

**Förderrichtlinie des Thüringer Ministeriums für Landwirtschaft, Forsten,
Umwelt und Naturschutz „Innovationsförderung in der Land-und
Ernährungswirtschaft“ Thür. StAnz. Nr. 29/2009**

Forschungsprojekt
„Sicherung und Management genetischer Ressourcen bei schnellwachsenden
Gehölzen als nachwachsende Rohstoffe“

Bearbeitet vom 01.03.2011 – 15.11.2013

Abschlußbericht

Gliederung:

- Etablierung von In-vitro-Kulturen
- Lagerung von In-vitro-Kulturen
- Depotmanagement
- Molekulargenetische und immunologische Untersuchungen

Wir danken dem TMLFUN für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden
Arbeiten.

Vogtei, OT Oberdorla im Januar 2014

Etablierung von In-vitro-Kulturen

Im Labor der Baumschulen Oberdorla GmbH wurden nachfolgend aufgelistete Arten in-vitro etabliert, subkultiviert und im Depot eingelagert.

Prunus avium

Für die in-vitro-Etablierung standen Reiser diverser Klone zur Verfügung. Diese wurden bei Zimmertemperatur vorgetrieben. Nach ca. 1 Woche (die Knospen waren angeschwollen und zeigten erste grüne Spitzen) wurden die Terminal- und Lateralknospen herausgeschnitten und mit einer 0,1%igen Hg-Cl₂-Lösung sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Die Sterilisierzeit wurde nach den im Labor gesammelten Erfahrungen bei der Verwendung von Reisermaterial von 3,5min auf 5,5 min erhöht.

Nach der Oberflächensterilisation wurden die Knospenschuppen entfernt und jedes einzelne Explantat in ein mit Nährmedium gefülltes Kulturröhrchen der Abmessung 8 cm x 2,5 cm übertragen. Als Nährmedium wurde QL-Medium mit einer Hormonkonzentration pro Liter von 0,01ppm IBS, 0,75 ppm BAP, 1,0ppm GA³, 3% Saccharose und 7g/L Agar verwendet.

Die Weiterkultur erfolgt im Klimaraum bei 22°C und 16 h Licht. Die erste Auswertung erfolgt nach 6 Wochen. Die ausgetriebenen sterilen Explantate wurden aus den Kulturröhrchen entnommen und in runden Plastikbechern mit einem Durchmesser von 7cm zur Weiterkultur übertragen.

Als Nährmedium wurde QL-Medium mit einer Hormonkonzentration pro Liter von 0,01ppm IES, 0,75ppm BAP und 1,0 ppm GA₃ verwendet.

Im Berichtszeitraum wurden insgesamt 84 Klone erfolgreich in-vitro etabliert. Dazu wurden insgesamt 877 Explantate präpariert. Die Subkulturen erfolgten auf MS- und QL-Medien mit einer Hormonkonzentration pro Liter von BAP 0,5 ppm bis 0,75 ppm und einer GA₃-Konzentration von 0,75 ppm bis 1,0 ppm. Die einzelnen Klone zeigten sehr unterschiedliche Vermehrungsraten. Diese variierten von 2,2 bis 3,5.



Abb. 1: Ausgetriebene sterile Explantate von *Prunus avium* (4 Wochen nach in-vitro Etablierung)

Salix-Hybriden

Für die in-vitro-Etablierung standen überwinterte Mutterpflanzen zur Verfügung, von denen Reiser geschnitten und bei Zimmertemperatur angetrieben wurden. Bei einem deutlichen Austrieb von ca. 2cm Länge wurden die Spitzen und Seitenknospen geschnitten und einer Oberflächensterilisation mit 0,1% Hg-Cl₂-Lösung und 3maligem Waschen mit sterilem Wasser unterzogen. Die Sterilisierzeit wurde auf 3,5min begrenzt, da die Austriebe sehr weich waren und eine Schädigung des Materials zu befürchten war. Dieses Procedere hat sich im Labor bei verschiedenen Kulturen als optimale Variante erwiesen.

Insgesamt wurden 9 Klone mit insgesamt 231 Explantaten in Kultur genommen. Jedes Explantat wurde einzeln in mit WPM-Medium gefüllte Kulturröhrchen übertragen und im Klimaraum bei 22°C und 16h Licht kultiviert.

Nach 4 Wochen erfolgt die erste Auswertung mit folgendem Ergebnis. Alle 9 Klone konnten erfolgreich etabliert werden. Die Explantate waren ca. 1cm ausgetrieben. Die erste Subkultur erfolgte auf hormonfreiem WPM-Medium mit 500 mg/L Aktivkohle und 7g/L Agar. Die Sprosse wurden in Standard-Plastikbecher mit einem Durchmesser von 78mm und einer Höhe von 60 mm kultiviert.

Im Verlauf der weiteren Kultur im Klimaraum war ein deutliches Längenwachstum zu beobachten, ein Teil der Sprosse hatte nach 3 Wochen Kulturzeit bereits die Becherdeckel erreicht. In einer Versuchsreihe sollte deshalb getestet werden, ob durch die Verwendung höherer Kulturgefäße eine deutliche Zunahme der Sproßlänge und Axillarsproßbildung und damit eine Erhöhung der Vermehrungsraten erreicht werden kann.

Als Kulturgefäße wurden Gläser mit einer Höhe von 85mm und 200mm verwendet. Im Vergleich zur Kultur in Plastikbechern konnte zwar eine deutliche Zunahme des Längenwachstums beobachtet werden, das aber nur auf eine Streckung der Internodien zurückzuführen war. Eine Axillarsproßbildung war bei keinem Klon zu beobachten. In Auswertung dieser Beobachtungen wurde die Wirkung verschiedener Cytokinin-Konzentrationen auf die Vermehrungsraten bei den einzelnen Klonen getestet. Als Nährmedium wurde WPM-Medium mit 500 mg/L Aktivkohle unter Zugabe von Cytokinin (BAP) in den Konzentrationen pro Liter von 0,2 ppm, 0,5ppm und 1,0 ppm verwendet. Es wurden 3Klone ausgewählt und pro Klon und Nährmedienvariante 120 Sprosse in Plastikbecher mit einer Höhe von 7,5cm. übertragen und im Klimaraum bei 22°C und 16h Licht kultiviert. Nach 4 Wochen Kulturzeit erfolgte die Auswertung mit folgenden Ergebnissen:

Klon-Nr.	Vermehrungsraten			
	0,2 ppm BAP	0,5 ppm BAP	1,0 ppm BAP	Kontrolle
6/87	2,1	2,2	2,2	2,2
84/55	2,7	2,4	2,4	2,8
305/64	3,0	3,2	3,3	4,3

Die Vermehrungsraten der cytokinin-haltigen Varianten im Vergleich zur hormonfreien Kontrolle konnten nicht erreicht werden. Eine Verbesserung der Seitentriebbildung konnte ebenfalls nicht erreicht werden. Es ist zu vermuten, dass die Wirkung des Cytokinins durch die Verwendung von Aktivkohle herabgesetzt bzw. vollständig inaktiviert wurde. Der Versuch wurde deshalb ohne Verwendung von Aktivkohle wiederholt.

