

**Isoenzyme zur Charakterisierung von haploiden  
Regeneratpflanzen und der Einsatz von Phosphataseinhibitoren  
zur Verbesserung der Regeneration in vitro bei Apfel  
(*Malus domestica* Borkh.)**

Vom Fachbereich Gartenbau  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer

**Doktorin der Gartenbauwissenschaften**

Dr. rer. hort.

genehmigte  
**Dissertation**

von

Dipl.-Ing. agr. Christine Grafe  
geboren am 4. November 1962 in Dresden

2003

Referent: Prof. Dr. G. Wricke  
Korreferent: Prof. Dr. W. Spethmann  
Tag der Promotion: 16. Dezember 2002

# Kurzfassung

## Isoenzyme zur Charakterisierung von haploiden Regeneratpflanzen und der Einsatz von Phosphataseinhibitoren zur Verbesserung der Regeneration *in vitro* bei Apfel (*Malus domestica* Borkh.)

Die Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden einerseits in der Erarbeitung und Anwendung einer Methode zur frühzeitigen Charakterisierung von Regeneratpflanzen aus der Haploidenkultur und andererseits in der Verbesserung der In-vitro-Regeneration aus somatischen Geweben bei Apfel. Als Marker für beide Teilaufgaben wurden Isoenzyme angewendet.

Zur Suche nach Markern für die Charakterisierung der Regenerate aus der Haploidenkultur wurden zunächst acht Kreuzungsnachkommenschaften auf spaltende Isoenzyme untersucht. In 14 betrachteten Enzymsystemen wurden zehn ungekoppelt vorliegende Loci gefunden. Nach Überprüfung ihrer gewebespezifischen Expression und der Stabilität, die zu teilweisen Einschränkungen in der Anwendbarkeit führte, ergab sich eine donorabhängige Verfügbarkeit von einem bis sechs Markern.

Mit Hilfe der Isoenzymmarker konnten 125 von 136 geprüften Antherenkulturlinien sowie alle drei untersuchten Linien aus der Mikrosporenkultur als homozygot charakterisiert werden. Für den endgültigen Homozygotienachweis in Regeneraten aus der In-situ-Parthenogenese erwiesen sich die Marker als unzureichend; sie erlaubten jedoch die sichere Negativselektion der unerwünschten heterozygoten Pflanzen. Bei zwei von vier betrachteten Markern traten in den Antherenkulturlinien signifikante Abweichungen vom erwarteten 1:1-Spaltungsverhältnis auf. In 40 Antherenkulturlinien zeigten die Regenerate gametoklonale Variationen. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf den Einsatz der Regenerate in der Züchtung diskutiert.

Für die Etablierung von Markern, die Erkenntnisse über die Regenerationsfähigkeit somatischer Gewebe liefern können, wurden Isoenzymmuster von regenerierenden und nicht regenerierenden Primärexplantaten und sekundären Kalli verglichen. Als gemeinsamer Marker für die getesteten Genotypen und Gewebearten wurden Intensitätsunterschiede bei zwei Banden der Sauren Phosphatase vermutet. Der Zusammenhang zwischen unauffälliger Intensität und vorhandenem Regenerationsvermögen sowie zwischen erhöhter Intensität und fehlender Regenerationsbereitschaft wurde statistisch nachgewiesen.

Auf der Grundlage dieses Ergebnisses erfolgte die Prüfung des Einflusses von Phosphataseinhibitoren, Proteinkinaseinhibitoren sowie der Phosphatkonzentration auf das Regenerationsverhalten mehrerer Genotypen. Alle getesteten Phosphataseinhibitoren (Natriumfluorid, Natriumvanadat, Endothall, L-p-Bromotetramisoloxalat) waren in bestimmten Konzentrationsbereichen in der Lage, die Regenerationsbereitschaft der Gewebe oftmals signifikant zu erhöhen. Proteinkinaseinhibitoren hingegen verzögerten das Einsetzen der Regeneration. Auch die Phosphatkonzentration beeinflusste signifikant die Sprossbildung. Es zeigten sich genotypabhängige Optima, während absoluter Phosphatmangel und eine deutlich höhere Konzentration eine hemmende Wirkung besaßen. Die Ergebnisse werden in ihrer praktischen und wissenschaftlichen Bedeutung für die Regulation pflanzlicher Regenerationsvorgänge diskutiert.

*Schlagwörter:* *Malus domestica*, Homozygotie, Phosphataseinhibitoren



## Abstract

### **Isozymes for the characterisation of haploid regenerants and the application of phosphatase inhibitors for the improvement of regeneration *in vitro* in apple (*Malus domestica* Borkh.)**

The objectives of the present study were the development and the application of a method for the early characterisation of regenerants originated from haploid culture, and the improvement of *in vitro* regeneration in somatic tissues in apple. For these purposes, isozymes were used as markers.

In search of markers for the characterisation of the regenerants from the haploid culture, eight progenies from controlled crosses were analysed for segregating isozymes. Ten unlinked loci could be found in 14 enzyme systems. After investigating their tissue-specific expression and stability, one to six loci could be used as markers in dependence on the donor genotype.

Using these markers, 125 of 136 lines regenerated by anther culture and all three of the tested lines from microspore culture were characterised as homozygous. The markers proved as insufficient for a definite evidence of homozygosity in regenerants from parthenogenesis *in situ* but the negative selection of undesired heterozygous plants was possible. In the anther culture-derived lines, distorted segregations for two of four markers tested were found. Gametoclonal variation was observed in regenerants of 40 anther culture-derived lines. The results were discussed with regard to the application of the regenerants in the breeding process.

In order to find markers for the assessment of regeneration capacity in somatic tissues, isozyme patterns of regenerating and non-regenerating primary explants and secondary calli were compared. Differences in the intensity of two bands of acid phosphatase were supposed to be a marker existing in all genotypes and tissues tested. The correlations between inconspicuous intensity and existing regeneration ability as well as increased intensity and missing regeneration ability could be proved statistically.

In result of these correlations, the effect of phosphatase inhibitors, protein kinase inhibitors and phosphate concentration on the regeneration ability was investigated. Regeneration capacity was often increased significantly by definite concentrations of all four phosphatase inhibitors (sodium fluoride, sodium orthovanadate, endothall, L-p-bromotetramisole oxalate). Shoot formation was delayed by the application of protein kinase inhibitors. Finally, there was also a significant influence of phosphatase concentration on regeneration ability. In dependence of the genotype, definite optima could be observed. Total lack of phosphate and higher concentrations inhibited shoot regeneration. The practical and scientific importance of the results for the regulation of regeneration processes in plants was discussed.

*Keywords:* *Malus domestica*, homozygosity, phosphatase inhibitors



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Charakterisierung von Regeneraten aus der Haploidenkultur</b>	<b>3</b>
2.1	Einleitung .....	3
2.2	Material und Methoden .....	5
2.2.1	Markerentwicklung .....	5
2.2.1.1	Spaltungs- und Kopplungsanalysen .....	5
2.2.1.2	Gewebespezifische Expression und Stabilität der spaltenden Loci .....	14
2.2.1.3	Donorspezifische Marker .....	15
2.2.2	Homozygotietest .....	15
2.2.3	Spaltung der Marker bei Antherenkulturlinien .....	19
2.2.4	Gametoklonale Variation bei Antherenkulturregeneraten .....	19
2.3	Ergebnisse .....	21
2.3.1	Markerentwicklung .....	21
2.3.1.1	Spaltungs- und Kopplungsanalysen .....	21
2.3.1.2	Gewebespezifische Expression und Stabilität der spaltenden Loci .....	44
2.3.1.3	Donorspezifische Marker .....	46
2.3.2	Homozygotietest .....	49
2.3.3	Spaltung der Marker bei Antherenkulturlinien .....	53
2.3.4	Gametoklonale Variation bei Antherenkulturregeneraten .....	54
2.4	Diskussion .....	57
2.4.1	Markerentwicklung .....	57
2.4.1.1	Spaltungs- und Kopplungsanalysen .....	57
2.4.1.2	Gewebespezifische Expression und Stabilität der spaltenden Loci .....	68
2.4.1.3	Donorspezifische Marker .....	70
2.4.2	Homozygotietest .....	71
2.4.3	Spaltung der Marker bei Antherenkulturlinien .....	73
2.4.4	Gametoklonale Variation bei Antherenkulturregeneraten .....	75
2.5	Zusammenfassung .....	79

