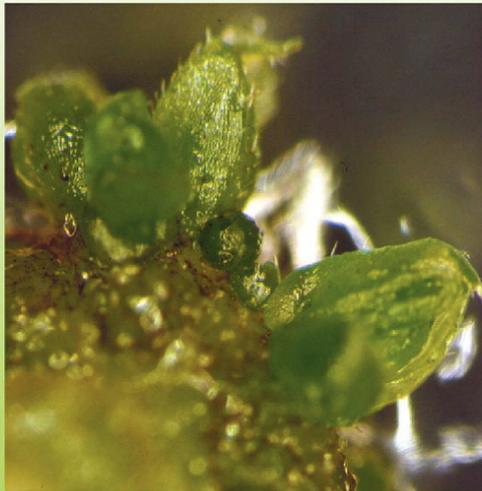




Christoph Horlemann (Autor)  
**Genetische Transformation und Regeneration von  
Hopfen (*Humulus lupulus* L.)**

**Genetische Transformation  
und Regeneration  
von Hopfen  
(*Humulus lupulus* L.)**

Christoph Horlemann



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3388>

Copyright:  
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Problemstellung.....	1
1.2. Ziel der Arbeit.....	6
1.3. Forschungsstand.....	6
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Material .....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Pflanzenmaterial.....	9
2.1.2. Bakterienstämme.....	10
2.1.3. Chemikalien .....	10
2.1.4. Nukleinsäuren .....	12
2.1.4.1. Nukleinsäuren allgemein.....	12
2.1.4.2. Plasmide.....	12
2.1.4.3. Nukleotide .....	13
2.1.4.4. Oligonukleotide (PCR - Primer).....	13
2.1.5. Enzyme .....	15
2.1.6. Gebrauchtsfertige Reaktionssysteme (Kits).....	15
2.1.7. Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.8. Gewächshausbedarf.....	16
2.1.9. Geräte .....	17
2.1.10. Software .....	18
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.2.1. Pflanzenanzucht im Gewächshaus .....	18
2.2.2. Überführung von Hopfen in die Sterilkultur.....	18
2.2.3. Regeneration von Pflanzen aus Stängelstücken.....	19
2.2.4. Herstellung von Konstrukten für die Transformation .....	20

---

2.2.4.1. Herstellung und Klonierung eines binären Konstruktes mit dem Gen <i>NPR1</i> .....	20
2.2.4.2. Herstellung und Klonierung eines binären Konstruktes mit dem Gen Stilbensynthase .....	23
2.2.4.3. Herstellung und Klonierung eines binären Konstruktes mit dem Gen T4-Lysozym.....	23
2.2.5. Genetische Transformation von Hopfen .....	24
2.2.5.1. Verwendete <i>A. tumefaciens</i> -Stämme und Konstrukte.....	24
2.2.5.2. Anzucht von <i>A. tumefaciens</i> für die Transformation.....	24
2.2.5.3. Transformation und Cokultur von Hopfen mit <i>A. tumefaciens</i> .....	25
2.2.5.4. Sprossbildung und Selektion transformierter Explantate .....	26
2.2.5.5. Regeneration transgener Hopfenpflanzen .....	26
2.2.5.6. <i>In planta</i> -Transformation von Hopfen .....	27
2.2.6. Analyse der transgenen Pflanzen .....	27
2.2.6.1. Methoden zur möglichst frühen DNA-Extraktion von potentiell transgenen Pflanzen .....	27
2.2.6.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
2.2.6.3. Southern-Hybridisierung.....	29
2.2.6.4. GUS-Enzymtest.....	30
2.2.7. Versuche zur Kultivierung des Pathogens <i>Pseudoperonospora humuli</i> (Miy. & Takah.) G.Wils. ....	30
2.2.8. Amplifizierung einer zu <i>NPR1</i> homologen Sequenz aus Hopfen.....	30
2.2.9. Standardmethoden.....	31
2.2.9.1. Bereitung von Medien für die Gewebekultur .....	31
2.2.9.2. DNA-Isolierung .....	32
2.2.9.3. Qualitätskontrollen der DNA-Extraktion .....	33
2.2.9.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.9.5. Agarose-Gelelektrophorese .....	33
2.2.9.6. Restriktionsverdau .....	34
2.2.9.7. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.2.9.8. Transformation von <i>E. coli</i> .....	37
2.2.9.9. Transformation von <i>A. tumefaciens</i> .....	38
2.2.9.10. DNA-Sequenzierung.....	38
2.2.9.11. DNA-Sequenzanalyse.....	38