Die 3 Klone zeigten nach 4-wöchiger Kulturzeit im Klimaraum eine starke Veränderung der Sproßqualität. Die Sprosse waren gedrunken und die Blattgrößen deutlich verringert. Erwartungsgemäß war der stärkste Einfluß des Cytokinins bei der Konzentration von 1,0 ppm BAP zu beobachten. Die Sprosse wiesen ein geringes Längenwachstum auf, so dass eine Teilung der Sprosse in Segment mit Axillarknospen nicht möglich war. Eine Seitentriebbildung konnte bei keiner der 3 Varianten beobachtet werden. Als optimal für die Vermehrung der Salix-Hybriden hat sich ein Subkulturintervall von 4 bis 6 Wochen auf hormonfreiem WPM-Medium mit 500 mg/L Aktivkohle, 3% Saccharose und 7g/L Agar erwiesen.

Die Sprosse werden dabei in Spitzen und Teilstücke mit einem Blattpaar geteilt. Eine Verlängerung der Kulturzeit zwischen den Vermehrungsphasen bewirkt keine Erhöhung der Vermehrungsraten, vielmehr ist ein starkes Wurzelwachstum zu beobachten, dass die Handhabung der Sprosse bei nachfolgender Subkultur erheblich erschwert.

10 Klone konnten in das Depot des Labors überführt werden.

Robinia pseudoacacia

Für die in-vitro-Etablierung standen im Gewächshaus vorgetriebene Töpfe von insgesamt 9 Klonen zur Verfügung. Von jedem Klon wurden Sproßspitzen und Lateralknospen mit ca. 0,5cm langen Stängelstück präpariert und 3,5min mit einer 0,1% Hg-Cl₂ –Lösung sterilisiert und mit sterilisiertem Wasser gewaschen. Jedes einzelne Explantat wurde in ein mit Nährmedium gefülltes Kulturröhrchen der Abmessung 8 cm x 2,5 cm überführt. Als Etablierungsmedium wurde QL-Medium mit einer Hormonkonzentration pro Liter von 0,01ppm IBS, 0,5ppm BAP und 1,0 ppm GA₃), 3,0% Saccharose und 7g/L Agar verwendet.

Insgesamt konnten 281 Explantate präpariert werden. Nach 6 Wochen Kulturzeit im Klimaraum bei 22°C und 16 h Licht erfolgte die erste Auswertung. 157 Explantate konnten erfolgreich in-vitro etabliert werden. Die Explantate waren ca. 1cm ausgetrieben, zeigten aber an der Basis eine starke Kallusbildung. Für die nachfolgenden Subkulturen wurden sowohl WPM- als auch C₂D-Medium mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen getestet.

Varianten	IES mg/L	BAP mg/L	GA ₃ mg/L
1	0,01	0,1	1,0
2	0,01	0,3	1,0
3	0,01	0,5	1,0
4	0,01	1,0	1,0

Die Varianten 3 und 4 erwiesen sich als wenig geeignet. Die Sprosse zeigten eine starke Kallusbildung, die auf eine zu hohe Cytokininkonzentration schließen lässt. Für die weiteren Subkulturen wurde deshalb nur noch WPM-Medium mit der Hormonkonzentration Variante 2 verwendet. Alle 9 Klone konnten stabil in-vitro vermehrt werden. Die Vermehrungsraten der einzelnen Klone liegen zwischen 2,2 und 2,8.

Alnus glutinosa

Für die Etablierung von *Alnus glutinosa* wurde zunächst Forstsaatgut verwendet. Das Saatgut wurde steril sowohl auf Filterpapier in Petrischalen (10 Samen/Schale)als auch in mit QL-Medium gefüllten Kulturröhrchen (5 Samen/Röhrchen) ausgesät. Die Samen wurden dazu 6 min mit einer 0,1% Hg-Cl₂-lösung behandelt und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Es wurden jeweils 100 Samen pro Variante ausgesät .Ein Teil des Saatgutes wurde direkt in Erde gesät. Bei den steril ausgesäten Varianten konnten keine „sauberen“ Sämlinge erhalten werden. Bereits nach 5 Tagen zeigten sich die ersten pilzlichen Kontaminationen.

Es wurde deshalb ein neuer Versuch angelegt und die Sterilisierzeit um 50% erhöht. Dazu wurden von jeder Variante jeweils 100 Samen sterilisiert und steril aufgelegt. Die Kontaminationen zeigten sich beim zweiten Versuch zeitverzögert, aber auch bei diesen Varianten konnte kein „sauberer“ Sämling erhalten werden.

Bei einem weiteren Versuch wurde aus den sterilisierten Samen jeweils der Embryo präpariert und in Kulturröhrchen überführt. Die Präparation der Samen stellte sich als sehr zeitaufwendig und letztlich nicht erfolgreich heraus. Die Embryonen waren trotz sorgfältiger Präparation oft verletzt bzw. kontaminiert. Ein Teil des Saatgutes wurde deshalb direkt in Erde ausgesät und die Sämlinge im Gewächshaus kultiviert. Die Sämlinge wurden frostfrei überwintert und bei Zimmertemperatur im zeitigen Frühjahr angetrieben.