<b>3</b>	<b>Biochemische Charakterisierung und Beeinflussung der Regeneration an somatischen Geweben</b>	<b>80</b>
3.1	Einleitung .....	80
3.2	Material und Methoden .....	82
3.2.1	Pflanzliches Material und In-vitro-Kultur .....	82
3.2.2	Isoenzymmuster in Regenerationssystemen .....	83
3.2.3	ACP-Muster und Regenerationsfähigkeit .....	85
3.2.4	Einfluss von Phosphataseinhibitoren .....	87
3.2.4.1	Natriumfluorid und Natriumvanadat .....	87
3.2.4.2	Endothall .....	88
3.2.4.3	L-p-Bromotetramisoloxalat .....	88
3.2.5	Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren .....	89
3.2.6	Einfluss der Phosphatkonzentration .....	89
3.2.7	Datenerfassung und Auswertung .....	90
3.3	Ergebnisse .....	92
3.3.1	Isoenzymmuster in Regenerationssystemen .....	92
3.3.2	ACP-Muster und Regenerationsfähigkeit .....	100
3.3.3	Einfluss von Phosphataseinhibitoren .....	107
3.3.3.1	Natriumfluorid und Natriumvanadat .....	107
3.3.3.2	Endothall .....	117
3.3.3.3	L-p-Bromotetramisoloxalat .....	121
3.3.4	Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren .....	123
3.3.5	Einfluss der Phosphatkonzentration .....	125
3.4	Diskussion .....	127
3.4.1	Isoenzymmuster in Regenerationssystemen .....	127
3.4.2	ACP-Muster und Regenerationsfähigkeit .....	130
3.4.3	Einfluss von Phosphataseinhibitoren .....	133
3.4.4	Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren .....	137
3.4.5	Einfluss der Phosphatkonzentration .....	138
3.5	Zusammenfassung .....	141

<b>4 Zusammenfassung</b>	<b>143</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>Anhang</b>	<b>160</b>



# Abkürzungsverzeichnis

ACP	Saure Phosphatase
BANA	N $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginin- $\beta$ -naphthylamid
BAP	6-Benzylaminopurin
Bis	N, N'-Methylen-bis-acrylamid
C	Crosslinker-Anteil im Acrylamidgel
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DH	Doppelhaploide
DIA	Diaphorase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENP	Endopeptidase
EST	Esterase
GA <sub>3</sub>	Gibberellinsäure
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
IBA	Indol-3-buttersäure
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
LAP	Leucin-Aminopeptidase
M	Molar
MDH	Malat-Dehydrogenase
ME	Malisches Enzym
MS	Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiaziaol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Normal
N <sub>6</sub>	Medium nach CHU et al. (1975)
NAA	1-Naphthylessigsäure
NAD	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotidphosphat
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PKI	Proteinkinaseinhibitor
PMS	Phenazinmethosulfat
PRX	Peroxidase
PGD	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
PGI	Phosphogluco-Isomerase
PVP-40	Polyphenyl-Pyrrolidon, Molekulargewicht 40000
SKD	Shikimat-Dehydrogenase
SOD	Superoxid-Dismutase
T	Gesamtanteil an Acrylamid im Gel
TDZ	N-Phenyl-N-1,2,3-thidiazol-5-yl-Harnstoff
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TPI	Triosephosphat-Isomerase
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Units
w/v	Gewicht pro Volumen



# Kapitel 1

## Einleitung

Der Apfel ist in Europa die wichtigste Obstart im erwerbsmäßigen Anbau. Wirtschaftliche Gesichtspunkte, ein gestiegenes Umwelt- und Qualitätsbewusstsein der Verbraucher sowie Restriktionen bei der Anwendung von chemischen Pflanzenschutzmitteln führen zu stetig steigenden Anforderungen an neue Sorten. Damit neue Sorten eine Anbauchance erhalten können, muss sich die Apfelzüchtung an den Anforderungen der Produzenten und Konsumenten orientieren. Im Apfelzüchtungsprogramm des Instituts für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen besteht die Zielstellung daher in der Kombination von jährlich gleichmäßig hohen Erträgen, hoher äußerer und innerer Fruchtqualität sowie Resistenz gegenüber wirtschaftlich bedeutsamen biotischen Schaderregern und abiotischen Schadfaktoren (FISCHER 1999).

Im Allgemeinen basiert die Apfelzüchtung auf der Selektion von Genotypen mit gewünschten Merkmalen bzw. Merkmalskombinationen aus genetisch variablen Kreuzungspopulationen sowie in der Verwendung der ausgelesenen Genotypen als Kreuzungspartner für weitere Kreuzungskombinationen. Die Eigenschaften des Bearbeitungsobjektes zeigen jedoch den konventionellen Zuchtmethoden Grenzen auf und schränken deren Möglichkeiten ein. Der lange Reproduktionszyklus mit einer über drei bis sechs Jahre andauernden juvenilen Phase, die strenge Allogamie und nicht zuletzt die Pflanzengröße führen zu einem hohen Aufwand an Zeit, Fläche und Personal und begrenzen somit den Umfang der zu selektierenden Populationen.

Die sinnvolle Integration biotechnologischer Methoden in den Zuchtprozess könnten diesen effektiver gestalten und neue Möglichkeiten zur Verbesserung der Sorten erschließen. Beispielsweise können homozygote Pflanzen, die nach spontaner oder induzierter Diploidisierung von Hapliden erhalten werden, in dreifacher Hinsicht in der Züchtung genutzt werden – als reine Linien, zur Erzeugung genetischer Variabilität und als selektierte "Elite-Linien" (PELLETIER 1998). Gerade selektierte homozygote Linien zur Herstellung von F<sub>1</sub>-Hybriden, welche beim Apfel direkt als Klonsorten genutzt werden können, stellen ein effizientes Elternmaterial für die Kombinationszüchtung dar, da sie die gewünschten Gene mit jedem Gameten weitergeben und somit gezielt der Selektion nutzbar gemacht werden

können. Haploide bzw. DH-Pflanzen können neben ihrer hervorragenden Eignung für cytologische Studien, die zum besseren Verständnis des Ursprungs der *Maloideae* beitragen, auch sehr gut für molekularbiologische Untersuchungen zur Erstellung genetischer Karten als Voraussetzung für die markergestützte Selektion eingesetzt werden.

Wie bei anderen Kulturpflanzen werden auch bei Apfel große Hoffnungen in gentechnologische Verfahren gesetzt, um eine Verbesserung der Eigenschaften zu erzielen. Ihre Anwendung ermöglicht es, nur einzelne Gene wie beispielsweise monogen vererbende Resistenzen, die oft in Wildarten anzutreffen sind, in den Kulturapfel zu übertragen, ohne dass eine Neukombination der Erbanlagen stattfindet. Auf diesem Wege könnten die Rückkreuzungsgenerationen eingespart werden, die nach der Kreuzung mit der entsprechenden Wildart notwendig sind, um negative Merkmale wie Kleinfruchtigkeit zu eliminieren. Da die gewünschten Resistenzgene noch nicht zum Transfer bereitstehen, sind die Bemühungen derzeit darauf konzentriert, Schutzmechanismen in Form der Fähigkeit zur Bildung von pathogenabwehrenden Proteinen aus nicht verwandten Organismen wie Bakteriophagen, mykoparasitischen Pilzen und Insekten in das Kulturapfelgenom einzubauen (NORELLI et al. 1994, 2000a, b, BOREJSZA-WYSOCKA et al. 1999, HANKE et al. 1999, 2000, KO et al. 1999, BOLAR et al. 2000).

Als weitere Möglichkeit, zeitaufwändige Rückkreuzungen nach Introgression einzelner Merkmale z. B. aus Wildarten zu vermeiden sowie als gleichzeitige Alternative zum Gentransfer bietet sich die In-vitro-Mutagenese und die anschließende Selektion der gewünschten Klone an (SCHUM et al. 1999).

Voraussetzung für die Nutzung biotechnologischer Methoden in der Apfelzüchtung ist jedoch deren effiziente Beherrschung und die hinreichende Kenntnis der Eigenschaften der regenerierten Pflanzen. In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, über die Entwicklung von geeigneten Markern Möglichkeiten zur Lösung zweier damit in Verbindung stehender Fragen zu untersuchen – der Charakterisierung von Regeneraten aus der Haploidenkultur und der Verbesserung der Regeneration aus somatischen Geweben.

## Kapitel 2

# Charakterisierung von Regeneraten aus der Haploidenkultur

### 2.1 Einleitung

Versuche zur Erzeugung homozygoter Pflanzen bei Apfel wurden sowohl auf dem Weg der In-vivo-Gynogenese nach Bestäubung mit Markerpollen (LESPINASSE und GODICHEAU 1980) als auch unter Nutzung verschiedener biotechnologischer Methoden realisiert (HÖFER und LESPINASSE 1996).

