



2.10.4 Transformation mit ATHV pBIN19_pTRA#827, EHA101 AKK1467B und GV3101 pMP90 pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy	41
2.10.5 Optimierung der Transformation unter Verwendung des Plasmids pBIN19_pTRA#827 in fünf <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen	41
2.10.6 Optimierung der Transformation unter Verwendung des Plasmids pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy in fünf <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen	42
2.11 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis der Transformation.....	42
2.11.1 Etablierung der DNA-Extraktion aus Blatt- und Kallusgewebe von Apfel	43
2.11.2 Einsatz von Blattmaterial und Kallusgewebe direkt in die PCR.....	44
2.11.3 Nachweis der Transformation mittels PCR.....	44
2.11.4 PCR zum Nachweis der Transformation mit pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy....	44
2.11.5 PCR zum Nachweis der Transformation mit pBIN19_pTRA#827	45
2.12 Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen	46
3. Ergebnisse.....	47
3.1 Etablierung steriler <i>In-vitro</i> -Sprosskulturen	47
3.1.1 Optimierung der Sterilisation und Kultivierung.....	47
3.1.2 Optimierung der Präparation und Kultivierung.....	48
3.2 Optimierung der Proliferation	50
3.2.1 Evaluation des Einflusses der Schichtdicke des Mediums auf die Proliferationsrate von M9/29.....	50
3.3 Optimierung der Regeneration.....	51
3.3.1 Optimierung der Lichtadaptation.....	51
3.4 Verringerung der Hyperhydrizität	51
3.4.1 Verringerung der Hyperhydrizität durch Reduzierung der Phytohormonkonzentration.....	51
3.4.2. Optimierung der Regeneration und Verringerung der Hyperhydrizität durch Variation der Phytohormone und Fructose als Kohlenstoffquelle.....	53
3.4.3 Optimierung der Regeneration und Verringerung der Hyperhydrizität durch Verwendung von Maltose als Kohlenstoffquelle	57
3.4.4 Regeneration von Adventivsprossen aus Pflanzenmaterial mit beginnender Hyperhydrizität	61
3.4.5 Test neuer Kultur-Gefäße bei der Regeneration von Adventivsprossen	61
3.5 Etablierung einer effizienten Selektionsmethode mittels Phosphinotricin (PPT).....	63
3.5.1 Proliferation und Regeneration auf ½MS-Medien	63



3.5.2	Proliferation und Regeneration auf ½N-Medien.....	66
3.5.3	Phosphinotricin-Dose-Response-Test	70
3.6	Plasmide für die Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	72
3.6.1	Isolierung und Charakterisierung der Plasmide pAKK1467B, pGWox::TetR und pCAMGFPCvMV:GWox-6Stisy aus <i>E. coli</i>	72
3.6.2	Isolierung und Charakterisierung des Plasmids pBIN19_pTRA#827 aus <i>A.</i> <i>tumefaciens</i>	74
3.7	Kultur von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	75
3.8	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	75
3.9	Isolierung und Charakterisierung der Plasmide pBIN19_pTRA#827 und pCAMGFP-CvMV:GWox-6Stisy aus <i>A. tumefaciens</i>	77
3.9.1	Überprüfung der transformierten Agrobakterien LBA4404 pGWox::TetR.....	79
3.10	Optimierung der Transformation von M26 mit ATHV pBIN19_pTRA#827, EHA101 pAKK1467B und GV3101 pMP90 pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy	81
3.11	Optimierung der Transformation unter Verwendung des Plasmids pBIN19_pTRA#827 in fünf <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen.....	83
3.12	Optimierung der Transformation unter Verwendung des Plasmids pCAMGFP- CvMV::GWox-6Stisy in fünf <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen	85
3.13	Nachweis der Transformation mittels PCR.....	88
3.13.1	Etablierung der DNA-Extraktion aus Blattmaterial und Kallusgewebe von Apfelunterlagen	88
3.13.2	Nachweis der Transformation mit pCAMGFP::CvMV::GWox-6Stisy	89
3.13.3	Nachweis der Transformation mit pBIN19_pTRA#827.....	90
4.	Diskussion	91
4.1	Etablierung steriler <i>In-vitro</i> -Sprosskulturen von M9/29	91
4.2	Optimierung der Proliferation	92
4.3	Optimierung der Regeneration	93
4.4	Reduzierung der Hyperhydrität.....	93
4.5	Etablierung einer effizienten Selektionsmethode mittels Phosphinotricin.....	95
4.6	Kultur und Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	96
4.7	Optimierung der <i>A. tumefaciens</i> -vermittelten Transformation von <i>Malus In-</i> <i>vitro</i> -Kulturen.....	97
4.8	Molekularbiologischer Nachweis des Transgens im Gewebe	98



