

# 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        |

# Inhaltsverzeichnis

|   |            |
|---|------------|
| <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> |