Die androgenetische Induktion von Regeneraten über die In-vitro-Kultivierung von Antheren oder isolierte Mikrosporen stellt gegenwärtig die effizienteste Methode dar (HÖFER 1995, 1997, HÖFER et al. 1999a). Obwohl die Methodik bereits bei einer Reihe von Kulturpflanzenarten angewendet worden ist, sind viele Prozesse, die während der In-vitro-Kultivierung ablaufen, noch ungeklärt. Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht in jedem Fall die gewünschten homozygoten Regenerate aus den in der Regel haploiden Mikrosporen entstehen. Embryoid- und Sprossbildungen können auch von unreduzierten diploiden Mikrosporen oder – bei der Antherenkultur – von diploidem sporophytischen Gewebe ausgehen (ZHANG und LESPINASSE 1992, MEYER et al. 1993, ZHONG et al. 1995).

Bei der Methode der In-situ-Parthenogenese, die von RAQUIN (1985) für *Petunia* entwickelt worden ist, sollen Eizellen durch Bestäubung mit Pollen von *Malus*-Arten, welche homozygot ein dominantes Markergen für Anthocyaninpigmentierung tragen, angeregt werden, sich zu parthenogenetischen haploiden Embryonen zu entwickeln. Der Pollen selbst wird vorher durch Behandlung mit ionisierender Strahlung oder chemischen Agenzien in seiner Vitalität so eingeschränkt, dass er noch in der Lage ist, einen Pollenschlauch auszubilden, die Bildung generativer Kerne aber unterbleibt. Der präzise Mechanismus der Haploideninduktion ist jedoch auch hier noch ungeklärt (ZHANG und LESPINASSE 1991), und es muss mit der Bildung von Regeneraten unerwünschten Ursprungs gerechnet werden. So können trotz vorausgesetzter Pollensterilität zygotische Embryonen entstehen. Die Erfahrungen zu dieser Problematik haben gezeigt, dass die resultierenden Sämlinge nicht in jedem Fall die Rotfärbung in Blättern und Stängel exprimieren müssen (VERDOODT et al. 1998). Das Selektionskriterium "Rotfärbung" ist daher relativ unsicher. Weiterhin muss die Möglichkeit

der versehentlichen Bestäubung und Befruchtung mit unbekanntem Pollen beachtet werden, auch wenn die blühenden Zweige ab dem Ballonstadium mit insektensicheren Netzen versehen werden. Obwohl trotz der angenommenen Selbstinkompatibilität in der Regel eine Kastration erfolgt, können Selbstbefruchtungen nie vollständig ausgeschlossen werden. Außerdem wäre die Bildung von diploiden heterozygoten Regeneraten aus somatischen Zellen der Samenanlage sowie aus unreduzierten weiblichen Gameten denkbar.

Aufgrund der verschiedenartigen Ursprungsmöglichkeiten der Regenerate sowie ihrer mittels Durchflusszytometrie nachgewiesenen Polyploidie (GEYSEN et al. 2000, HÖFER 1994, HÖFER und GRAFE 2000) ist eine genetische Analyse durch geeignete Marker erforderlich.

Bei Überlegungen zur Nutzung homozygoter Regenerate in der praktischen Züchtung und in genetischen Studien wird von einer zufälligen Verteilung der Allele der heterozygoten Eltern- oder Donorgenotypen auf die haploiden Regenerate ausgegangen sowie das Auftreten von gametoklonaler Variation vernachlässigt. Verschiedene Untersuchungen, in denen die für den Homozygotienachweis genutzten Marker diesbezüglich analysiert wurden, ergaben jedoch konträre Ergebnisse. So wurden Aufspaltungen molekularer Marker, die von den theoretisch erwarteten Verhältnissen abwichen, in DH-Populationen bei Mais (BENTOLILA et al. 1992, MURIGNEUX et al. 1993a), Gerste (POWELL et al. 1986, GRANER et al. 1991, HEUN et al. 1991, THOMPSON et al. 1991, ZIVY et al. 1992, KLEINHOF 1993), Broccoli (ORTON und BROWERS 1985), Pfeffer (LEFEBVRE et al. 1995), Reis (GUIDERONI et al. 1989, GUIDERONI 1991, YAMAGISHI et al. 1996), Weizen (BJÖRNSTAD et al. 1993, HENRY et al. 1993), Deutschem Weidelgras (HAYWARD et al. 1990) und *Solanum chacoense* (RIVARD und SABEL-LEIL 1994) beobachtet.

Der Begriff "gametoklonale Variation" kennzeichnet genetische Variationen, die während der In-vitro-Kultivierung gametischer Gewebe entstehen können (EVANS et al. 1984). Unerwartete Phänotypen unter androgenetischen Regeneraten wurden beispielsweise bei Gerste (SAN NOEUM und AHMADI 1982), Raps (HOFFMANN et al. 1982), Reis (CHEN et al. 1983), *Nicotiana sylvestris* (DE PAEPE et al. 1981) und *Lycopersicon peruvianum* (SREE RAMULU 1982) gefunden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine möglichst einfache Methode für den Homozygotietest entwickelt werden, mit der die Regenerate aus der Antheren- und Mikrosporenkultur sowie der In-situ-Parthenogenese in jedem Entwicklungsstadium, d. h. auch schon während der In-vitro-Kultur, untersucht werden konnten. Da ein hinreichender Umfang an Antherenkulturregeneraten verfügbar war, bestand außerdem erstmals bei Apfel

die Möglichkeit, die Aufspaltungsverhältnisse der Marker zu analysieren und Aussagen zum Auftreten von gametoklonaler Variation zu treffen.

Aufgrund ihrer kodominanten Vererbung, ihres hohen Polymorphiegrades, ihrer bei Apfel gut untersuchten Genetik (u. a. CHEVREAU et al. 1985, CHEVREAU und LAURENS 1987, MANGANARIS und ALSTON 1987, 1988a, b, 1992a, b, c, 1997, WEEDEN und LAMB 1987) sowie ihrer einfachen Handhabung sind Isoenzyme als Marker für die Untersuchungen gewählt worden. Isoenzyme wurden bereits bei anderen Pflanzenarten erfolgreich für genetische Analysen von Regeneraten aus der Haploidenkultur angewendet (BUI DANG HA und PERNES 1982, ROUX und ROUX 1983, ORTON und BROWERS 1985, GUIDERONI et al. 1989, POWELL et al. 1990, FOISSET et al. 1993, BOHANEK et al. 1995).

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 Markerentwicklung

#### 2.2.1.1 Spaltungs- und Kopplungsanalysen

##### Pflanzenmaterial

Zum Auffinden spaltender Isoenzymloci und zur Charakterisierung ihrer Vererbung wurden folgende Kreuzungsnachkommenschaften aus dem Apfelzüchtungsprogramm des Instituts für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz, die möglichst viele der in der Haploidentechnik bearbeiteten Genotypen als Eltern enthalten sollten, genutzt:

'Alkmene'	×	Pi-AS 43,31
'Antonowka'	×	'Alkmene'
'Piglos'	×	'Pilot'
'Pikant'	×	'Remo'
'Pinova'	×	'Piglos'
'Releika'	×	'Dülmener Rosenapfel'
'Releika'	×	'Rewena'
'Remo'	×	'Piros'

Der Stichprobenumfang pro Kreuzung betrug 10 bis 15 Nachkommen.

##### Isoenzymanalysen

In den Nachkommenschaften der oben genannten Kreuzungen wurden die Enzymsysteme Diaphorase (DIA, E.C.-Nr. 1.6.4.3 nach IUB 1984), Endopeptidase (ENP, E.C.-Nr. 3.4.9.9),

Esterase (EST, E.C.-Nr. 3.1.1.1), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT, E.C.-Nr. 2.6.1.1), Isocitrat-Dehydrogenase (IDH, E.C.-Nr. 1.1.1.42), Leucin-Aminopeptidase (LAP, E.C.-Nr. 3.4.11.1), Malat-Dehydrogenase (MDH, E.C. Nr. 1.1.1.37), Malisches Enzym (ME, E.C.-Nr. 1.1.1.40), Peroxidase (PRX, E.C.-Nr. 1.11.1.7), 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (PGD, E.C.-Nr. 1.1.1.44), Phosphogluco-Isomerase (PGI, E.C.-Nr. 5.3.1.9), Saure Phosphatase (ACP, E.C.-Nr. 3.1.3.2), Shikimat-Dehydrogenase (SKD, E.C.-Nr. 1.1.1.25) und Superoxid-Dismutase (SOD, E.C.-Nr. 1.15.1.1) untersucht.

### Extraktion

Zur Herstellung der Extrakte wurden die jüngsten Blätter des Frühjahrsaustriebes von Freilandbäumen genutzt. Eine Menge von 200 mg des frischen oder kurzzeitig bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Pflanzenmaterials wurde zur Verhinderung von phenolischen Oxidationen mit 100 mg PVP-40 versetzt und in 1 ml Extraktionspuffer mittels Mörser und Pistill homogenisiert.

