

Induktion und Vermehrung von PLBs (Protocorm Like Bodies) bei *Phalaenopsis* Hybriden für den *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer



Rena Becker, Leana Subh, Melanie Bartsch und Traud Winkelmann

Institut für Zierpflanzen und Gehölzwissenschaften, Abteilung Baumschule, Leibniz Universität Hannover, winkelmann@baum.uni-hannover.de

Hintergrund

Die Zierpflanze *Phalaenopsis* wird *in vitro* über axillare Sprossvermehrung vermehrt. Die Züchtung ist aufgrund der langen Generationszeiten sehr langwierig und die Produktion erfordert hohen Energieeinsatz für die Klimatisierung der Gewächshäuser.

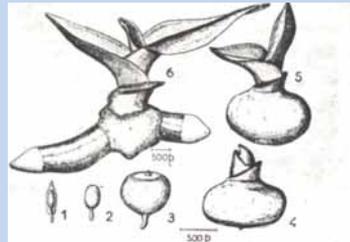
Um die Blüteninduktion bei *Phalaenopsis* zu verstehen und steuern zu können, ist ein Transformationssystem zur Analyse von Genfunktionen notwendig.

Für die Transformation werden Protocorm Like Bodies (PLBs) verwendet. PLBs entstehen vegetativ und sind Strukturen, die den sich aus Samen entwickelnden Protokormen ähneln.¹

Über diesen Regenerationsweg können *In-vitro*-Sprosse induziert werden, gleichzeitig dient er als Basis für die Entwicklung von Transformationsprotokollen.



Verwendete Genotypen (www.hark-orchideen.de)



Schematische Darstellung der Keimung von Orchideen.²

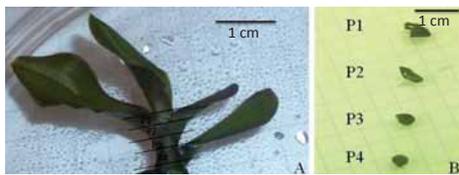
Ziele des Projekts

1 Induktion und Vermehrung von PLBs bei *Phalaenopsis*

2 Ermittlung der Hygromycinsensitivität der PLBs

3 Entwicklung eines Transformationsprotokolls

1 a PLB-Induktion



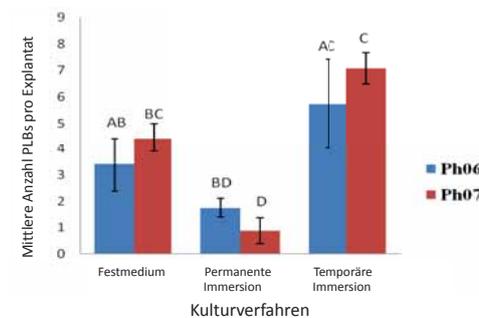
PLB-Induktion aus vier verschiedenen Positionen der Sprossachse (P1-P4).

A: *Phalaenopsis* *In-vitro*-Spross, B: Explantate der vier Positionen

Nach 20 Tagen auf MS³ Medium mit 1 mg/l TDZ bildeten sich erste PLBs auf den Explantaten der Positionen 3 und 4, die 10 Tage später die ersten Sprossspitzen entwickelten. Die Explantate der Positionen 1 und 2 führten nicht zu einer Induktion von PLBs.

Nach 45 Tagen war bei Genotyp Ph07 an 68% der Explantate aus Position 4 und 56% der Explantate aus Position 3 die Entwicklung von PLBs zu beobachten.

1 b PLB-Vermehrung

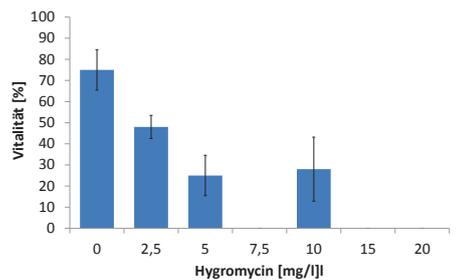


Einfluss des Kulturverfahrens auf die PLB-Vermehrung pro Explantat bei den Genotypen Ph06 und Ph07 nach 6-wöchiger *In-vitro*-Kultur auf MS³ Medium mit 1 mg/l TDZ.

n = 2 für temporäre Immersionssysteme (RITA) (24 Explantate/Wdh.)
n = 10 für Festmedium und permanente Immersion (4 Explantate/Wdh.)
I = Stabw.; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach Tukey-Test, p < 0,05

2 Hygromycinsensitivität

Zur Ermittlung der Selektionsschwelle von Hygromycin wurden verschiedene Konzentrationen zum Vermehrungsmedium (MS³+1mg/l TDZ) hinzugegeben.