6 Sämlinge zeigten eine sehr gute Entwicklung und wurden als Explantatspender ausgewählt. Es wurden von jedem Sämling sowohl die Terminal- als auch die Lateralknospen geschnitten, und 5,5 min mit einer 0,1%igen Hg-Cl₂-Lösung sterilisiert und 3mal mit sterilem Wasser gewaschen. Von den so vorbereiteten Explantaten wurden die Hüllblätter entfernt und die Explantate mit einer Größe von ca. 0,3 bis 0,5 cm und einem Stängelstück einzeln in mit QL-Medium gefüllte Kulturröhrchen übertragen und im Kulturraum bei 22°C und 16 h Licht kultiviert. Insgesamt wurden 6 Terminal- und 35 Lateralknospen präpariert. Nach 1Woche erfolgt die erste Kontrolle

Die Explantate zeigten noch keine Kontaminationen. Nach weiteren 3 Wochen Kulturzeit erfolgt die 1.Auswertung der Etablierung. 19,5% der Explantate wiesen pilzliche Kontaminationen auf, 29,3 % waren abgestorben. Von allen 6 Sämlingen waren Explantate ausgetrieben und wurden weiter subkultiviert.

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten nur 3 Klone erhalten werden, der in einer sehr guten Qualität vorhanden sind.

Neben der Verwendung von Forstsaatgut wurden Versuche unter Verwendung von Reisermaterial angelegt. Dazu wurden die Reiser von 16 Klonen bei Zimmertemperatur angetrieben. Nach dem sich die ersten grünen Spitzen sowohl bei den Terminal-, als auch bei den Lateralknospen zeigten, wurden die Knospen mit Stängelstück geschnitten und 5,5min mit 0,1%Hg-Cl₂-Lösung und anschließend 3maligem Spülen mit sterilem Wasser desinfiziert. Die Knospen wurden anschließend präpariert (Hüllblätter) entfernt und in mit QL-Medium gefüllt Kulturröhrchen einzeln übertragen. Pro Klon wurden in einem ersten Versuch jeweils 18 Explantate aufgelegt.

Die Auswertung des Versuches ergab, das 54% der aufgelegten Explantate sowohl pilzliche als auch bakterielle Kontaminationen aufwiesen.12% der Explantate waren verbräunt und abgestorben. 34% der Explantate zeigten nach 4 Wochen Kulturzeit im Klimaraum einen ca. 1cm langen Austrieb. Die Explantate wurden einzeln aus den Kulturröhrchen entnommen und auf WPM-Medium mit 0,01ppm IES und 0,3ppm

BAP subkultiviert. Alle Klone konnten mit Vermehrungsraten von 1,5 bis 2,3 erfolgreich vermehrt werden und in das laboreigene Depot überführt werden.



Abb. 2: Alnus glutinosa auf Vermehrungsmedium

Acer pseudoplatanus

Zur Etablierung stand Forstsaatgut zur Verfügung. Parallel zur Etablierung von Alnus glutinosa wurden die gleichen Versuche mit Saatgut von Acer pseudoplatanus durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche bei beiden Kulturen wichen nur unwesentlich voneinander ab. Die Kontaminationsrate war extrem hoch, so dass eine Aussaat in Erde zur Gewinnung von Sämlingsmaterial durchgeführt wurde.

Nach Überwinterung der gekeimten Sämlinge wurden diese analog des Procedere von Alnus glutinosa bei Zimmertemperatur angetrieben, geschnitten, sterilisiert, präpariert und etabliert. Insgesamt wurden 10 Sämlinge in –vitro etabliert und erfolgreich mit Vermehrungsraten von 1,2 bis 2,3 über mehrere Subkulturen erhalten und ins laboreigene Depot überführt.

Populus tremula x tremuloides

Zur Etablierung standen überwinterte Pflanzen zur Verfügung, von denen Reiser geschnitten und bei Zimmertemperatur angetrieben wurden. Bei einem Austrieb von ca. 2cm Länge wurden die Sproßspitzen und Seitenknospen entfernt, einer 3,5minütigen Oberflächensterilisation mit 0,1% iger Hg-Cl₂ –lösung und 3-maligem Waschen mit sterilem Wasser unterzogen und anschließend in mit QL-Medium befüllten Röhrchen übertragen, die bei 22°C und 16 h Licht kultiviert wurden. Insgesamt wurden 120 Explantate in Kultur genommen. Nach 4 Wochen erfolgt die Auswertung der Etablierungsversuche. 21% der Explantate wiesen pilzliche, vereinzelt auch bakterielle Kontaminationen auf. 8% der Explantate waren braun und abgestorben, 71% waren grün und zeigten bereits ein deutliches Längenwachstum. Die Explantate wurden zur weiteren Subkultur entnommen und auf MS-Medium mit IES 0,01ppm, 0,3ppm BAP subkultiviert.

Die Vermehrungsraten der einzelnen Klone wiesen deutliche Unterschiede auf. Über 7 Subkulturen konnten nur Vermehrungsraten zwischen 1,0 und 1,8 erreicht werden. Auffällig ist bei allen Klonen, dass die Blätter sehr weich sind und das Material bei

der Bearbeitung (Schneiden der Mikrostecklinge) sehr schnell Trockenerscheinungen (Blätter rollen sich zusammen und verlieren an Spannung) zeigten. Insgesamt konnten 15 Klone ins Depot überführt werden.

Betula pubescens

Zur Etablierung stand Reisermaterial von 15 Klonen zur Verfügung. Diese wurden bei Zimmertemperatur angetrieben. Nach 1 Woche zeigten sich sowohl an den Terminal- als auch an den Lateralknospen erste grüne Spitzen. Die Knospen wurden mit einem Stängelstück aus den Reisern geschnitten und 5,5min mit 0,1% Hg-Cl₂-Lösung sterilisiert. Nach 3-maligem Waschen mit sterilem Wasser wurden von jedem Explantat die Hüllblätter entfernt und die ca. 0,3 bis 0,5 mm großen Explantate einzeln in mit QL-Medium und einer Cytokininkonzentration von 0,01ppm/L IES und 0,5ppm/L BAP übertragen.-

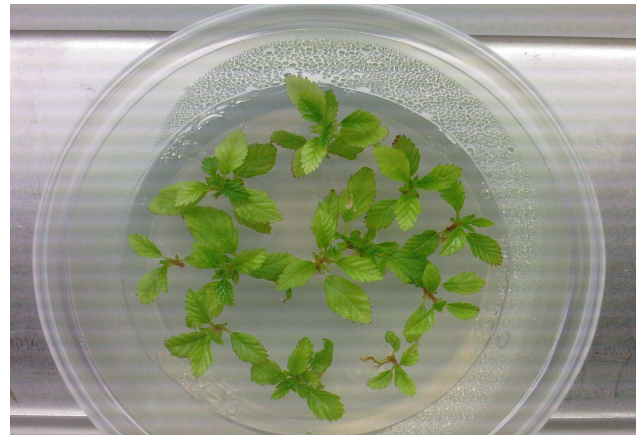


Abb. 3: links. Ausgetriebene sterile Explantate von Betula pubescens, rechts: Betula pubescens auf Vermehrungsmedium

Lagerung der In-vitro-Kulturen

Nach erfolgreicher Etablierung des Klon-Materials verschiedener Arten ist die sichere Lagerung über längere Zeiträume von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung des Pflanzenmaterials.