Der Extraktionspuffer wies folgende Zusammensetzung auf (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

100 mM	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
100 mM	Dinatriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
5 mM	Thioharnstoff
14,3 mM	Mercaptoethanol
146 mM	Saccharose
1 %	Albumin
0,05 %	Triton X-100; 0,05 %ige Lösung
	pH = 7,5 (eingestellt mit 1 N NaOH)

Die Homogenate wurden 1 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $35000 \times g$  zentrifugiert, die Überstände in Eppendorf-Tubs pipettiert und bis zur Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### Elektrophorese

Die Trennung aller Enzymsysteme mit Ausnahme der GOT erfolgte durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) in einer DESAPHOR HF Kammer der Firma Desaga, Heidelberg. In der Herstellung der Gele ( $265 \times 110 \times 0,3\text{ mm}$ ) wurde nach der sogenannten Klapptechnik (RADOLA 1980) verfahren, bei der die Gellösung auf eine GelBond-PAG-Folie (Fa. Pharmacia) aufpolymerisiert wird. Die Acrylamidkonzentration betrug  $7,5\text{ \% T} / 3\text{ \% C}$ . Weiterhin beinhalteten die Gele  $15\text{ \% Glycerol}$  und  $7,5\text{ \%}$  der handelsüblichen  $40\text{ \%igen}$

Servalytlösungen (Serva). Die Anteile der einzelnen Servalytarten an der gesamten Servalytmenge war abhängig vom jeweils zu untersuchenden Enzymsystem:

- ACP, DIA, ENP, IDH,  
LAP, ME, PGD, PGI, SKD:                   41 % Servalyt pH 4-7  
  + 59 % Servalyt pH 3-10
- EST:   5 % Servalyt pH 3-10  
  + 36 % Servalyt pH 6-9  
  + 59 % Servalyt pH 2-11
- MDH :   100 % Servalyt pH 3-10
- PRX:   100 % Servalyt pH 2-11

Nach dem Entlüften wurden der Gellösung als Katalysator der Co-Polymerisation zwischen Acrylamid und Bis 0,055 % TEMED und 0,055 % Ammoniumperoxodisulfat zugesetzt. Die Gele konnten nach einer zweistündigen Polymerisationsdauer der Gießvorrichtung entnommen und entweder sofort genutzt oder in einer Feuchtekammer für maximal sieben Tage bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt werden.

Für die Trennung wurden mit den entsprechenden Elektrodenflüssigkeiten getränkte Filterpapierstreifen auf die obere bzw. untere Gelkante aufgelegt. Der Anodenpuffer bestand aus 25 mM L-Asparaginsäure und 25 mM L-Glutaminsäure; der Kathodenpuffer aus 25 mM L-Arginin, 25 mM L-Lysin und 2 M Ethylendiamin (KINSKOFER und RADOLA 1981).

Nach einer einstündigen Vorfokussierung bei 200 V wurden jeweils 10 µl der Extrakte unter Nutzung eines Silikonlochbandes für 54 Proben auf das Gel appliziert. Der Abstand der Applikationsstelle zur Kathode betrug für die PRX-Trennung 4,5 cm, für MDH und EST 2 cm sowie für alle anderen Enzymsysteme 1 cm.

Bei einer Begrenzung der Stromstärke auf 20 mA und der Leistung auf 8 W wurde die Spannung während des Probeneinlaufes und der Fokussierung schrittweise wie folgt erhöht:

1 h – 200 V, 0,5 h – 400 V, 0,5 h – 800 V, 0,5 h – 1200 V, 2 h – 1600 V.

Die Trennung des Enzymsystems GOT wurde mittels vertikaler Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE) unter Nutzung von zwei verschiedenen Protokollen, die jedoch identische Ergebnisse lieferten, realisiert.

Die im Rahmen der Spaltungsanalysen durchgeführten Trennungen sowie die Untersuchung der Parthenogenese- und Antherenkulturregenerate des Donors 'Remo' erfolgten an der Abteilung für Angewandte Genetik der Universität Hannover in DESAPHOR-VA-Kammern (Fa. Desaga). Die 1,5 mm dicken Gele wiesen eine Trennstrecke von 15 cm auf. Die Acrylamidkonzentration betrug 8 % T / 3 % C. Nach dem Entlüften wurden dem im

Elektrodenpuffer gelösten Acrylamid 6,2 % TEMED und 5,6 % Ammoniumperoxodisulfat zugegeben. Der Elektrodenpuffer bestand aus 125 mM Tris / 19 mM Borsäure (STEGEMANN et al. 1983). Pro Gel wurden 24 Probeauftragetaschen geformt, in die jeweils 20 µl Extrakt pipettiert wurden. Nach zehnminütigem Einlaufen bei 25 mA erfolgte die Trennung bei 50 mA pro Gel und maximal 400 V sowie einer Temperatur von 4 °C. Die Trenndauer betrug 4 h.

Für die Untersuchungen der GOT in androgenetischen Regeneraten des Donors 'Rene', die am Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz durchgeführt worden sind, kam eine Elektrophoresekammer des Typs Mini-Protean-II (Fa. Bio-Rad) zum Einsatz. Gel- und Pufferzusammensetzungen wurden in Anlehnung an LAURENS (1986) modifiziert. Die Trennstrecke der diskontinuierlichen, 1 mm dicken Gele betrug 7 cm. Das Trenngel wies eine Acrylamidkonzentration von 9,5 % T / 4,8 % C auf. Als Trennpuffer wurde 90 mM Tris / 90 mM Borsäure / 2,75 mM EDTA pH 8,3 verwendet; außerdem beinhaltete das Trenngel 0,005 % Triton X-100. Zur Polymerisation wurden der Trenngellösung nach dem Entgasen 0,15 % Ammoniumperoxodisulfat sowie 0,04 % TEMED zugesetzt. Nach dem Einfüllen in die Gießkuvette erfolgte eine vorsichtige Überschichtung der Trenngellösung mit etwas entionisiertem Wasser, das nach der Polymerisation wieder entfernt worden ist. Die anschließend auf das Trenngel gegossene Sammelgellösung bestand aus 4,1 % T / 4,8 % C Acrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,005 % Triton X-100 sowie 0,13 % Ammoniumperoxodisulfat und 0,05 % TEMED (zugegeben nach vorherigem Entgasen). Jedes Gel besaß zehn Probetaschen. Als Elektrodenpuffer diente eine 1:4-Verdünnung einer Stammlösung aus 0,9 M Tris / 0,9 M HCl / 27,5 mM EDTA pH 8,3. Pro Probetasche wurden 10 µl Extrakt eingegeben. Um ein Vermischen mit dem Elektrodenpuffer zu verhindern und die Eingabe zu erleichtern, waren die Extrakte vorher zusätzlich mit 5 % Saccharose und 5 % einer 0,02 %igen Bromphenolblaulösung angereichert worden. Da die Elektrophoresekammer keine eigene Kühlmöglichkeit aufweist, wurde sie nach dem Auftragen der Extrakte in eine Styroporkiste mit Kühlgelkissen, die auf -20°C vorgekühlt worden waren, gesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V und 20 mA für 110 min.

### Färbung und Fixierung

Im Anschluss an die Trennung erfolgte die Färbung der Gele auf die verschiedenen Isoenzyme. Für die Fokussiergele wurde die Methode der direkten Visualisierung mit mehrfach höherer Konzentration der Färbelösungen als normalerweise üblich angewendet (KINZKOFER und RADOLA 1983), da traditionelle Färbetechniken mit oft längeren

Inkubationszeiten aufgrund möglicher Auswaschung und Diffusion der Isoenzyme im Gel für derartig dünne Gele nicht geeignet sind. Nachfolgend sind die für die einzelnen Enzyme genutzten Färbelösungen, die mit Hilfe eines Glasstabes über die Gele gestrichen wurden, sowie die Inkubationsbedingungen angeführt:

**ACP** (modifiziert nach CHEVREAU 1984):

Färbelösung:	6 ml	0,5 M Natriumacetat pH 5,0
	100 mg	$\alpha$ -Naphthylphosphat
	100 mg	Fast Garnet GBC
	24 ml	entionisiertes Wasser
Inkubieren:	30 min	im Dunkeln bei Raumtemperatur

**DIA** (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Färbelösung:	4 ml	0,2 M Tris/HCl pH 8,0
	60 $\mu$ l	2,6-Dichloroindophenol (1 %ig)
	25 mg	NADH
	2 ml	MTT (1 %ig)
	14 ml	entionisiertes Wasser
Inkubieren:	45 min	im Dunkeln bei Raumtemperatur

**ENP** (modifiziert nach CHEVREAU 1984):

Färbelösung:	6 ml	0,25 M Tris/Maleinsäure pH 3,3
	50 mg	BANA, gelöst in 1ml Methanol
	30 mg	Fast Black K
	12 ml	entionisiertes Wasser
Inkubieren:	45 min	im Dunkeln bei Raumtemperatur