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1. Etablierung einer Sterilkultur von Hopfen</b> .....	<b>39</b>
3.1.1. Genotypische Unterschiede bei der Inkulturnahme von Hopfenstecklingen .....	39
3.1.2. Einfluss verschiedener Medienzusammensetzungen auf das Wachstum von Propagationsstecklingen.....	39
3.1.3. Ausfälle innerhalb der Propagation durch „Ausbleichen“ der Kulturen.....	41
<b>3.2. Entwicklung einer Methode zur Regeneration von Hopfen</b> .....	<b>43</b>
3.2.1. Einfluss unterschiedlicher Explantattypen auf die Kallusbildung .....	43
3.2.2. Sprossbildung bei Stängelstücken von Gewächshausmaterial.....	44
3.2.3. Vergleich der Sprossinduktion aus Stängelstücken von Gewächshaus- und <i>in vitro</i> -Material.....	45
3.2.4. Einfluss der Phytohormone TDZ und IAA auf die Sprossinduktion aus <i>in vitro</i> -Material.....	46
3.2.5. Übersicht der Regeneration von Sprossen zu adulten Pflanzen .....	48
<b>3.3. Etablierung eines Transformationssystems für Hopfen</b> .....	<b>50</b>
3.3.1. Transformation von Stängelstücken und Herstellung transgener Kalli .....	50
3.3.2. Herstellung und Analyse von transgenem Hopfen.....	50
3.3.2.1. Transformation und Regeneration transgener Pflanzen.....	50
3.3.2.2. Nachweis der erfolgreichen Übertragung des Transgens .....	53
3.3.2.3. Nachweis der Expression des Transgens durch GUS-Enzymtests .....	55
3.3.3. <i>In planta</i> -Transformation von Meristemen.....	56
<b>3.4. Optimierung des Transformationssystems</b> .....	<b>56</b>
3.4.1. Ermittlung der optimalen Selektionsbedingungen .....	56
3.4.1.1. Einfluss von Kanamycin auf die Gewebekultur von Hopfen .....	56
3.4.1.2. Einfluss von Cefotaxim auf die Gewebekultur von Hopfen .....	58
3.4.1.3. Einfluss von Timentin auf die Gewebekultur von Hopfen .....	60
3.4.2. Einfluss verschiedener Parameter auf die Sprossinduktion innerhalb der Transformation .....	60
3.4.2.1. Einfluss der Vorkultur der Explantate und des Explantattyps auf die Sprossinduktion.....	61
3.4.2.2. Einfluss der Anzuchtbedingungen von <i>A. tumefaciens</i> .....	61
3.4.2.3. Einfluss der Vakuuminfiltration .....	63
3.4.2.4. Einfluss von Silwet L77 .....	63

---

3.4.2.5. Einfluss der Cokulturbedingungen .....	64
3.4.2.6. Einfluss des zwischenzeitlichen Transfers auf neues Selektionsmedium .....	65
3.4.3. Sprossinduktion innerhalb der Transformation unter optimierten im Vergleich zu nicht optimierten Bedingungen.....	66
<b>3.5. Herstellung transgener Pflanzen mit erhöhter Widerstandskraft     gegen Pathogene.....</b>	<b>68</b>
3.5.1. Herstellung geeigneter Konstrukte zur Erhöhung der Widerstandskraft .....	69
3.5.2. Transformation mit Genen zur Erhöhung der Widerstandskraft.....	74
3.5.3. Untersuchung der regenerierten, potentiell transgenen Pflanzen.....	74
3.5.3.1. DNA-Extraktionsmethoden für die möglichst frühe PCR-Analyse von transformierten Pflanzen.....	74
3.5.3.2. Nachweis des Transgens durch Triplex-PCR.....	75
3.5.4. Vergleich verschiedener Methoden zur Kultivierung des Pathogens <i>Pseudoperonospora humuli</i> (Miy. & Takah.) G. Wils.....	78
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>81</b>
4.1. Vergleich der Regenerationssysteme für Hopfen.....	81
4.2. Vergleich der Transformationssysteme für Hopfen.....	83
4.3. Optimierung der <i>A. tumefaciens</i> -vermittelten Transformation von Hopfen.....	85
4.4. <i>In planta</i> -Transformation bei Hopfen.....	89
4.5. Transformation von Hopfen zur Erhöhung der Widerstandskraft gegen Pathogene.....	90
4.6. Resistenztests zur Untersuchung transgener Pflanzen .....	94
4.7. Ausblick .....	95
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>99</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>101</b>

---

8. Anhang.....	117
8.1. Multiple alignment der über „blastn“ gefundenen homologen Sequenzen .....	117
8.2. Ergebnis des Homologievergleiches der aus Hopfen klonierten Sequenz mit „blastp“.....	118
8.3. Multiple alignment der über „blastp“ gefundenen homologen Sequenzen .....	118
8.4. Restriktionskarte des Plasmids pMPB 1-28 .....	119
8.5. Sequenz von pMPB1-28.....	120
8.6. Restriktionskarte des Plasmids pMPB11-6 .....	123
8.7. Sequenz von pMPB11-6 .....	124
8.8. Sequenzen der Konstrukte zur Erhöhung der Resistenz .....	129
8.8.1. Sequenz des Konstruktes mit <i>NPR1</i> (pMPB 11-6NPR1) .....	130
8.8.2. Sequenz des Konstruktes mit Stilbensynthase (pMPB 11-6Stisy) .....	132
8.8.3. Sequenz des Konstruktes mit T4-Lysozym(pMPB 11-6Lys).....	133
Danksagung.....	135
Curriculum vitae .....	137