5. Zusammenfassung	101
5. Summary	103
6. Quellen	105
7. Anhang	113
7.1 Herstellerverzeichnis	113
7.2 Plasmidkarten.....	116
7.3 Primer.....	119
7.4 PCR-Programme	120



Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1:	Apfel (<i>Pyrus malus</i> L).	1
Abbildung 1.2	Pfropfstelle an einem alten und einem jungen Apfelbaum.	2
Abbildung 1.5:	Bändermodell und Absorptionsspektrum von GFP.	6
Abbildung 2.1.1:	M9/29-Unterlagen im Gewächshaus.	8
Abbildung 2.1.2:	M26 <i>In-vitro</i> -Kultur.	9
Abbildung 2.4.2:	Ablauf der Inkulturnahme von M9/29-Sprossen.	17
Abbildung 2.4.3.1:	Kulturschrank mit verschiedenen Apfel <i>In-vitro</i> -Kulturen.	18
Abbildung 2.4.4.1:	Herstellung der Explantate.	20
Abbildung 2.4.5.4:	Hyperhydrizität in der <i>In-vitro</i> -Kultur.	23
Abbildung 2.4.5.5:	Kulturgefäße für die Regeneration von Adventivsprossen.	24
Abbildung 2.6:	Kultivierung von <i>N. benthamina</i> im Gewächshaus.	28
Abbildung 2.10.2:	Stereomikroskop Stemi SV6 mit Fluoreszenzeinrichtung.	40
Abbildung 3.1.1:	Inkulturnahme: Vitale Sprosse nach verschiedenen Sterilisationsmethoden und IBA-Konzentrationen.	48
Abbildung 3.1.2-1:	Präparationstechniken bei der Inkulturnahme.	49
Abbildung 3.1.2-2:	Inkulturnahme: Vitale Sprosse bei verschiedenen Präparationstechniken und IBA-Konzentrationen.	49
Abbildung 3.4.2-1:	Regeneration auf Medium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und Phytohormonen: Anteil der Explantate, mit mindestens einem Adventivspross.	54
Abbildung 3.4.2-2:	Regeneration auf Medium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und Phytohormonen: Anzahl neu gebildeter Sprosse pro eingesetztem Explantat.	55
Abbildung 3.4.2-3:	Regeneration auf Medium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und Phytohormonen: Anteil der Explantate (%) mit mindestens einem hyperhydrischen Spross.	56
Abbildung 3.4.2-4:	Regenerationsrate und Anteil hyperhydrischer Sprosse von M9/29 auf Regenerationsmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen und Phytohormonen.	56
Abbildung 3.4.3-1:	Vitalität der Explantate bei Inkubation auf maltose- und glucose- bzw. sorbithaltigem Regenerationsmedium.	57