**EST** (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Färbelösung:	19 ml	0,2 M Tris/HCl pH 6,0
	40 mg	$\alpha$ -Naphthylacetat (für $\alpha$ -EST) oder $\beta$ -Naphthylacetat (für $\beta$ -EST), gelöst in
	1 ml	Aceton
	50 mg	Fast Blue RR
Inkubieren:	30 min	im Dunkeln bei Raumtemperatur

**IDH** (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Färbelösung:	4 ml	0,2 M Tris/HCl pH 8,0
	80 mg	DL-Isocitrat
	0,2 ml	0,4 M MgCl <sub>2</sub>
	10 mg	NADP
	1 ml	NBT (1 %ig)
	0,1 ml	PMS (1 %ig)
	15 ml	enthionisiertes Wasser

Inkubieren: 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur

**LAP** (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Färbelösung:	24 ml	0,5 M Tris/Maleinsäure pH 5,4
	30 mg	L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid, gelöst in
	1 ml	Aceton
	50 mg	Fast Black K

Inkubieren: 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur

**MDH** (modifiziert nach BOURNIVAL und KORBAN 1987):

Färbelösung:	3 ml	0,2 M Tris/HCl pH 8,0
	6 ml	1 M L-Äpfelsäure pH 8,0 (NaOH)
	4 ml	0,1 M NaCl
	20 mg	NAD
	2 ml	NBT (1 %ig)
	0,2 ml	PMS (1 %ig)

Inkubieren: 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur

**ME** (modifiziert nach WEEDEN und LAMB 1987):

Färbelösung:	17 ml	0,1 M Tris / DL-Äpfelsäure pH 7,2
	6 ml	1 M L-Äpfelsäure pH 8,0
	1 ml	0,4 M MgCl <sub>2</sub>
	5 mg	NADP
	2 ml	MTT (1 %ig)
	0,1 ml	Meldola Blue (1 %ig)

Inkubieren: 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur

**PGD** (mod., pers.Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Färbelösung:	4 ml	0,1 M Tris/DL-Äpfelsäure pH 7,2
	30 mg	6-Phosphogluconat
	5 mg	NADP
	2 ml	MTT (1 %ig)
	0,1 ml	Meldola Blue (1 %ig)
	14 ml	entionisiertes Wasser
Inkubieren:	30 min	im Dunkeln bei Raumtemperatur

**PGI** (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Färbelösung:	10 ml	0,2 M Tris/HCl pH 8,0
	50 mg	D-Fructose-6-phosphat
	0,5 ml	0,4 M MgCl <sub>2</sub>
	5 mg	NADP
	1 ml	NBT (1 %ig)
	0,1 ml	PMS (1 %ig)
	10 ml	entionisiertes Wasser
	50 U	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, unmittelbar vor Inkubation zugeben
Inkubieren:	30 min	im Dunkeln bei Raumtemperatur

**PRX** (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Färbelösung:	6 ml	0,5 M Natriumacetat pH 5,0
	25 mg	3-Amino-9-Ethylcarbazol, gelöst in
	2,5 ml	Dimethylformamid
	21,5 ml	entionisiertes Wasser
	1 ml	Wasserstoffperoxid (3 %ig), unmittelbar vor Inkubation zugeben
Inkubieren:	30 min	im Dunkeln bei Raumtemperatur

**SKD** (modifiziert nach TANKSLEY und RICK 1980):

Färbelösung:	20 ml	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
	50 mg	Shikimisäure
	7,5 mg	NADP
	1 ml	MTT (1 %ig)
	0,4 ml	PMS (1 %ig)
Inkubieren:	45 min	im Dunkeln bei Raumtemperatur

**SOD** (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Färbelösung:	20 ml	0,05 M K/Na <sub>2</sub> -phosphat pH 7,5
	20 mg	NAD
	2 ml	NBT (1 %ig)
	80 µl	TEMED
	2 mg	Riboflavin
Inkubieren:	20 min im Licht (100 W) bei Raumtemperatur	

Die Fixierung der Färbungen in den Fokussiergelen erfolgte in einer Lösung aus 7 % Essigsäure und 3 % Glycerol für 10 min.

Die Färbung der für die Darstellung der GOT an der Universität Hannover verwendeten Polyacrylamidgele wurde wie folgt durchgeführt (modifiziert nach JAASKA 1981):

Umpuffern:	20 min. in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5	
Substratlösung:	34 ml	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
	0,5 g	PVP-40
	8,5 ml	0,2 M L-Asparaginsäure pH 7,5
	2,5 ml	0,2 M α-Ketoglutarat pH 7,5
	5 ml	0,1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Inkubieren:	10-15 min im Dunkeln bei 37 °C; Lösung abgießen	
Färbelösung:	50 ml	0,1 M Tris/HCl pH 7,5
	100 mg	o-Dianisidin, tetrazotiert
Inkubieren:	bis zum Abschluss der Färbung im Dunkeln bei 37 °C unter leichtem Schütteln	

Zur Fixierung wurden die Gele in einer Lösung aus 70 % Ethanol und 1 % Glycerol für mindestens 2 h belassen.

Die am Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz genutzten diskontinuierlichen Polyacrylamidgele wurden mittels nachstehender Rezeptur auf GOT gefärbt (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

Umpuffern:	5 min. in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5	
Färbelösung:	60 mg	L-Asparaginsäure
	30 mg	α-Ketoglutarat
	20 ml	entionisiertes Wasser, pH 8,0 mit 1N NaOH einstellen, Zugabe von
	30 mg	Fast Blue BB
Inkubieren:	30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur	

Die Färbungen wurden in einer Lösung aus 7 % Essigsäure und 3 % Glycerol für 10 min fixiert.

#### Dokumentation und Auswertung der Gele

Zur Dokumentation wurden die IEF-Gele mehrere Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Die PAGE-Gele wurden sofort nach der Fixierung zwischen zwei Cellophanfolien auf eine Glasplatte aufgezogen und ebenfalls bei Raumtemperatur getrocknet.

Bei Zymogrammen, die deutlich in mehrere Aktivitätszonen eingeteilt werden konnten, wurden diese, beginnend mit der der Anode am nächsten liegenden Zone, in aufsteigender Reihenfolge mit arabischen Ziffern bezeichnet. Für die Benennung der einzelnen zu einer Aktivitätszone gehörenden Banden sind Kleinbuchstaben gewählt worden, wobei die am weitesten gewanderte Bande mit a, die nächstfolgende mit b usw. charakterisiert wurde.

Die für die Aktivitätszonen kodierenden Gene erhielten die gleiche Bezeichnung. Die Darstellung erfolgte dabei nach den von ALSTON et al. (2000) vorgeschlagenen Regeln in kursiver Schrift. Konnte nicht gesichert werden, dass ein in dieser Weise benannter Locus einem in der Literatur bereits beschriebenen gleichnamigen Locus identisch war, wurde die Ziffer der eigenen Locusbezeichnung in Klammern gesetzt.

Zur Unterstützung der Auswertung und Beschreibung der Zymogramme in IEF-Gelen wurde der mit Hilfe einer Spezialelektrode ermittelte pH-Gradient genutzt.

#### **Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Spaltungsergebnisse erfolgte für jeden spaltenden Locus mittels des  $\chi^2$ -Testes, mit welchem die Übereinstimmung des erhaltenen Gesamtaufspaltungsverhältnisses mit dem theoretischen genetischen Aufspaltungsverhältnis bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % geprüft wurde.

Für die Kopplungsanalyse ist das Programm JoinMap 2.0 (STAM 1993, STAM und VAN OOIJEN 1995) verwendet worden, mit dem die Prüfung der Kopplung zweier Loci anhand des LOD-Wertes erfolgt. Der LOD-Wert ist der  $\log_{10}$  aus dem Quotienten der Wahrscheinlichkeit, die sich für die beobachteten Daten unter Annahme des Maximum-Likelihood-Rekombinationswertes bei Kopplung der betrachteten Loci ergibt, und der Wahrscheinlichkeit, die sich ergibt, wenn angenommen wird, dass die Loci nicht gekoppelt vorliegen (MORTON 1955). Aufgrund der relativ geringen Anzahl der Loci wurde als Grenzwert für die Signifikanz einer Kopplung ein LOD-Wert von 3,0 gewählt. Bei zwei Loci

entspricht dieser Wert etwa der Wahrscheinlichkeit von 0,001 und weist bei Überschreitung auf Kopplung hin.