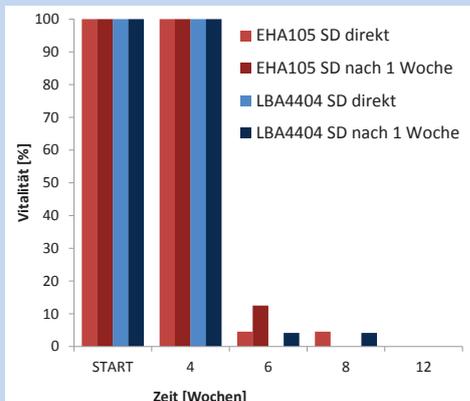


Anteil vitaler PLB-Explantate bei Ph07 in % nach 8-wöchiger *In-vitro*-Kultur.

I = Stabw., n = 5 Petrischalen à 5 Explantate, bei 0 und 5 mg/l Hygromycin n = 4 Petrischalen à 5 Explantate

3 Transformation

Die Transformation von PLBs erfolgte mit EHA105 + pCambia1301 und LBA4404 + pCambia1301 (*Agrobacterium*-Stamm + Vektor). Es wurden das Markergen *hptII* (*hygromycin phosphotransferase*), das Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin vermittelt, sowie das *gus* (β -Glucuronidase) Reportergen mit Intron verwendet.

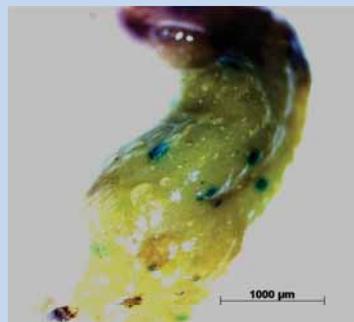


Anteil vitaler PLB-Explantate von Ph06 in Abhängigkeit von der Zeit nach Kokultur (2d) mit zwei *Agrobacterium*-Stämmen und unterschiedlichem Beginn des Selektionsdrucks.

n = 24 Explantate, n bei EHA105 SD direkt = 22 Explantate SD Selektionsdruck mit 7,5mg/l Hygromycin

Histochemischer GUS-Test

Beim histochemischen GUS-Test, der 5 Wochen nach der Kokultur durchgeführt wurde, zeigten 15 von 22 getesteten Explantaten von Ph06 eine Blaufärbung.



Punktuell GUS-positives Explantat des Genotyps Ph06, 5 Wochen nach der Transformation mit EHA105 + pCambia1301.

Anteil GUS-positiver Explantate von Ph06 5 Wochen nach der Transformation mit zwei A.t. Stämmen

A.t. Stamm und Vektor	getestete Explantate	Anteil GUS+ [%]
EHA105 + pC1301	15	66,67
LBA4404 + pC1301	7	71,43

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

1 Induktion von PLBs gelingt durch Verwendung von Explantaten, die meristematische Regionen beinhalten.

• Temporäre Immersionssysteme verbessern die Vermehrungsrate der PLBs.

2 • Bei einer Konzentration von 7,5 mg/l Hygromycin im PLB-Vermehrungsmedium war ein starkes Absterben nicht-transgener Zellen zu verzeichnen, dies wurde als Selektionsschwelle gewählt.

3 • Unabhängig von A.t. Stamm und Selektionsbeginn starben 4 Wochen nach Kokultur viele PLBs ab.
• GUS-positive PLBs zeigen die Übertragung des Transgens. Für einen Nachweis einer stabilen Integration sind weitere Untersuchungen nötig.

Ausblick

- Verminderter Selektionsdruck bei zukünftigen Transformationsversuchen.
- Transformation mit weiteren *Agrobacterium tumefaciens* Stämmen und Vektoren.
- Transformation während der PLB-Induktion.

¹ Wimber, D. E. (1963). Clonal multiplication of cymbidiums through tissue culture of the shoot meristem. *Am Orchid Soc Bull* 32:105–107.

² Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev* 33, 1.

³ Murashige, T. und Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497