Vorraussetzung für eine sichere Lagerung ist zunächst eine über mehrere Subkulturen stabile Vermehrungsrate von > 1,5, die nach der Lagerung auch eine Revitalisierung des Klon-Materials zu lassen.

Die etablierten Klone der verschiedenen Arten wurden bei + 2°C sowohl im Dunkeln als auch unter Langtagbedingungen eingelagert. Dazu wurden verschiedene Gefäßtypen, Pflanzenmengen, Kulturmedien und Explantattypen getestet. Vor Einlagerung wurden die Klone nach Subkultur zunächst 2-3 Wochen unter Langtagsbedingungen und „normale“ Temperaturen im Klimaraum vorkultiviert.

Prunus avium.

Für die Lagerung wurden folgende Gefäßtypen getestet: Plastikbecher rund (Durchmesser 78mm) und sterile Kulturröhrchen (Durchmesser 10 mm, Höhe 100mm).

Pro Becher wurden 5 und pro Kulturröhrchen 1 Mikrosteckling kultiviert. Als Kulturmedien wurde sowohl MS- als auch QL-Medium mit einer Hormonkonzentration pro Liter von IES 0,1 ppm, BAP 0,5 ppm und GA3 1,0 ppm, 3% Saccharose und 7g/L Agar verwendet.

Die Lagerung erfolgte bei 2°C sowohl im Dunkeln als auch unter Langtagsbedingungen. Die eingelagerten Klone wurden regelmäßig kontrolliert. Eine sichere Lagerung war für 1 Jahr sowohl im Dunkeln als auch unter Langtagbedingungen ohne Verluste möglich. Die Sprosse hatten sich während der Lagerung z.T. bis an die Deckel der Kulturgefäße gestreckt und waren auch unter Lichtbedingungen deutlich heller geworden. Hinsichtlich der verwendeten Kulturmedien konnten keine Unterschiede bezüglich Qualität der Mikrostecklinge beobachtet werden. Zur Revitalisierung der Klone wurden 2 Versuchsreihen angelegt. Die im Dunkeln gelagerten Klone wurden 1 Woche im Klimaraum bei 21°C und 16h Licht kultiviert . Die ergrüntten Spitzen wurden entnommen und 4 Wochen im Klimaraum subkultiviert.. Mit den unter Langtagbedingungen bei 2°C gelagerten Klonen wurde analog verfahren. Die Mikrostecklinge bildeten Seitentriebe und zeigten eine erstaunliche Vitalität. Von jedem Klon wurden erneut Kulturgefäße zur Lagerung vorbereitet. Parallel dazu wurden die Spitzen der Mikrostecklinge ohne Subkultivierungsphase direkt in die Lagergefäße überführt und sowohl im Dunkeln als auch unter Licht bei 2°C erneut eingelagert. Die mit Sub kultivierungsphase gelagerten Klone zeigten bezüglich Überlebensrate deutliche Unterschiede zum Versuch mit direkter erneuter Einlagerung. Die subkultivierten Klone zeigten nach 1 Jahr Lagerdauer keine Absterbeerscheinungen, die direkt überführten Klone waren bereits nach 3 Monaten Lagerdauer zu 70% abgestorben. Es ist zu vermuten, dass der physiologische Zustand der Mikrostecklinge ohne Subkultur extrem schlecht ist und die Nährstoffaufnahme für ein Überleben zu gering ist. In einer weiteren Versuchsreihe konnten nachgewiesen werden, dass eine Verlängerung der Lagerdauer ganz wesentlich vom verwendeten Nährmedium abhängt. Bei Mikrostecklingen auf MS-Medium zeigten sich nach 18 Monaten Lagerdauer deutliche Absterbeerscheinungen, die vermutlich auf einen schnelleren Verbrauch der Nährstoffe im Medium zurückzuführen sind.



Abb. 4: Prunus avium nach 1 Jahr Lagerung unter 2°C im Dunkeln

Salix-Hybriden:

Die Lagerung erfolgte in 3 verschiedenen Gefäßtypen. Weckgläser mit Rundrand (Höhe 85mm, Durchmesser 85mm), Stangengläser (Höhe 200mm, Durchmesser 60mm) und Plastikbecher (Höhe 60mm, Durchmesser 78mm).

Als Kulturmedium wurde hormonfreies WPM-Medium mit 500mg/L Aktivkohle und 7g/L Agar verwendet.

Die Lagerung erfolgte sowohl im Dunkeln als auch bei Langtagsbedingungen. Die periodischen Kontrollen des Klonmaterials ergab, dass die Mikrostecklinge mit Licht weniger lang lagerfähig sind als im Dunkeln. Nach 13 Monaten waren erste Absterbeerscheinungen bei allen 3 Gefäßvarianten sichtbar.

Die Mikrostecklinge waren alle bewurzelt, bis zum Deckel der Kulturgefäße gewachsen und die Blätter deutlich verbräunt. Es ist zu vermuten, dass die Mikrostecklinge durch die Lichtbedingungen und die fehlenden Cytokinine in ihrem Wachstum wenig gedrosselt waren und das Nährmedium verbraucht war.

In einem weiteren Versuch sollte festgestellt werden, welchen Einfluss der verwendete Mikrostecklingstyp auf die Lagerdauer hat. Es wurden sowohl Spitzen von Mikrostecklinge als auch Stängelstücke mit einem gelagert. Die Teilstücke waren deutlich schlechter lagerfähig. Es ist offensichtlich eine längere (mindesten 3 Wochen) Subkulturzeit im Klimaraum erforderlich. Ein deutlich sichtbares Wachstum der Axillarknospen bei Stängelstücken scheint für ein Überleben zwingend erforderlich.