Abbildung 3.4.3-2:	Kallusbildung auf Regenerationsmedium mit Maltose und Glucose- bzw. Sorbit.	58
Abbildung 3.4.3-3:	Regenerationseffizienz bei Inkubation auf maltose- und glucose- bzw. sorbithaltigem Medium.	59
Abbildung 3.4.3-4:	Hyperhydrizität auf Regenerationsmedium mit Maltose und Glucose- bzw. Sorbit.	60
Abbildung 3.4.5-1:	Test von Kulturgefäßen bei der Regeneration von Adventivsprossen: Explantate (%) mit mindestens einem neu gebildeten Spross und Anteil an hyperhydrischen Sprossen.	62
Abbildung 3.4.5-1:	Test von Kulturgefäßen bei der Regeneration von Adventivsprossen: Vitale und hyperhydrische Sprosse pro Explantat.	62
Abbildung 3.5.1-1:	M26-Proliferation auf Medium mit 1x oder ½x Konzentration der MS-Salze: Anzahl neugebildete Triebe pro eingesetztem Einzelspross.	64
Abbildung 3.5.1-2:	Regenerationsrate von M26 auf Regenerationsmedium mit 1x bzw. ½x MS-Salzkonzentration.	65
Abbildung 3.5.1-3:	Regeneration von M26 auf 1x bzw. ½x MS-Salzkonzentration: Anzahl gebildeter Sprosse pro Explantat.	66
Abbildung 3.5.2-1:	M9-Sprosse auf ProIM9-½N-Medium mit Verfärbungen.	67
Abbildung 3.5.2-2:	M9/29-Proliferation auf Medium mit 1x und ½x Stickstoffgehalt: Anzahl gebildeter Sprosse pro Ausgangsspross.	67
Abbildung 3.5.2-3:	M26-Proliferation auf Medium mit 1x und ½x Stickstoffgehalt: Anzahl gebildeter Sprosse pro eingesetztem Spross.	68
Abbildung 3.5.2-4:	Regenerationsrate und Hyperhydrizität der M26-Explantate auf Medium mit 1x und ½x Stickstoffkonzentration.	69
Abbildung 3.5.2-5:	M26-Explantate mit Adventivsprossen auf RegG-½N-Medium und RegG-Medium.	69
Abbildung 3.5.3:	Phosphinotricin-Dose-Response-Test: Kallusbildung und Sprossbildung der M26-Explantate bei unterschiedlichen PPT-Konzentrationen.	71
Abbildung 3.6.1:	Gelelektrophorese der Analyse mittels Restriktionsendonukleasen der Plasmide pAKK1467B, pGWox-6Stisy und pGWox::TetR.	73
Abbildung 3.8:	Agrobakterien-Stämme ATHV, GV3101 pMP90, LBA4404, LBA4404-2812 und LBA4404-2915 nach der erfolgreichen Transformation mit pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy.	76
Abbildung 3.9-1:	Gelelektrophorese der Analyse mittels Restriktionsendonuklease NcoI des Plasmids pBIN19_pTRA#827.	78



Abbildung 3.9-2:	Gelelektrophorese der Analyse mittels Restriktionsendonuklease EcoRI des Plasmids pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy.	79
Abbildung 3.9.1:	Gelelektrophorese der Analyse mittels Restriktionsendonuklease BamHI von pGWox::TetR aus LBA4404.	80
Abbildung 3.10-1:	GFP-Fluoreszenz ATHV pBIN19_pTRA#827	81
Abbildung 3.10-2:	GFP-Fluoreszenz EHA101 pAKK1467B.	81
Abbildung 3.10-3:	GFP-Fluoreszenz von GV3101 pMP90 pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy in Kallusgewebe.	82
Abbildung 3.11-1:	GFP-Expression bei M26-Explantaten nach der Transformation mit pBIN19_pTRA#827 mittels verschiedener <i>A. tumefaciens</i> -Stämme.	83
Abbildung 3.11-2:	Transformation mit pBIN19_pTRA#827: Explantate mit GFP-Fluoreszenz.	84
Abbildung 3.11-3:	Transformation mit pBIN19_pTRA#827: Explantate mit GFP-Fluoreszenz in Kallusgewebe.	85
Abbildung 3.12-1:	GFP-Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> -Explantaten 48 h nach der Transformation mit pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy mittels verschiedener <i>A. tumefaciens</i> -Stämme.	86
Abbildung 3.12-2:	GFP-Expression in M26-Explantaten nach der Transformation mit dem Plasmid pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy mittels verschiedener <i>A. tumefaciens</i> -Stämme.	86
Abbildung 3.12-3:	Transformation mit Plasmid pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy in fünf <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen: Anteil der Explantate mit GFP-Fluoreszenz.	87
Abbildung 3.12-4:	Transformation mit Plasmid pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy in fünf <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen: Anteil der Explantate mit GFP-Fluoreszenz in Kallusgewebe.	88
Abbildung 3.13.1:	PCR zum Nachweis von DNA mittels 18S-Primern in Proben von Kallus- und Blattgewebe.	89
Abbildung 3.13.2:	Gelelektrophorese der PCR mit Stilbensynthase- und VirG-Primern zum Nachweis der Transformation mit pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy.	89
Abbildung 3.13.3:	Gelelektrophorese der PCR mit nptII- und VirG-Primern zum Nachweis der Transformation mit pBIN19_pTRA#827.	90
Abbildung 7.2-1:	Plasmidkarte des binären Vektors pAKK1467B.	116
Abbildung 7.2-2:	Plasmidkarte von pBIN19_pTRA#827.	117



Abbildung 7.2-3:	Plasmidkarte von pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy.	117
Abbildung 7.2-4:	Plasmidkarte von pGWox::TetR.	118



Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.2.1:	Übersicht der verwendeten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme und Antibiotika-Resistenzen	10
Tabelle 2.3:	Verwendete Plasmide zur Optimierung der genetischen Transformation von Apfelunterlagen.	12
Tabelle 2.4.1-1:	Zusammensetzung der Mikro- und Makroelemente des Murashige & Skoog Mediums.	13
Tabelle 2.4.1-2a:	Zusammensetzung der Gewebekulturmedien für die Inkulturnahme und Proliferation.	14
Tabelle 2.4.1-2b:	Zusammensetzung der Gewebekulturmedien für die Regeneration.	15
Tabelle 2.4.1-2c:	Zusammensetzung der Gewebekulturmedien für die Transformation.	16
Tabelle 2.7.1-1:	Zusammensetzung des LB-Mediums für die Bakterienkultur.	29
Tabelle 2.7.1-2a:	Verwendete Antibiotika-Konzentrationen bei der Selektion der sechs <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stämme.	29
Tabelle 2.7.1-2b:	Verwendete Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion der binären Vektoren.	30
Tabelle 2.7.4	Kulturbedingungen der verschiedenen Bakterienflüssigkulturen.	31
Tabelle 2.8.2:	Lysepuffer für die DNA-Präparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	32
Tabelle 2.8.4-1:	Zusammensetzung der Analyse mittels Restriktionsendonukleasen des Plasmids pAKK1467B aus <i>E.coli</i> .	34
Tabelle 2.8.4-2:	Zusammensetzung des enzymatischen Verdaus mit Restriktionsendonuklease NcoI des Plasmids pBIN19_pTRA#827 aus <i>A. tumefaciens</i> .	34
Tabelle 2.8.4-3:	Zusammensetzung der Analyse mittels Restriktionsendonuklease EcoRI des Plasmids pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy aus <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .	34
Tabelle 2.8.4-4:	Zusammensetzungen der Analyse mittels Restriktionsendonuklease des Plasmids pGWox::TetR aus <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .	35
Tabelle 2.8.4-5:	Schema der Kontrolle mit λ -DNA, unter Verwendung von einer (a) oder zwei (b) Restriktionsendonukleasen.	35



Tabelle 2.9:	Varianten des Protokolls zur Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	36
Tabelle 2.9.1:	Zusammensetzung SOC-Medium.	38
Tabelle 2.11.1:	Pipettierschema der PCR mit 18S-Primern.	43
Tabelle 2.11.4:	Zusammensetzung der PCR-Ansätze zum Nachweis einer Transformation mit pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy.	45
Tabelle 2.11.5:	Zusammensetzung der PCRs zum Nachweis der Transformation mit pBIN19_pTRA#827.	46
Tabelle 3.6.1:	Photometrische Messung der DNA-Isolierung der Plasmide pAKK1467B, pGWox-6Stisy und pGWox::TetR aus <i>E.coli</i> .	72
Tabelle 3.6.2:	Photometrische Messung der pBIN19_pTRA#827 Plasmid-DNA zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit.	74
Tabelle 3.7:	Optische Dichte (OD ₆₀₀) der <i>A. tumefaciens</i> -Kulturen von ATHV, EHA101, GV3101 pMP90 (GV3101), LBA4404, LBA4404-2812 (2812) und LBA4404-2915 (2915).	75
Tabelle 3.8:	Transformation von sechs <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen mit vier GFP-Plasmiden.	77
Tabelle 3.9:	Photometrische Messung der Plasmide pBIN19_pTRA#827 und pCAMGFP-CvMV::GWox-6Stisy aus je fünf <i>A. tumefaciens</i> -Stämmen.	78
Tabelle 7.3-1:	PCR-Programm Mango53	120
Tabelle 7.3-2:	PCR-Programm Mango60.	120



Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
ddH ₂ O	Reinstwasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FeEDDHA	Eisen-Ethylendiamin-di(o-hydroxyphenylazetat)
FeNaEDTA	Eisen-Natrium-Ethylendiamintetraazetat
g	Gramm
*g	Gravitation (1 x g = 9,80665 m/s ²)
GA ₃	Gibberellinsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
IBA	Indolbuttersäure
IK1	Medium für die Inkulturnahme neuer Triebspitzen
IK2	Medium für die Inkulturnahme neuer Triebspitzen
kb	Kilobasen
KOH	Kaliumhydroxid (Kalilauge)
l	Liter
LB	Left Border der T-DNA
LB-Medium	Luria Bertani (Bertani, 1951)
M	Molar
max.	maximal
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter