.500	10	593	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	11.250	10	572	tolerant
	L	P	R	O		N	Q	M	11.250	10	601	tolerant
		P	R	O		N	Q	M	10.000	10	602	tolerant

# Anhang

Tukey-Test						MW	N	Geno.	Bemerk.
P	R	O	N	Q	M	8.333	9	573	tolerant
P	R	O	N	Q	M	7.813	8	594	resistent
P	R	O	N	Q	M	7.738	21	592	tolerant
P	R	O	N	Q		6.250	4	566	tolerant
P	R	O	N	Q		5.556	9	569	tolerant
P	R	O		Q		5.000	5	541	anfällig
P	R			Q		3.125	8	610	tolerant
	R			Q		1.250	20	615	tolerant
	R			Q		1.250	10	622	resistent
	R			Q		0.625	20	591	tolerant
	R					0.000	10	511	tolerant
	R					0.000	10	626	tolerant
	R					0.000	10	627	tolerant
	R					0.000	9	584	tolerant
	R					0.000	10	662	tolerant
	R					0.000	8	570	tolerant
	R					0.000	9	571	tolerant
	R					0.000	20	609	resistent
	R					0.000	10	629	tolerant
	R					0.000	8	574	tolerant
	R					0.000	9	576	tolerant
	R					0.000	10	526	tolerant
	R					0.000	10	585	resistent
	R					0.000	10	586	tolerant
	R					0.000	7	519	tolerant
	R					0.000	10	681	resistent
	R					0.000	10	523	tolerant
	R					0.000	11	524	tolerant
	R					0.000	11	525	tolerant
	R					0.000	10	655	tolerant
	R					0.000	10	527	tolerant
	R					0.000	7	598	tolerant
	R					0.000	10	695	tolerant
	R					0.000	11	522	tolerant
	R					0.000	10	625	tolerant
	R					0.000	10	603	tolerant
	R					0.000	10	604	tolerant
	R					0.000	10	701	tolerant

Tab. 8.10.4: Statistische Auswertung der 2. Bonitur (21 dpi), *Ralstonia*

Tukey-Test										MW	N	Genotyp	Bemerkung
									A	100.000	10	616	anfällig
									A	100.000	10	669	anfällig
									A	100.000	4	558	anfällig
									A	97.500	10	664	anfällig
									A	95.000	5	560	anfällig
									A	95.000	10	679	anfällig
									A	95.000	5	523	anfällig
									A	90.000	5	612	anfällig
									A	85.000	10	673	anfällig
									A	85.000	5	532	anfällig
									A	82.500	10	623	anfällig
E									A	80.000	5	611	anfällig
E									A	80.000	10	678	anfällig
E									A	78.125	16	670	anfällig
E									A	77.500	10	677	anfällig
E									A	75.000	4	539	anfällig
E									A	72.500	10	656	anfällig
E									A	72.222	9	602	anfällig
E									A	70.833	6	501	anfällig
E									A	70.000	10	671	anfällig
E									A	70.000	5	549	anfällig
E									A	65.000	10	596	anfällig
E									A	60.714	7	610	anfällig
E									A	58.333	9	572	anfällig
E									A	57.500	10	657	anfällig
E									A	51.389	9	586	tolerant
E									A	50.000	10	686	anfällig
E									A	50.000	10	660	anfällig
N									A	45.000	10	659	anfällig
N									A	45.000	10	676	anfällig
N									A	45.000	10	661	anfällig
N									A	45.000	10	675	anfällig
N									A	42.500	10	658	tolerant
N									A	40.000	5	533	anfällig
N									A	40.000	10	621	anfällig
N									A	40.000	10	668	anfällig
N									A	40.000	5	534	anfällig
N									A	39.583	6	598	anfällig
N									A	38.750	10	569	tolerant
N									A	38.750	10	620	anfällig
N	R								A	37.500	5	552	anfällig
N	R								A	37.500	20	634	anfällig
N	R								A	37.500	9	593	anfällig