Die Lagerungsversuche zeigen, dass die Lagerung von Mikrostecklingsspitzen im Dunkeln die sichere Variante darstellt.

Bei allen 3 Gefäßvarianten waren die Mikrostecklinge noch mehr oder wenig grün.

An den Sprossachsen konnten deutlich verdickte Sproßknospen beobachtet werden und bei einigen Klonen war eine Seitentriebbildung erkennbar.

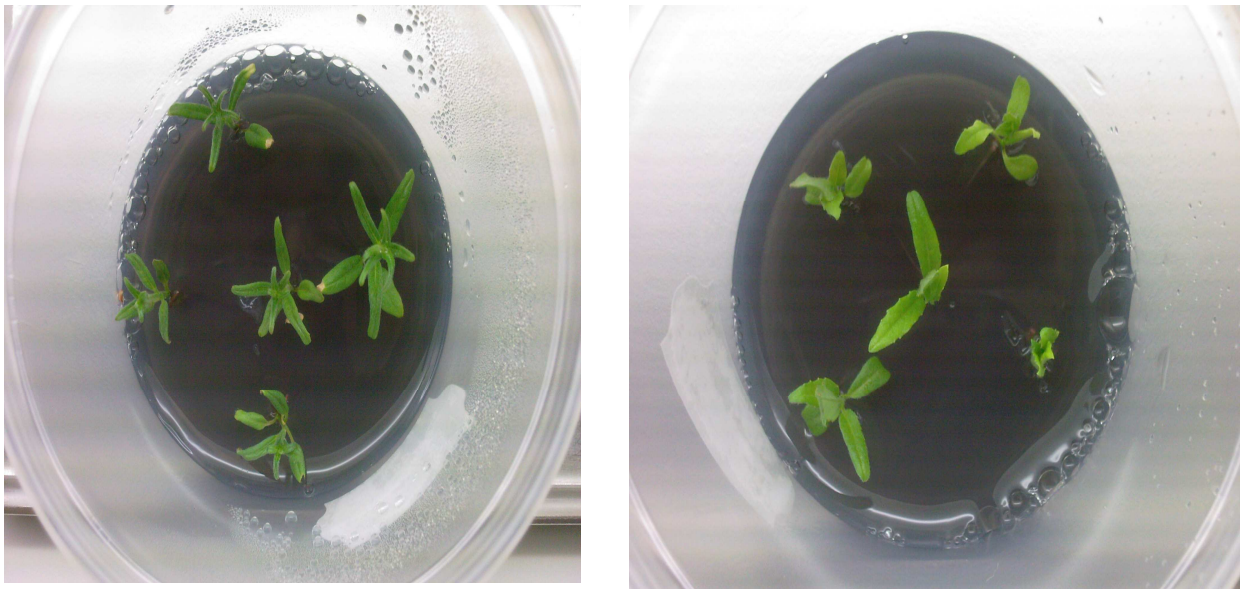


Abb. 5: Mikrostecklingsspitzen von Salix-Hybriden zur Einlagerung im Depot

Robinia pseudoacacia:

Zur Lagerung wurden sowohl Glasgefäße als auch Plastikbecher (Höhe 60mm, Durchmesser 78mm) verwendet. Als Nährmedium wurde WPM-Medium mit einer Hormonkonzentration pro Liter von 0,1 ppm IES, 0,3ppm BAP und 1,0 ppm GA3, 3% Saccharose und 7g/L Agar verwendet. Die periodische Kontrolle ergab, dass beide Gefäßtypen für eine sichere Lagerung über 1 Jahr geeignet sind. Die in Dunkelheit gelagerten Klone zeigten dabei eine größere Vitalität.

Nach einer längeren Einlagerung (über 14 Monate) waren an 75% der Klone Absterbeerscheinungen erkennbar.

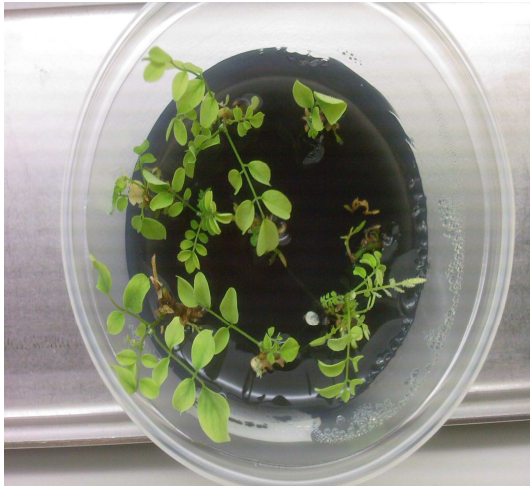


Abb. 6: Robinia pseudoacacia nach 1 Lagerung



Abb. 7 . Robinia pseudoacacia nach 14 Monaten Lagerung (deutlich sichtbare Absterbeerscheinungen)

***Alnus glutinosa*, *Acer pseudoplatanus*, *Betula pubescens*:**

Die Klone vorgenannter Arten wurden sicher ohne Unterbrechung in Plastikbechern (Höhe 60mm, Durchmesser 78mm) sowohl im Licht als auch im Dunkeln 1 Jahr gelagert. Eine Verlängerung der Lagerzeit war mit deutlichen Absterbeerscheinungen verbunden, die bei einigen Klonen bis zum vollständigen Verlust führte. Besonders bei *Acer pseudoplatanus* war das Nährmedium verbräunt, wahrscheinlich eine Folge der Ausscheidung von phenolischen Substanzen.

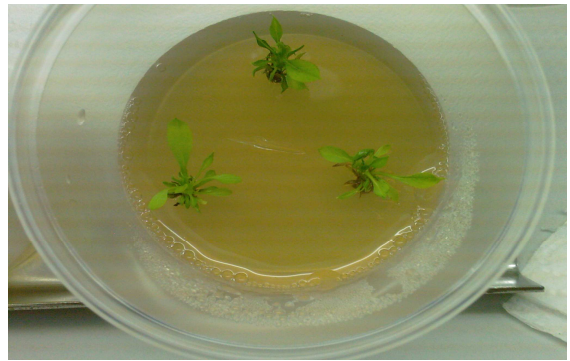


Abb. 8: *Acer pseudoplatanus* nach 14-Monaten Lagerung mit deutlich verbräunten Nährmedium

***Populus tremula* x *tremuloides*:**

Die Lagerung erfolgte auf Grund des starken Längenwachstums in Plastikbecher mit folgenden Abmessungen : 108 x 82 mm, Höhe 96mm. Als Nährmedium wurde MS-Medium mit 3 verschiedenen Hormonkonzentrationen verwendet

Variante	IES mg/L	BAP mg/L	2iP mg/L	Saccharose g/L	Agar g/L
1	0,01	0,2		30	7
2	0,01	0,5		30	7
3	0,01		0,5	30	7

Pro Becher wurden 12 Mikrostecklinge kultiviert. Von jeder Variante erfolgt die Lagerung sowohl im Dunkeln als auch unter Langtagsbedingungen.