### 2.2.1.2 Gewebespezifische Expression und Stabilität der spaltenden Loci

Nach der Ermittlung der spaltenden Loci, die unter Nutzung von Extrakten junger Freilandblätter erfolgt war, sollte geprüft werden, ob diese Loci auch in In-vitro-Geweben exprimiert werden. In diesem Zusammenhang mussten auch Erkenntnisse zur Stabilität der Expression im Verlauf entwicklungsphysiologischer Prozesse und unter dem Einfluss verschiedener Kultivierungsbedingungen gewonnen werden. Aus diesen Gründen wurde das nachfolgend aufgeführte Pflanzenmaterial mindestens dreimal analysiert und die erhaltenen Zymogramme untereinander sowie mit den Zymogrammen der Spaltungsanalysen verglichen:

- (1) In-vitro-Sprosse; kultiviert auf den Sprossvermehrungsmedien S1 und S2, frisch etabliert bzw. seit mehr als einem Jahr in Vermehrung, jeweils 2, 4 und 6 Wochen nach der letzten Subkultur extrahiert
- (2) einzelne Blätter dieser oben genannten In-vitro-Sprosse, ebenfalls entnommen 2, 4 und 6 Wochen nach der letzten Subkultur
- (3) Blätter veredelter Freilandbäume während des Knospenaustriebs, des Triebwachstums sowie nach Triebabschluss entnommen
- (4) sich öffnende Blattknospen vorgetriebener Reiser
- (5) sekundäre Embryoide und Keimblätter, Adventivknospen und regenerierte Sprosse, entnommen während des Regenerationsprozesses in-vitro-kultivierter Antheren

Als Spendergenotypen für die unter den Punkten 1-4 genannten Pflanzenmaterialien dienten die Sorten 'Alkmene', 'Remo', 'Releika', 'Pinova' und 'Golden Delicious' sowie die Wildform *Malus robusta* 'Persicifolia'. Die androgenetischen Regenerate (5) stammten von 'Alkmene', 'Remo' und 'Releika'. Die Zusammensetzung der Sprossvermehrungsmedien S1 und S2 ist in Kap. 3.2.1, S. 82 beschrieben.

Die Isoenzymanalysen sind nach der in Kap. 2.2.1.1 beschriebenen Methodik durchgeführt worden. Lediglich die Mazeration der androgenetischen Regenerate erfolgte aufgrund der geringen Gewebemengen mittels eines speziellen Stößels direkt in Eppendorf-Tubs.

### 2.2.1.3 Donorspezifische Marker

Die Bestimmung der Marker für die in der Haploidentechnik genutzten Donorgenotypen erfolgte auf der Grundlage der Ergebnisse der Spaltungsanalysen sowie der Testung der gewebespezifischen Expression und der Stabilität. Dabei wurden für die Markerermittlung folgende Kriterien zugrunde gelegt:

- (1) Heterozygotie im Donorgenotyp
- (2) Ausprägung der spaltenden Allele schon in In-vitro-Geweben
- (3) Variationsfreiheit der Bandenmuster während des Durchlaufens verschiedener Entwicklungsstadien und -prozesse sowie infolge sich ändernder Kulturbedingungen
- (4) monogen vererbende Isoenzyme werden gegenüber digen bedingten Isoenzymen bevorzugt

### 2.2.2 Homozygotietest

#### Material

Das zu testende Pflanzenmaterial wurde nach vorliegenden Protokollen mittels Antherenkultur (HÖFER 1995, 1997), Mikrosporenkultur (HÖFER et al. 1999a) sowie auf dem Weg der In-situ-Parthenogenese mit nachfolgender In-vitro-Kultur der unreifen Embryonen (HÖFER et al. 1999b) von Frau Dr. Höfer, Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz, erzeugt und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

#### Antherenkultur

Das aus der Antherenkultur stammende Pflanzenmaterial ist getrennt nach Genotypen in Tab. 2.1 zusammengestellt worden. Es umfasste einerseits die verschiedenen Entwicklungsstadien des Regenerationsprozesses, die sich der Bildung eines Primärembryoideen anschließen können, d. h. sekundäre Keimblätter bzw. sekundäre Embryoide, Adventivknospen und aus diesen Strukturen unmittelbar regenerierte Sprosse. Andererseits wurden In-vitro-Vermehrungssprosse, die aus den regenerierten Sprossen gewonnen worden waren, bewurzelte Sprosse während der Überführungsphase sowie auf eigener Wurzel stehende Pflanzen aus Gewächshaus und Freiland untersucht. Auch Pflanzenmaterial, welches bereits als Edelreis auf eine Unterlage veredelt worden war, wurde in die Untersuchungen einbezogen.

**Tab. 2.1:** Antherenkulturregenerate für den Homozygotietest.  
Die Anzahl der Linien entspricht der Anzahl der Primärembryoide, aus denen die Regenerate hervorgegangen sind.

Donor	Jahr der Inkulturnahme	Anzahl der Linien	Anzahl der untersuchten Regenerate			Insgesamt
			Unmittelbar regenerierte Strukturen	Sprosse aus In-vitro-Vermehrung	Bewurzeltes bzw. veredeltes Material	
Alkmene	1992 – 2000	68	154	835	11	1000
Alkmene × Delbard	1995	1	0	15	0	15
Releika	1991	1	9	20	0	29
Remo	1991 – 1997	12	70	143	12	225
Remura	1997 – 2000	5	0	109	0	109
Rene	1995 – 1999	22	63	456	0	519
Pi-A- 5,164	1994 – 1997	19	23	379	5	407
Pi-A- 15,38	1995	1	0	22	0	22
Pi-A- 16,97	1994	1	1	13	0	14
Pi-A- 24,45	1994 – 1997	6	9	69	0	78
<b>Summe</b>		<b>136</b>	<b>329</b>	<b>2061</b>	<b>28</b>	<b>2418</b>

### Mikrosporenkultur

Aus der Mikrosporenkultur wurden drei verschiedene Linien des Donors 'Rene' (2/97, 128/1/II/98, 113/1/98) mit jeweils 106, 32 und 27 Regeneraten getestet. Bis auf eine Blattprobe aus dem Freiland bestand das Untersuchungsmaterial aus In-vitro-Vermehrungs-sprossen.

### In-situ-Parthenogenese

Das auf dem Weg der In-situ-Parthenogenese erzeugte Pflanzenmaterial umfasste insgesamt 21 grünlaubige Regenerationslinien. Davon entfielen elf auf den Spendergenotyp 'Alkmene' (A1/1, A3/1, A4/2, A9/2, A12/4, A14/4, A18/3, A20/2, A21/1, A26/2, A34/1), acht auf 'Piglos' (P3/4, P5/1, P5/4/I, P5/4/II, P7/1, P12/1, P13/1, P15/1) und zwei auf 'Remo' (R6/1, R7/1). Die von 'Alkmene' und 'Piglos' abstammenden Linien waren 1993 erzeugt worden, die beiden 'Remo'-Linien dagegen 1994.

Alle Linien wurden zunächst unter Verwendung von In-vitro-Sprossen getestet. Später erfolgten in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Linien bis zu zwei weitere Untersuchungen an jungem Blattmaterial aus Gewächshaus und Freiland. Darüber hinaus wurde – ebenfalls anhand junger Blätter – die Bestimmung der Isoenzym-Phänotypen des Bestäubers *Malus pumila* var. *Niedzwetskyana* durchgeführt.

Das unter den einzelnen Erzeugungsmethoden beschriebene Pflanzenmaterial wird, wenn keine Unterscheidung notwendig ist, im Verlauf der weiteren Darlegungen unabhängig vom untersuchten Regenerations-, Vermehrungs- oder Erhaltungsstadium zusammenfassend als 'Regenerat' bzw. 'Regenerate' bezeichnet.

### **Marker**

Für die Untersuchung von Regeneraten aus der Antheren- und Mikrosporenkultur erschien die Anwendung eines einzigen Markers als ausreichend, sofern dieser in jedem Entwicklungsstadium ohne Einschränkungen eine eindeutige Charakterisierung zuließ. Für die Regenerate von 'Alkmene', 'Alkmene' × 'Delbard', 'Releika', Pi-A-5,164 und Pi-A-16,97 wurden daher die monogen vererbenden Marker *Enp* oder *Lap-1* gewählt. Da beide Loci in gleicher Weise uneingeschränkt für Pi-A-24,45 einsetzbar sind, wurde ein Großteil der Regenerate dieses Donors durch beide Marker untersucht. Damit war es möglich, die Übereinstimmung der Ergebnisse zu prüfen.

Der ebenfalls monogene und stabile Marker *Got-(1)* stand erst nach Etablierung der entsprechenden Trennmethode am Institut für Obstzüchtung im Jahr 2000 für den

routinemäßigen Einsatz zur Verfügung. Aus diesem Grund musste die Charakterisierung der Regenerate von 'Remo' und 'Rene' zunächst mit Hilfe des digen kodierten Isoenzym *Mdh-(3)* durchgeführt werden. War mittels *Mdh-(3)* kein eindeutiges Ergebnis erzielt worden, erfolgte – zunächst 1998 an der Universität Hannover und ab 2000 am Institut für Obstzüchtung – eine Nachuntersuchung auf *Got-(1)* für die Linien, die bis dahin überlebt hatten. Alle Regenerate der Linien beider Donoren, die erstmals in den Jahren 2000 und 2001 zur Charakterisierung bereit standen, wurden sowohl für *Mdh-(3)* als auch für *Got-(1)* getestet. Darüber hinaus wurde *Mdh-(3)* zusätzlich für die Testung einer Vielzahl von Regeneraten der Donoren Pi-A-5,164 und Pi-A-24,45 eingesetzt.

Die Regenerate aus der In-situ-Parthenogenese wurden auf Grund ihrer vielfältigeren potentiellen Entstehungsmöglichkeiten grundsätzlich mit allen für den betreffenden Donor-Genotyp zur Verfügung stehenden Markern getestet, obwohl bei einigen nicht in jedem Fall ein eindeutiges Ergebnis zu erwarten war. In Ergänzung zu den heterozygoten Markern erfolgte außerdem die Prüfung homozygoter Loci, um eventuell versehentliche Fremdbestäubungen erkennen zu können.

Einen zusammenfassenden Überblick über die in Abhängigkeit von Erzeugungsmethode und Donor-Genotyp untersuchten Loci gibt Tab. 2.2.

**Tab. 2.2:** Marker für den Homozygotietest in Abhängigkeit von Donor-Genotyp und Erzeugungsmethode der Regenerate.

Donor	Regenerate der Antheren- und Mikrosorenkultur	Regenerate der In-situ-Parthenogenese
'Alkmene'	<i>Lap-1</i>	<i>Dia<sup>a</sup>, Lap-1, Pgi-(2)<sup>a</sup></i>
'Alkmene' × 'Delbard'	<i>Enp</i>	<i>Acp-(1)<sup>b</sup>, Acp-(2)<sup>b</sup>, Enp,</i> <i>Got-(1), Sod-(2)</i>
'Piglos'		
'Releika'	<i>Enp</i>	
'Remo'	<i>Mdh-(3), Got-(1)</i>	<i>Acp-(1)<sup>b</sup>, Dia<sup>a</sup>, Got-(1),</i> <i>Mdh-(3), Prx-3<sup>a</sup></i>
'Rene'	<i>Mdh-(3), Got-(1)</i>	
Pi-A-5,164	<i>Enp, Mdh-(3)</i>	
Pi-A-15,38	<i>Enp</i>	
Pi-A-16,97	<i>Enp</i>	
Pi-A-24,45	<i>Enp, Lap-1, Mdh-(3)</i>	

<sup>a</sup> Verwendung von jungen Blättern aus Gewächshaus und Freiland

<sup>b</sup> Verwendung von austreibenden Freilandknospen

### **Isoenzymanalysen**

Aufgrund ihrer geringen Größe wurden sekundäre Keimblätter und Embryoide, Adventivknospen sowie die Mehrzahl der unmittelbar regenerierten Sprosse vollständig für die Extraktion verwendet. Von In-vitro-Vermehrungssprossen wurden zwei bis drei z. T. mit Internodienstücken kombinierte Blätter extrahiert, während von bewurzelttem bzw. veredeltem Material ein bis zwei der jüngsten Blätter entnommen wurden. Mit Ausnahme der Mazeration der in geringeren Mengen zur Verfügung stehenden In-vitro-Gewebe, die wiederum direkt in Eppendorf-Tubs erfolgte, wurden die Isoenzymanalysen nach dem in Kap. 2.2.1.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

### **2.2.3 Spaltung der Marker bei Antherenkulturlinien**

Auf der Grundlage der für die Markerloci *Enp*, *Got-(1)*, *Lap-1* und *Mdh-(3)* im Homozygotietest erzielten Ergebnisse sollte geprüft werden, ob die Regeneration innerhalb der Antherenkultur zufällig erfolgte oder ob Unterschiede in der Regenerationsfähigkeit der Gameten vorlagen. Dazu wurden für jeden Locus die absoluten Häufigkeiten der bei den einzelnen Linien beobachteten Phänotypen ermittelt und die Spaltungsdaten unter Verwendung des  $\chi^2$ -Testes mit dem theoretischen Spaltungsverhältnis von 1:1 verglichen.

In den Test sind nur Linien einbezogen worden, deren Regenerate einen einheitlichen Phänotyp für den betreffenden Marker gezeigt hatten, d. h. keiner gametoklonalen Variation unterworfen waren.

### **2.2.4 Gametoklonale Variation bei Antherenkulturregeneraten**

Das Auftreten von gametoklonaler Variation wurde anhand der drei am häufigsten untersuchten Loci *Enp*, *Lap-1* und *Mdh-(3)* geprüft. Einen wesentlichen Anteil der Daten lieferten die Phänotypen, die für die einzelnen Regenerate im Verlauf der Homozygotietestungen erhalten wurden. Darüber hinaus wurden die Regenerate, soweit eine ausreichende Extraktmenge vorhanden war, zusätzlich an den nicht für den Homozygotietest genutzten Loci getestet. Einen zahlenmäßigen Überblick über das am jeweiligen Locus analysierte Pflanzenmaterial vermittelt Tab. 2.3.

Im Mittelpunkt der Betrachtungen stand sowohl die Einheitlichkeit der Regenerate innerhalb einer Linie als auch das Auftreten unerwarteter Phänotypen.

**Tab. 2.3:** Pflanzenmaterial für die Untersuchung zum Auftreten von gametoklonaler Variation an den Loci *Enp*, *Lap-1* und *Mdh-(3)*.

<b>Donor</b>	<b><i>Enp</i></b>			<b><i>Lap-1</i></b>			<b><i>Mdh-(3)</i></b>		
	Anzahl Regenerate insgesamt	Anzahl Linien mit einem Regenerat	Anzahl Linien mit mehreren Regene- raten	Anzahl Regenerate insgesamt	Anzahl Linien mit einem Regenerat	Anzahl Linien mit mehreren Regene- raten	Anzahl Regenerate insgesamt	Anzahl Linien mit einem Regenerat	Anzahl Linien mit mehreren Regene- raten
'Alkmene'	450	6	31	1000	19	49	1017	19	50
'Alkmene' × 'Delbard'	15	0	1	15	0	1	15	0	1
'Releika'	29	0	1	29	0	1	29	0	1
'Remo'	103	1	5	218	1	9	225	3	9
'Remura'	47	0	2	109	0	5	109	0	5
'Rene'	337	0	17	466	0	21	521	0	22
Pi-A-5,164	407	2	17	394	0	16	405	2	17
Pi-A-15,38	22	0	1	22	0	1	22	0	1
Pi-A-16,97	15	0	1	12	0	1	14	0	1
Pi-A-24,45	78	1	5	69	0	5	77	0	5
<b>Summe</b>	<b>1503</b>	<b>10</b>	<b>81</b>	<b>2334</b>	<b>20</b>	<b>109</b>	<b>2434</b>	<b>24</b>	<b>112</b>

## 2.3 Ergebnisse

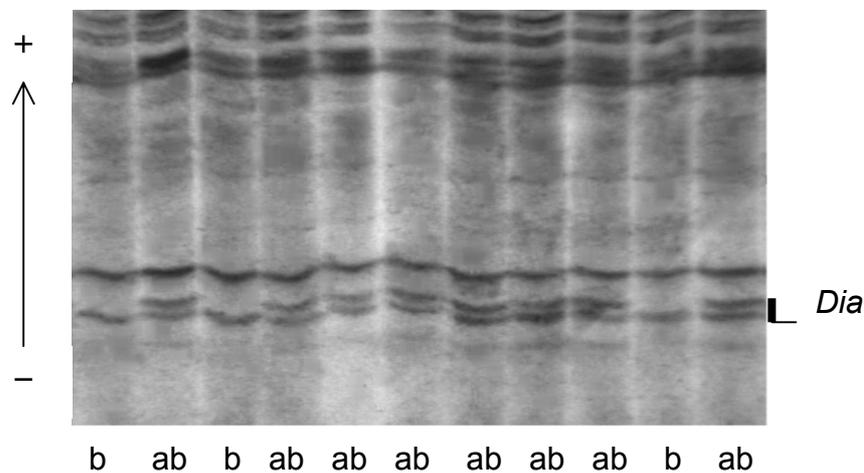
### 2.3.1 Markerentwicklung

#### 2.3.1.1 Spaltungs- und Kopplungsanalysen

Hinsichtlich spaltender Loci ergab die Auswertung der Zymogramme die nachfolgend dargestellten Ergebnisse.