Anhang

Tukey-Test											MW	N	Genotyp	Bemerkung	
S	N	R	J	M	L	Q	I	P	K	O	35.000	5	535	anfällig	
S	N	R	J	M	L	Q	I	P	K	O	35.000	5	540	anfällig	
S	N	R	J	M	L	Q		P	K	O	33.750	10	503	anfällig	
S	N	R	J	M	L	Q		P	K	O	33.333	3	562	anfällig	
S	N	R	J	M	L	Q	T	P	K	O	32.500	10	663	anfällig	
S	N	R	J	M	L	Q	T	P	K	O	32.500	10	541	anfällig	
S	N	R	J	M	L	Q	T	P	K	O	U	30.000	10	667	anfällig
S	N	R		M	L	Q	T	P	K	O	U	28.750	10	672	anfällig
S	N	R		M	L	Q	T	P	K	O	U	28.750	10	665	anfällig
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	26.250	10	681	anfällig
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	25.000	10	538	anfällig
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	25.000	10	654	tolerant
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	25.000	10	699	tolerant
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	25.000	10	505	tolerant
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	25.000	10	693	tolerant
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	23.750	10	697	tolerant
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	22.500	10	683	anfällig
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	21.875	8	666	anfällig
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	21.250	10	695	tolerant
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	21.250	10	642	tolerant
S	N	R		M	L	Q	T	P		O	U	21.250	10	615	anfällig
S	N	R		M		Q	T	P		O	U	19.444	9	603	tolerant
S	N	R				Q	T	P		O	U	18.750	10	689	tolerant
S	N	R				Q	T	P		O	U	18.750	8	519	tolerant
S	N	R				Q	T	P		O	U	17.500	10	617	tolerant
S	N	R				Q	T	P		O	U	17.500	10	613	tolerant
S	N	R				Q	T	P		O	U	17.500	20	530	tolerant
S	N	R				Q	T	P		O	U	17.188	8	601	tolerant
S	N	R				Q	T	P		O	U	16.667	9	595	anfällig
S	N	R				Q	T	P		O	U	16.250	10	614	anfällig
S	N	R				Q	T	P		O	U	15.625	8	570	tolerant
S	N	R				Q	T	P		O	U	15.000	10	637	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	8	700	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	10	571	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	10	690	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	20	597	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	10	701	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	10	684	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	10	688	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	10	691	tolerant
S		R				Q	T	P		O	U	12.500	10	625	tolerant
S		R				Q	T	P		U	10.000	10	592	tolerant	
S		R				Q	T	P		U	10.000	10	622	anfällig	
S		R				Q	T	P		U	9.375	8	682	tolerant	
S		R				Q	T			U	8.750	10	628	tolerant	

Tukey-Test					MW	N	Genotyp	Bmerkung
S	R	Q	T	U	8.750	10	573	anfällig
S	R		T	U	7.895	19	585	resistent
S	R		T	U	7.143	7	594	resistent
S			T	U	6.250	10	639	tolerant
S			T	U	5.556	9	599	tolerant
S			T	U	5.000	5	522	anfällig
S			T	U	4.688	8	574	tolerant
			T	U	2.500	10	627	tolerant
				U	1.563	8	584	tolerant
				U	1.250	10	685	tolerant
				U	1.250	20	644	tolerant
				U	0.000	10	662	tolerant
				U	0.000	10	576	tolerant
				U	0.000	6	526	tolerant
				U	0.000	10	629	tolerant
				U	0.000	5	524	tolerant
				U	0.000	4	525	tolerant
				U	0.000	4	566	tolerant
				U	0.000	4	527	tolerant
				U	0.000	4	511	tolerant
				U	0.000	11	591	tolerant
				U	0.000	10	655	tolerant
				U	0.000	10	698	tolerant
				U	0.000	10	626	tolerant
				U	0.000	9	604	resistent
				U	0.000	10	609	resistent

Tab. 8.10.5: Statistische Auswertung der 3. Bonitur (28 dpi), *Xanthomonas*

Tukey-Test					MW	N	Genotyp	Bemerkung
		A			100.000	10	664	anfällig
		A			100.000	7	699	anfällig
B		A			95.000	5	637	anfällig
B		A			95.000	10	669	anfällig
B		A			95.000	5	642	anfällig
B		A	C		85.000	10	503	anfällig
B		A	C		85.000	10	501	anfällig
B		A	C		85.000	5	560	anfällig
B	D	A	C		80.000	5	639	anfällig
E	B	D	A	C	75.000	5	549	anfällig
E	B	D	F	C	70.000	10	660	anfällig
E	G	D	F	C	65.000	5	539	anfällig
E	G	D	F	C	65.000	10	663	anfällig
E	G	D	F	C	60.000	5	540	anfällig

Anhang

Tukey-Test					MW	N	Genotyp	Bemerkung
E	G	D	F	C	60.000	10	634	anfällig
E	G	D	F	C	60.000	10	690	anfällig
E	G	D	F	C	60.000	5	644	anfällig
E	G	D	F	C	60.000	10	671	anfällig
E	G	D	F	H	57.500	10	677	anfällig
E	G	D	F	H	57.500	10	659	anfällig
E	G	D	F	H I	55.000	10	656	anfällig
E	G	D	F	H I	55.000	10	697	anfällig
E	G	D	F	J H I	53.750	10	688	anfällig
E	G	D	K F	J H I	53.125	20	530	anfällig
E	G		K F	J H I	52.500	10	616	anfällig
E	G	L	K F	J H I	50.000	10	689	anfällig
E	G	L	K F	J H I	50.000	10	670	anfällig
E	G	L	K F	J H I	50.000	10	672	anfällig
E	G	L	K F	J H I	50.000	10	686	anfällig
E	G	L	K F	J H I	50.000	10	698	anfällig
E	G	L	K F	J H I	50.000	10	673	anfällig
M	G	L	K F	J H I	45.000	10	620	anfällig
M	G	L	K F	J H I	45.000	10	613	tolerant
M	G	L	K N	J H I	42.500	5	538	anfällig
M	G	O	L K N	J H I	41.667	3	612	anfällig
M	G	O	L K N	J H I	41.250	10	562	anfällig
M	G	O	L K N	J H I	40.000	5	535	anfällig
M	P	G	O L K N	J H I	38.750	10	691	anfällig
M	P	G	O L K N	J H I	38.636	11	596	anfällig
M	P	Q	O L K N	J H I	32.500	10	505	tolerant
M	P	Q	O L K N	J H I	31.250	10	558	anfällig
M	P	Q	O L K N	J H I	30.556	9	595	anfällig
M	P	Q	O L K N	J R I	29.167	3	611	anfällig
M	P	Q	O L K N	J R S	27.500	5	533	anfällig
M	P	Q	O L K N	J R S	27.500	10	678	tolerant
M	P	Q	O L K N	J R S	27.500	10	658	tolerant
M	P	Q	O L K N	T R S	26.250	10	614	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	667	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	683	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	676	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	675	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	657	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	599	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	661	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	666	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	679	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	4	534	anfällig
M	P	Q	O L N	T R S	25.000	10	668	tolerant
M	P	Q	O L N	T R S	23.750	10	665	tolerant



Tukey-Test					MW	N	Genotyp	Bemerkung				
M	P	Q	O	L	N	T	R	S	23.750	10	621	anfällig
M	P	Q	O		N	T	R	S	22.500	10	602	tolerant
M	P	Q	O		N	T	R	S	20.000	10	628	tolerant
M	P	Q	O		N	T	R	S	20.000	5	552	anfällig
M	P	Q	O		N	T	R	S	19.444	9	597	tolerant
M	P	Q	O		N	T	R	S	18.750	10	617	tolerant
M	P	Q	O		N	T	R	S	18.750	10	532	tolerant
	P	Q	O		N	T	R	S	17.500	5	541	anfällig
	P	Q	O		N	T	R	S	17.500	10	593	tolerant
	P	Q	O			T	R	S	15.278	9	573	tolerant
	P	Q	O			T	R	S	15.000	10	701	tolerant
	P	Q	O			T	R	S	15.000	10	623	tolerant
	P	Q				T	R	S	12.500	10	693	tolerant
	P	Q				T	R	S	12.500	10	700	tolerant
	P	Q				T	R	S	12.500	10	685	tolerant
	P	Q				T	R	S	12.500	10	684	tolerant
	P	Q				T	R	S	12.500	10	601	tolerant
	P	Q				T	R	S	12.500	10	654	tolerant
	P	Q				T	R	S	12.500	10	695	tolerant
	P	Q				T	R	S	12.500	10	682	tolerant
		Q				T	R	S	11.250	10	572	tolerant
		Q				T	R	S	8.333	9	569	tolerant
		Q				T	R	S	7.813	8	594	resistent
		Q				T	R	S	7.738	21	592	tolerant
						T	R	S	3.125	8	574	tolerant
						T	R	S	3.125	8	610	tolerant
						T	R	S	2.778	9	584	tolerant
						T	R	S	2.500	10	622	resistent
						T	R	S	2.500	10	625	tolerant
						T	S	1.250	20	615	tolerant	
						T	S	1.250	10	626	tolerant	
						T	S	0.625	20	591	tolerant	
						T	0.000	10	511	tolerant		
						T	0.000	10	627	tolerant		
						T	0.000	10	526	tolerant		
						T	0.000	10	662	tolerant		
						T	0.000	8	570	tolerant		
						T	0.000	9	576	tolerant		
						T	0.000	4	566	tolerant		
						T	0.000	10	629	tolerant		
						T	0.000	10	586	tolerant		
						T	0.000	7	519	tolerant		
						T	0.000	10	681	resistent		
						T	0.000	10	585	resistent		
						T	0.000	11	524	tolerant		

Anhang

Tukey-Test	MW	N	Genotyp	Bemerkung
T	0.000	11	525	tolerant
T	0.000	10	655	tolerant
T	0.000	10	527	tolerant
T	0.000	7	598	tolerant
T	0.000	9	571	tolerant
T	0.000	11	522	tolerant
T	0.000	10	523	tolerant
T	0.000	10	603	tolerant
T	0.000	10	604	tolerant
T	0.000	20	609	resistent

8.10.6: Statistische Auswertung der 3. Bonitur (28 dpi), *Ralstonia*

Tukey-Test					MW	N	Geno.	Bemer.	
				A	100.000	10	679	anfällig	
				A	100.000	10	673	anfällig	
				A	100.000	5	523	anfällig	
				A	100.000	5	560	anfällig	
				A	100.000	5	612	anfällig	
				A	100.000	10	678	anfällig	
				A	100.000	4	558	anfällig	
				A	100.000	10	669	anfällig	
				A	100.000	16	670	anfällig	
				A	100.000	10	616	anfällig	
	B			A	97.500	10	664	anfällig	
	B			A	95.000	5	611	anfällig	
	B			A	95.000	5	532	anfällig	
	B	D		A	92.500	10	623	anfällig	
E	B	D		A	90.000	5	549	anfällig	
E	B	D		A	87.500	10	656	anfällig	
E	B	D		A	87.500	6	501	anfällig	
E	B	D		A	85.000	10	671	anfällig	
E	B	D	H	A	82.500	10	596	anfällig	
E	B	I	D	H	80.000	10	657	anfällig	
E	B	I	D	H	78.571	7	610	anfällig	
E	J	B	I	D	77.500	10	677	anfällig	
E	J	B	I	D	77.500	10	686	anfällig	
K	E	J	B	I	D	75.000	10	676	anfällig
K	E	J	B	I	D	75.000	4	539	anfällig

