



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Apfel.....	1
1.2 Apfelunterlagen.....	2
1.3 Apfel <i>In-vitro</i> -Kultur.....	3
1.3.1 Hyperhydrizität.....	3
1.3.2 Genetische Transformation von Apfel.....	4
1.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
1.5 Das grün fluoreszierende Protein.....	6
1.6 Ziel dieser Arbeit.....	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Pflanzenmaterial.....	8
2.1.1 Apfelunterlage M9/29.....	8
2.1.2 Apfelunterlage M26.....	8
2.1.3 <i>Nicotiana benthamina</i> D.....	9
2.2 Bakterienmaterial.....	9
2.2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	11
2.3 Binäre Vektoren zur Optimierung der Transformation von Apfelunterlagen.....	11
2.4 <i>In-vitro</i> -Kultur der Apfelunterlagen.....	12
2.4.1 Medien für die <i>In-vitro</i> -Kultur.....	12
2.4.2 Etablierung steriler <i>In-vitro</i> -Sprosskulturen.....	16
2.4.3 Proliferationsexperimente.....	18
2.4.3.1 Proliferationstechnik.....	18
2.4.3.2 Evaluation des Einflusses der Schichtdicke des Mediums auf die Proliferationsrate von M9/29....	19
2.4.4 Regenerationsexperimente.....	19
2.4.4.1 Regenerationstechnik.....	19
2.4.4.2 Optimierung der Lichtadaptation.....	20
2.4.5 Reduzierung der Hyperhydrizität.....	21
2.4.5.1 Reduzierung der Hyperhydrizität durch Medium mit reduzierter Phytohormonkonzentration.....	21
2.4.5.2 Optimierung der Regeneration und Reduzierung der Hyperhydrizität durch Variation der Phytohormone und Fructose als Kohlenstoffquelle.....	22



2.4.5.3	Optimierung der Regeneration und Verringerung der Hyperhydrität durch Verwendung von Maltose als Kohlenstoffquelle	23
2.4.5.4	Regeneration aus Pflanzenmaterial mit beginnender Hyperhydrität	23
2.4.5.5	Test neuer Kultur-Gefäße für die Regeneration von Adventivsprossen	24
2.5	Etablierung einer effizienten Selektionsmethode mittels Phosphinotricin (PPT).....	25
2.5.1	Proliferation und Regeneration auf Medium mit halbiertes Konzentration der MS-Salze	25
2.5.1.1	Proliferation auf Medium mit halbiertes Konzentration der MS-Salze	25
2.5.1.2	Regeneration auf Medium mit halbiertes Konzentration der MS-Salze	26
2.5.2	Proliferation und Regeneration auf Medium mit halbiertes Stickstoffkonzentration	26
2.5.2.1	Proliferation auf Medium mit halbiertes Stickstoffkonzentration	26
2.5.2.2	Regeneration auf Medium mit halbiertes Stickstoffkonzentration	27
2.5.3	Phosphinotricin-Dose-Response-Test	27
2.6	Kultivierung von <i>Nicotiana benthamiana</i> D.	28
2.7	Bakterienkultur	29
2.7.1	Medium für die Bakterienkultur	29
2.7.2	Vereinzelungsausstriche	30
2.7.3	Wachstumskurven.....	30
2.7.4	Flüssigkultur	31
2.7.5	Glycerindauerkultur	31
2.8	Molekularbiologische Methoden in der Bakteriologie	31
2.8.1	DNA-Isolierung aus <i>Escherichia coli</i>	31
2.8.2	DNA-Isolierung aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.8.3	Photometrische Messung der DNA-Konzentration und Reinheit.....	33
2.8.4	DNA-Analyse mittels Restriktionsendonukleasen	33
2.8.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	35
2.9	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
2.9.1	Herstellung und Transformation von elektro-kompetenten <i>A. tumefaciens</i>	37
2.9.2	Herstellung und Transformation von chemisch-kompetenten <i>A. tumefaciens</i>	38
2.10	Pflanzentransformation.....	39
2.10.1	Agrobakterien-Suspension für die Pflanzentransformation	39
2.10.2	Transformationsmethode <i>Malus</i>	39
2.10.3	Transformationsmethode <i>Nicotiana benthamiana</i>	40



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 Hyperhydrität	51
3.4.1 Verringerung der Hyperhydrität durch Reduzierung der Phytohormonkonzentration.....	51
3.4.2. Optimierung der Regeneration und Verringerung der Hyperhydrität durch Variation der Phytohormone und Fructose als Kohlenstoffquelle.....	53
3.4.3 Optimierung der Regeneration und Verringerung der Hyperhydrität durch Verwendung von Maltose als Kohlenstoffquelle	57
3.4.4 Regeneration von Adventivsprossen aus Pflanzenmaterial mit beginnender Hyperhydrität	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. 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- 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