Die Lagerung wurde periodisch bonitiert. Auffällig war, dass sowohl die im Dunkeln als auch die unter Langtagsbedingungen gelagerten Becher bereits nach 6 Monaten Absterbeerscheinungen zeigten. Die Blätter waren braun und die Sprosse wirkten insgesamt wenig vital. Als besonders negativ zeigte sich bei allen gelagerten Klonen die Variante 3. Es ist zu vermuten, dass der geringe Cytokiningehalt des Mediums eine sichere Lagerung verhindert.

Die Lagerbedingungen wurden deshalb verändert. Bereits bei den einzelnen Subkulturen des Klonmaterials war eine Empfindlichkeit der Klone bei der Bearbeitung festzustellen. Die Klone werden deshalb unter Langtagsbedingungen im Klimaraum bei 21°C in vorgenannten Plastikbechern mit den Nährmedienvarianten 1 und 2 gelagert. Nach einer Lagerdauer von 6 Monaten hat sich das Auftragen von Flüssigmedium mit vorgenannten Medienvarianten als optimal erwiesen. Die Klone können unter diesen Bedingungen sicher 12 Monate gelagert werden.



Abb. 9: *Populus tremula x tremuloides* nach 1 Lagerung bei 21°C unter Langtagbedingungen bei Zugabe von Flüssigmedium nach 6 Monaten

Zusammenfassung: Eine sichere Lagerung der einzelnen Arten und Klone ist bis zu 1 Jahr ohne Subkultur möglich.

Depotmanagement

Zur Sicherung der eingelagerten Klone und dem Management der Lagerung wurden (PC-gestützt) Dateien angelegt, die – sortiert nach Pflanzenart – den Bestand der vorhandenen Klone und die dabei eingelagerten Mengen enthalten. Neben dem Zeitpunkt der des Beginns der Einlagerung sind in dieser Datei halbjährliche visuelle Kontrollen der Bestände und Zeitpunkte der Revitalisierung eingetragen. Da diese Dateien als Zeitschienen geführt werden, lassen sich somit leicht fällige Subkulturen und Revitalisierungsmaßnahmen erkennen. Visuelle Kontrollen der Bestände in der Kühlzelle bzw. im Depotlagerschrank werden am jeweiligen Kontrollblatt nachgewiesen.

Zur Vermeidung von Arbeitsspitzen wird nur jeweils eine Art zum gleichen Zeitpunkt bearbeitet und eingelagert. Bei größeren Beständen mit einer hohen Anzahl von Klonen wird auch innerhalb der Art der Bestand zu unterschiedlichen Zeitpunkten bearbeitet. Günstig haben sich dabei Bearbeitungszeiträume außerhalb der „Fenster“ für die Etablierung neuer Kulturen erwiesen (Oktober/November, März/April). Im Routinebetrieb werden für die Erhaltung von 10 Klonen ein Aufwand von 30 Arbeitsstunden von der Herstellung der Kulturmedien über die Subkultur bis zur Einlagerung und den fälligen Kontrollen kalkuliert.

Nachfolgend sind Gefäßtyp, Nährmedien und Lagerbedingungen für die einzelnen Arten dargestellt.

Übersicht zur Lagerung im Depot des Labors

Art	Gefäßtyp	Anzahl Mikrostecklinge /Gefäß	Nähr- medium	Lagerparameter
Prunus avium	Plastikbecher rund Kulturröhrchen	5 1	MS/QL	+2°C, Dunkelheit, Langtag
Salix-Hybriden	Weckgläser Stangengläser Plastikbecher	5 5 5	WPM	+2°C Dunkelheit
Robinia pseudoacacia	Twist-off – Gläser Plastikbecher	5 5	WPM	+2°C Dunkelheit
Alnus glutinosa	Plastikbecher	5	WPM	+2°C Dunkelheit Langtag
Acer pseudoplatanus	Plastikbecher	5	WPM	+2°C Dunkelheit Langtag
Betula pubescens	Plastikbecher	5	WPM	+2°C Dunkelheit Langtag
Populus tremula x tremuloides	Plastikbecher	12	MS	20°C Langtag

Molekulargenetische und immunologische Untersuchungen

Methodenbeschreibung

Sortenidentifikation und Sortenreinheit

Eine Sorte kann mittels dreier verschiedener Markersysteme identifiziert werden. Diese Methoden sind RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat DNA) und AFLP (amplified restriction fragment polymorphism). Die Vorteile der Mikrosatelliten-Technik liegen vor allem in der sehr hohen Spezifität und Variabilität dieses Systems sowie Präsenz der Mikrosatelliten im gesamten Genom. Aufgrund ihres zahlreichen Vorkommens, ihrer kodominanten Ausprägung und des Auftretens vieler verschiedener Allele je Locus sind Mikrosatelliten ein häufig genutztes Markersystem. Mikrosatelliten bzw. SSRs (Short Single Repeat) sind tandemartig wiederholte kurze Sequenzmotive, die sich über das ganze Genom verteilen. Die Motive bestehen meist aus zwei bis sechs Basenpaaren und unterscheiden sich zwischen den einzelnen Genotypen, aufgrund der Anzahl an Wiederholungen an einem Markerloкус. Die Analyse der Mikrosatelliten erfolgt durch PCR Amplifikation mit Primern, die an die flankierenden, stark konservierten Bereiche der Mikrosatelliten binden.

Deshalb wurde die angestrebte Sortenidentifikation analog zu den gewonnenen Ergebnissen zur Identifikation und Bestimmung der Sortenreinheit von Kirschen durchgeführt. Die bereits im Fzmb e.V. etablierten Techniken wurden hier zum Einsatz gebracht. Zu diesen Techniken gehört die DNA-Extraktion, die Amplifikation mittels verschiedenster publizierter Primer und die Auswertung der Fragmentmuster im PAA Gel. Dabei wurden die Methoden optimiert und angepasst.

DNA Extraktion

Die Mini-Präparation der DNA aus in-Vitro-Kulturen und frischem Blattmaterial erfolgte in Anlehnung an die CTAB-Methode von Saghai Maroof *et al.* 1984.ⁱ

- 50-200 mg Blattmaterial in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß fein zermörsern
- add 500 µl auf 65°C vorgewärmten Extraktionspuffer
- homogenisieren und 60 min bei 65°C Schütteln
- add 500 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24:1)
- mischen, 10 min bei RT und 15000 x g zentrifugieren
- Überstand in neues Eppi überführen, 500 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) zugeben, schütteln und 10 min bei RT und 15000 x g zentrifugieren
- Überstand mit 0,7 fachen Volumen Isopropanol für 5 min auf Eis fällen
- 10 min bei RT und 15000 x g zentrifugieren
- Überstand abgießen
- Pellet 2x in 1 ml Waschlösung waschen und jeweils 10 min bei RT und 15000 x g zentrifugieren
- Pellet in 30 µl TE-Puffer aufnehmen

DNA-Extraktionspuffer:

- 2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 % PVP-40
- autoklavieren und 10 mM DTT vor Gebrauch hinzufügen

Waschlösung:

- 10 mM NH₄OAc in 76 % Ethanol, pH 8.0

Getestet wurden neue DNA-Extraktionskits verschiedener Hersteller getestet.

Primerwahl und PCR

Die für die Amplifikation benötigten Primer wurden aus den Publikationen Dirlewanger *et al.* (2002)ⁱⁱ und Cantini *et al.* (2001)ⁱⁱⁱ entnommen. Sie wurden bereits zur Identifikation von Kirschen am fzmb e.V. getestet.

In der Literatur gibt es keinen Hinweis auf spezifische Mikrosatellitenprimer für *Alnus*, *Populus* und *Robinia*, sodass hier Primerpaare verwendet werden, die zunächst für andere *Prunus*- Arten bereits beschrieben sind. Auf diese Möglichkeit wurde in der Literatur durch zahlreiche Untersuchungen hingewiesen. BORITZKI *et al.* (2000)^{iv} z.B. zeigten, dass für *Prunus avium* entwickelte Mikrosatellitenprimer auch in anderen *Prunus*- Arten Fragmente amplifizierten. Allerdings können Unstimmigkeiten durch die Methodik der Mikrosatellitenanalyse entstehen. So zeigten PLIESKE und STRAUS (2001)^v, dass mit Mikrosatellitenmarkern amplifizierte Fragmente in verwandten Arten nicht zwangsläufig den Mikrosatelliten enthalten müssen, sondern es zu einer unspezifischen Amplifikation kommen kann.

PCR mit unspezifischen in der Literatur beschriebenen Mikrosatellitenprimern

- Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur für die Primerpaare mittels Gradienten PCR

- Test aller vorhandenen Primerpaare mit allen extrahierten DNAs verschiedener Laubgehölzklone
- Wiederholung der Tests auf Reproduzierbarkeit
- Auswahl geeigneter Primerpaare für die Sortenidentifikation

Auswertung der PCR-Amplifikate

Die Auswertung der Bandenfragmentmuster erfolgte durch PAA-Gelelektrophorese. Dafür werden 12 %ige native Polyacrylamid (PAA) -Gele verwendet. Das PCR-Produkt wird 1:5 mit Auftragspuffer gemischt und 4 µl der Lösung auf das Gel aufgetragen. Zur Fragmentlängenabschätzung wird zusätzlich ein Größenmarker eingesetzt.

Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,5 x TBE bei 200 V für ca. 60 min. Es ist darauf zu achten, dass die Laufrichtung aller Gele bis zu einer festgelegten Grenze läuft und an dieser die Gelelektrophorese abgebrochen wird. Dies gewährleistet eine einheitliche Laufstrecke und Auftrennung der Amplifikate für alle zu identifizierenden Sorten.

Die zur Auswertung essentielle Färbung wird durch eine Ethidiumbromid- (EtBr) Färbung realisiert. Dafür werden 2 µl EtBr-Konzentrat mit 100 ml 0,5 x TAE Puffer vermischt. Das Gel wird 10 min im EtBr-Färbegrad inkubiert und anschließend 10 min in Wasser entfärbt.

Die Gele werden mit dem Gel Doc 2000 der Firma Biorad fotografiert und digitalisiert. Es ist darauf zu achten, dass die eingescannten Gele auf eine Größe geschnitten und gespeichert werden. Dies gewährleistet den reproduzierbaren Vergleich der Gele untereinander. Mit Hilfe der Software Quantity One Version 4.0.1 können die Gele bearbeitet und die Größe der Fragmente bestimmt werden.

In einigen Fällen reichte diese Methode zur Identifizierung nicht aus. Allerdings konnte eine Fragmentlängenbestimmung über Sequenzierung nicht durchgeführt werden. Damit hätte ein nicht-visueller, sondern auf die Größe der Fragmente beruhender Bestimmungsschlüssel entwickelt werden können.

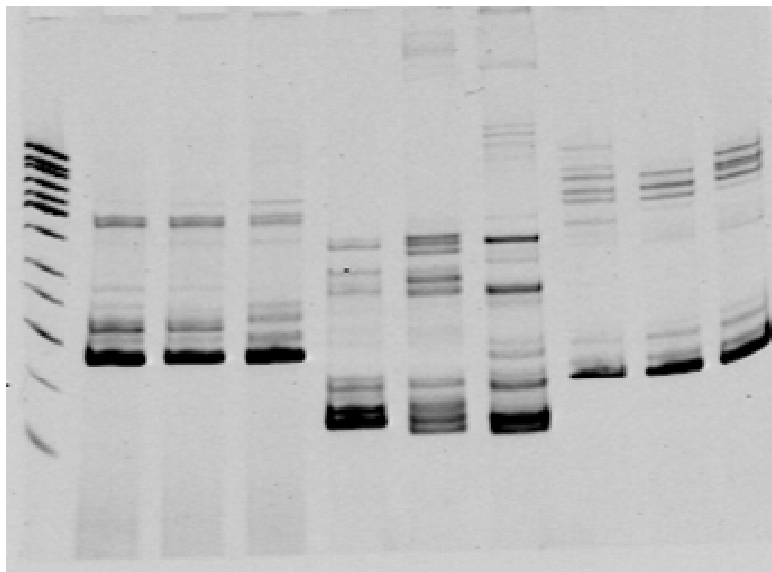


Abb: 10: Auftrennung der PCR-Fragmente dreier Klone nach Amplifikation mit 3 verschiedenen Primerpaaren (Primer A – Lane 2-4; Primer B – Lane 5-7, Primer C – Lane 8-10), Lane 1 (links) – Fragment-standard

Für die umfangreiche Kollektion Vogelkirschen in Verbindung mit verschiedenen Prunus-Hybriden wurde ein vollständiger Bestimmungsschlüssel auf der Basis von insgesamt 7 Primerpaaren entwickelt.