Tukey-Test											MW	N	Geno.	Bemer.						
K	E	J	B	I	D	H	A	G	C	F	75.000	10	675	anfällig						
K	E	J	B	I	D	H	A	G	C	F	L	73.750	10	683	anfällig					
K	E	J	B	I	D	H	A	G	C	M	F	L	72.222	9	572	anfällig				
K	E	J	B	I	D	H	A	G	C	M	F	L	72.222	9	602	anfällig				
K	E	J	B	I	D	H	A	G	C	M	F	L	70.000	10	659	anfällig				
K	E	J	B	I	D	H	A	G	N	C	M	F	L	66.250	10	615	anfällig			
K	E	J	B	I	D	H	A	O	G	N	C	M	F	L	65.278	9	586	tolerant		
K	E	J	B	I	D	H	A	O	G	N	C	M	F	L	65.000	5	552	anfällig		
K	E	J	B	I	D	H	P	O	G	N	C	M	F	L	62.500	10	672	anfällig		
K	E	J	I	D	H	P	O	G	N	C	M	F	L	61.250	10	667	anfällig			
K	E	J	Q	I	D	H	P	O	G	N	M	F	L	57.500	10	621	anfällig			
K	E	J	Q	I	H	P	O	G	N	R	M	F	L	55.000	10	668	anfällig			
K	J	Q	I	H	P	O	G	N	R	M	F	L	54.167	6	598	anfällig				
K	J	Q	I	S	H	P	O	G	N	R	M	F	L	53.750	10	681	anfällig			
K	T	J	Q	I	S	H	P	O	G	N	R	M	F	L	53.125	20	634	anfällig		
K	T	J	Q	I	S	H	P	O	G	N	R	M	U	L	50.000	10	660	anfällig		
K	T	J	Q	I	S	H	P	O	V	N	R	M	U	L	47.500	10	620	anfällig		
K	T	J	Q	I	S	H	P	O	V	N	R	M	U	L	47.500	10	541	anfällig		
K	T	J	Q	I	S	W	P	O	V	N	R	M	U	L	46.250	10	503	anfällig		
K	T	J	Q	I	S	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	45.000	5	540	anfällig	
K	T	J	Q	I	S	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	45.000	10	569	tolerant	
K	T	J	Q	I	S	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	45.000	5	534	anfällig	
K	T	J	Q	I	S	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	45.000	10	661	anfällig	
K	T	J	Q	I	S	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	45.000	10	665	anfällig	
K	T	J	Q	Y	S	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	42.500	10	538	anfällig	
K	T	Q	Y	S	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	41.667	3	562	anfällig		
K	T	Z	Q	Y	S	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	41.250	10	614	anfällig	
K	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	40.000	10	663	anfällig
K	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	40.000	5	533	anfällig
	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	O	V	N	R	M	U	L	39.063	8	666	anfällig
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	O	V	N	R	M	U	37.500	9	593	anfällig	
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	O	V	N	R	M	U	37.500	5	535	anfällig	
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	O	V	N	R	U	C	33.333	9	595	anfällig	
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	O	V	R	U	C	30.000	10	699	tolerant		
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	V	R	U	C	28.750	10	505	tolerant			
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	P	V	R	U	C	27.500	10	658	tolerant			
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	25.000	10	697	tolerant				
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	25.000	8	519	tolerant				
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	25.000	10	693	tolerant				
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	25.000	10	654	tolerant				
B	T	Z	Q	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	22.500	10	622	anfällig				
B	T	Z	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	21.250	10	617	tolerant					
B	T	Z	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	20.833	9	603	tolerant					
B	T	Z	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	20.000	10	642	tolerant					
B	T	Z	Y	S	A	W	X	V	R	U	C	20.000	10	613	tolerant					