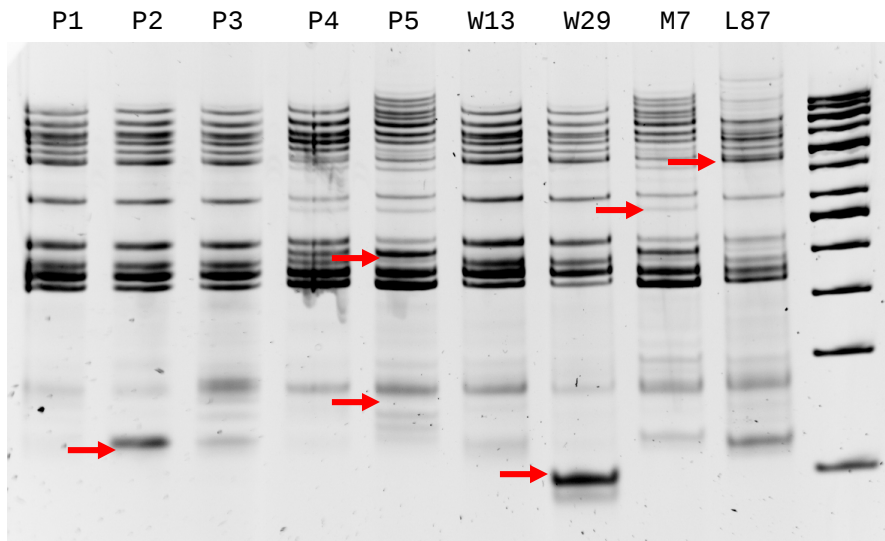


Abb. 11: PCR-Fragmentmuster von 9 Vogelkirschklonen nach Amplifikation mit dem Primer PM49

Immunologische Virusdetektion

In-vitro-Kulturen werden auch dazu benutzt virusfreies Pflanzgut zu erzeugen. Dazu kann ein immunologischer Assay auf der Basis kommerziell erhältlicher Kits erfolgen. Diese beschreiben die Herstellung der Extraktions-, Wasch- und Konjugatpuffer sowie die Reihenfolge und Menge der Zugabe (Pipettieren). Gleichzeitig enthalten diese Kits je eine Negativ- und Positivkontrolle. Die Inkubation der probe mit dem Konjugat erfolgte in verschiedenen tests 2, 4 oder 20 Std. (über Nacht). Nach dem folgenden 3x Waschen wurde das Substrat zugegeben und die Extinktion bei 405 nm nach 45 min gemessen.

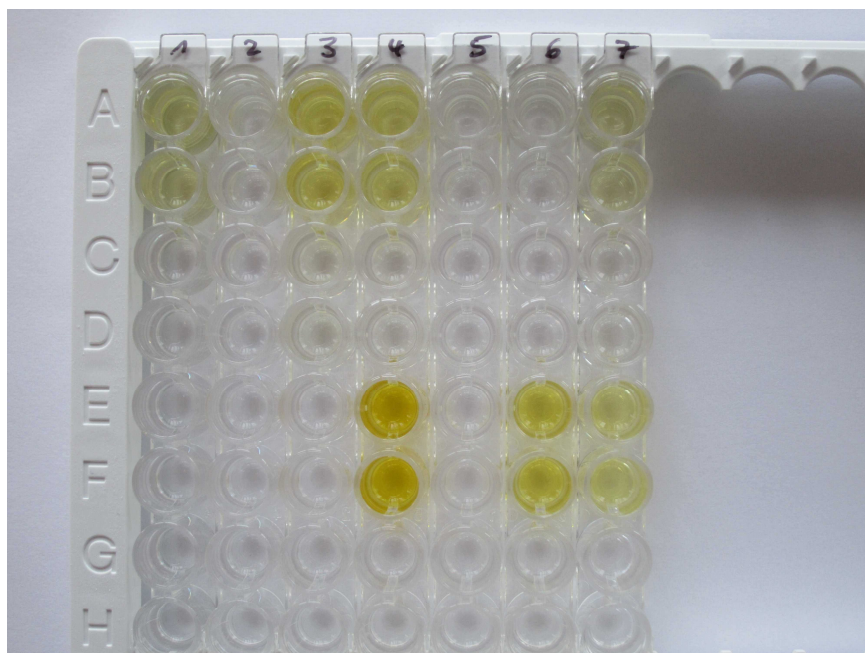


Abb. 12: ELISA-Platte nach 4 Std. Inkubation; Intensität der Färbung zeigt Stärke der Immunobindung an = Detektion Virus (Gelbfärbung = positive Vergleichsproben, In-vitro-Kulturen sind in Reihe C/D und G/H aufgetragen)

Zusammenfassung

Im Projektzeitraum konnten von verschiedenen Laubgehölzarten (*Acer*, *Alnus*, *Betula*, *Populus*, *Prunus*, *Robinia*, *Salix*) neue In-vitro-Kulturen erzeugt und gesichert werden. Insgesamt wurden 146 neue Klone eingelagert und dienen als Referenz für weitere Kulturen bzw. werden je nach Anwendungsmöglichkeit und Marktchancen für Produktionszwecke abgerufen. Konkrete Aufträge liegen für *Acer*- *Alnus*- und *Prunus*-Selektionen vor. Andere Klone bedürfen weiterer Tests zur Qualifizierung ihrer Leistungsfähigkeit unter pflanzenbaulichen Aspekten.