Anhang

Tukey-Test										MW	N	Geno	Bemer.	
B	T	Z	Y	S	A	W	X	V	U	C	18.750	10	689	tolerant
B	T	Z	Y		A	W	X	V	U	C	18.125	20	530	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V	U	C	17.188	8	601	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V	U	C	15.625	8	570	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	10	684	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	8	700	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	10	571	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	10	690	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	20	597	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	10	701	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	10	691	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	10	592	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	10	625	tolerant
B		Z	Y		A	W	X	V		C	12.500	10	688	tolerant
B		Z	Y		A	W	X			C	11.250	10	695	tolerant
B		Z	Y		A	W	X			C	11.250	10	573	anfällig
B		Z	Y		A		X			C	10.526	19	585	resistent
B		Z	Y		A		X			C	10.000	10	637	tolerant
B		Z	Y		A					C	9.375	8	682	tolerant
B		Z			A					C	6.250	8	574	tolerant
B					A					C	5.556	9	599	tolerant
B					A					C	5.357	7	594	resistent
B					A					C	5.000	10	628	tolerant
B					A					C	5.000	5	522	anfällig
B					A					C	5.000	10	639	tolerant
B										C	2.500	10	627	tolerant
										C	1.563	8	584	tolerant
										C	1.250	10	685	tolerant
										C	0.000	10	662	tolerant
										C	0.000	5	524	tolerant
										C	0.000	10	576	tolerant
										C	0.000	6	526	tolerant
										C	0.000	10	629	tolerant
										C	0.000	20	644	tolerant
										C	0.000	4	525	tolerant
										C	0.000	4	566	tolerant
										C	0.000	4	527	tolerant
										C	0.000	4	511	tolerant
										C	0.000	11	591	tolerant
										C	0.000	10	655	tolerant
										C	0.000	10	698	tolerant
										C	0.000	10	626	tolerant
										C	0.000	9	604	resistent
										C	0.000	10	609	resistent

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Josefine Engel

**Veröffentlichungen die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind:**

Engel, J.; Poschenrieder, G.; Richter, K. (2008) „Ermittlung der Virulenz von *Ralstonia solanacearum* – Isolaten an *Pelargonium*.“ Poster 084, 56. Deutsche Pflanzenschutztagung

Engel, J.; Weinzierl, K.; Klocke, E. (2009) „*Pelargonium* Suspensionskultur – Charakterisierung und Möglichkeiten der Verwendung.“ Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut 419, 32-36

Engel, J.; Geibel, M.; Richter, K. (2009): Bacterial Wilt of *Pelargonium*: Development of a screening method for resistance. Poster, 23rd Eucarpia Symposium 2009 - Section Ornamentals “Colourful Breeding and Genetics” Leiden, Niederlande, 31.8. – 4.9.2009

Engel, J.; Geibel, M.; Richter, K. (2009): Development of methods to test the resistance of *Pelargonium* to bacterial diseases. Journal für Kulturpflanzen 61, 454-455

Engel, J.; Geibel, M.; Richter, K. (2009): Erarbeitung von Methoden zur Prüfung der Resistenz von Pelargonien gegen bakterielle Erreger. Vortrag, Tagung des Arbeitskreises Phytopathologie der DPG, Dossenheim, 3.-4.9.2009

Engel, J.; Geibel, M.; Richter, K. (2010): Bacterial Wilt of *Pelargonium*: Development of a screening method for resistance. Acta Horticulturae 855, 113-118

Engel J.; Richter K.; Schauer F (2012) Characterisation of *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* and *Ralstonia solanacearum* isolates from different origin. (In Vorbereitung)

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Frieder Schauer danke ich herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die freundlichen Gespräche, wissenschaftlichen Ratschläge und die großen Bemühungen hinsichtlich der Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Ordon für die Ermöglichung der Durchführung der Resistenzversuche am Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz des Julius Kühn-Institutes sowie für die Unterstützung und angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Günter Schumann danke ich für die Ermöglichung der Durchführung der Versuche zur Zell- und Gewebekultur am Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst des Julius Kühn-Institutes.

Bei den Arbeitsgruppen von Herrn Dr. Klaus Richter und Frau Dr. Evelyn Klocke bedanke ich mich recht herzlich für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft im Rahmen der Versuchsdurchführung und -auswertung.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Edgar Schliephake für die Unterstützung bei der Bearbeitung statistischer Fragestellungen.

Bei der Firma Elsner pac<sup>®</sup> Dresden bedanke ich mich für die Bereitstellung des Testmaterials und die gute Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Detlef Ulrich danke ich für die Durchführung der Inhaltsstoffanalysen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