#### Diaphorase (DIA)

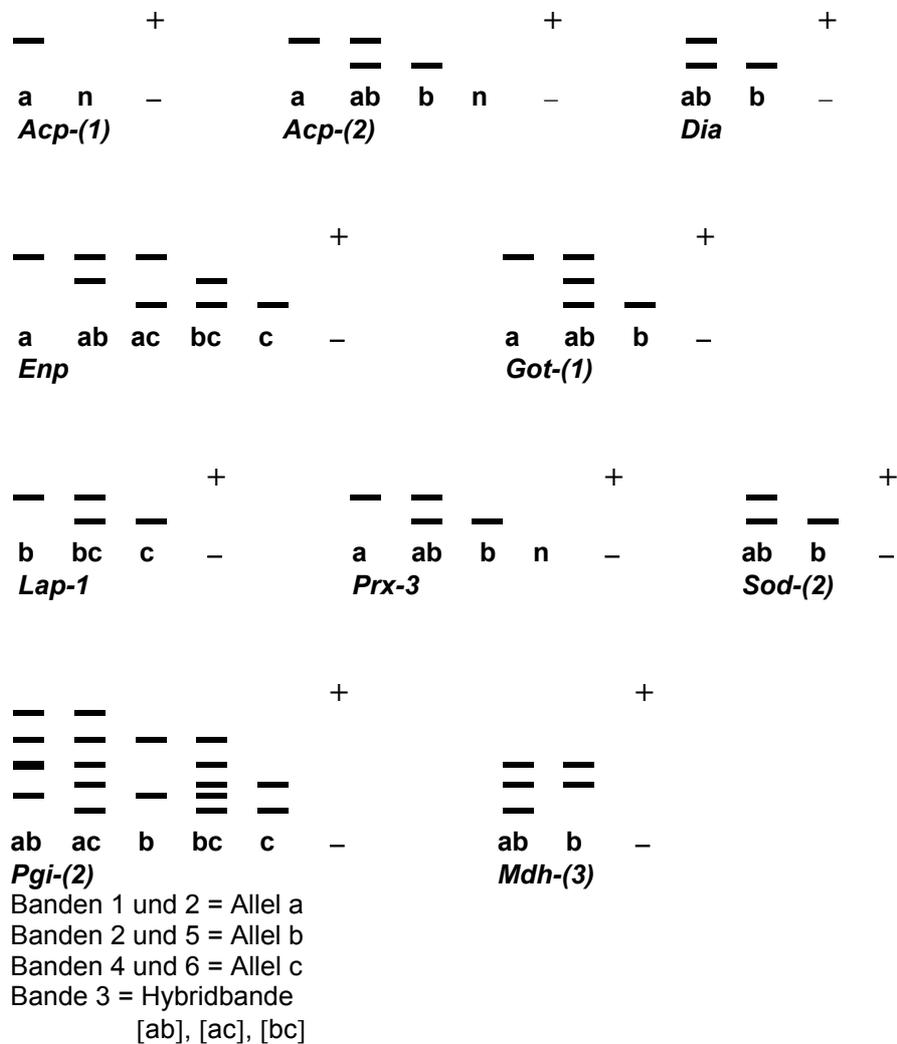
Die Diaphorase exprimierte innerhalb der pH-Grenzen 4,5 und 8,0 sehr komplexe, aber homogene Bandenmuster. Es wurden nur zwei variierende Banden *a* und *b* identifiziert, von denen angenommen wurde, dass sie die Allele *a* und *b* eines Locus darstellen. Die Kombination beider Allele ergab in den betrachteten Kreuzungen die Phänotypenklassen [ab] und [b], die in Abb. 2.1 als Foto sowie in Abb. 2.2 schematisch dargestellt sind. Da sich innerhalb der Nachkommenschaft von 'Releika' [ab] × 'Rewena' [ab] keine Aufspaltung zeigte und in den Populationen von 'Antonowka' × 'Alkmene' sowie 'Releika' × 'Dülmener Rosenapfel' keine [a]-Phänotypen auftraten, wurde angenommen, dass dieser Locus in duplizierter Form vorliegt.



**Abb. 2.1:** Aufspaltung am duplizierten Locus *Dia* mit den Phänotypen [ab] und [b].

Die innerhalb der Nachkommenschaften beobachteten Phänotypenklassen können durch verschiedene Allelkombinationen im Genotyp der Eltern kodiert werden (Tab. 2.4). Für die Analyse der Spaltungsdaten wurden beide Gene in jeder möglichen Kombination sowohl gekoppelt vorliegend als auch frei spaltend betrachtet. Da in jeder Kombination der Kreuzung

'Alkmene' × Pi-A-43,31 signifikante Abweichungen auftraten, kann von einem gestörten Spaltungsverhältnis ausgegangen werden. Der signifikante  $\chi^2$ -Wert in 'Releika' × 'Dülmener Rosenapfel' lehnt in allen Kombinationen eine Unabhängigkeit beider Gene ab. Die  $\chi^2$ -Werte der vom Typ her ähnlichen Kreuzung 'Antonowka' × 'Alkmene' sowie die der Kreuzungen 'Piglos' × 'Pilot' und 'Remo' × 'Piros' bekräftigen diese Vermutung bzw. stehen ihr nicht entgegen. Die signifikanten Abweichungen in der Nachkommenschaft von 'Pikant' × 'Remo' können aufgrund der in 'Remo' × 'Piros' erzielten Werte ebenfalls als gestörtes Spaltungsverhältnis interpretiert werden. Ein gekoppeltes Vorliegen beider Gene ist somit wahrscheinlich.



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der beobachteten Phänotypen (ohne Sekundärbanden).

**Tab. 2.4:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Dia*.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft		Genotypen der Eltern <sup>a</sup>	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[ab]	[b]			
'Alkmene' [ab] × Pi-A-43,31 [b]	1	9	<i>ab, bb</i> × <i>bb, bb</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	6,40 *
			<i>ab, ab</i> × <i>bb, bb</i>	1:1 <sup>b</sup>	6,40 *
				3:1 <sup>c</sup>	22,53 ***
'Antonowka' [ab] × 'Alkmene' [ab]	10	4	<i>ab, bb</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,10
				1:3 <sup>c</sup>	16,01 ***
			<i>ab, bb</i> × <i>ab, ab</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,10
				7:1 <sup>c</sup>	3,31
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,10
				7:1 <sup>c</sup>	3,31
'Piglos' [b] × 'Pilot' [ab]	6	9	<i>bb, bb</i> × <i>ab, bb</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	0,60
			<i>bb, bb</i> × <i>ab, ab</i>	1:1 <sup>b</sup>	0,60
				3:1 <sup>c</sup>	9,80 **
'Pikant' [b] × 'Remo' [ab]	12	3	<i>bb, bb</i> × <i>ab, bb</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	5,40 *
			<i>bb, bb</i> × <i>ab, ab</i>	1:1 <sup>b</sup>	5,40 *
				3:1 <sup>c</sup>	0,20
'Pinova' [b] × 'Piglos' [b]	–	15	<i>bb, bb</i> × <i>bb, bb</i>	–	–

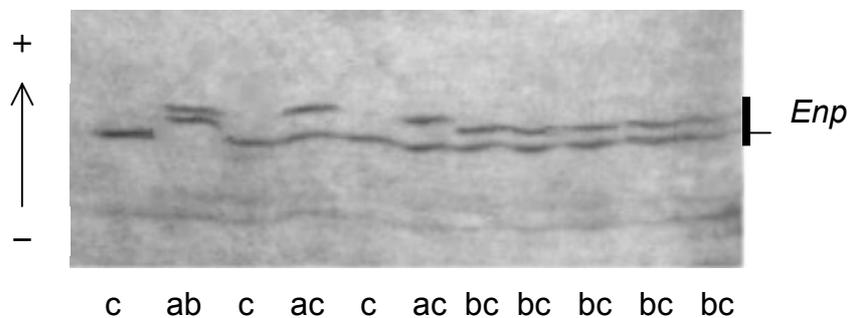
Tab. 2.4: Fortsetzung.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft		Genotypen der Eltern <sup>a</sup>	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[ab]	[b]			
'Releika' [ab] × 'Dülmener Rosenapfel' [ab]	8	7	<i>ab, bb</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	3,76
			<i>ab, bb</i> × <i>ab, ab</i>	1:3 <sup>c</sup>	6,42 *
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	3,76
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, ab</i>	7:1 <sup>c</sup>	16,01 ***
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	3,76
'Releika' [ab] × 'Rewena' [ab]	15	–	<i>ab, bb</i> × <i>aa, bb</i>	– <sup>b,c</sup>	–
			<i>ab, bb</i> × <i>aa, ab</i>	– <sup>b,c</sup>	–
			<i>ab, ab</i> × <i>aa, bb</i>	– <sup>b,c</sup>	–
'Remo' [ab] × 'Piros' [b]	8	6	<i>ab, bb</i> × <i>bb, bb</i>	1:1 <sup>b,c</sup>	0,29
			<i>ab, ab</i> × <i>bb, bb</i>	1:1 <sup>b</sup>	0,29
			<i>ab, ab</i> × <i>bb, bb</i>	3:1 <sup>c</sup>	2,38

- <sup>a</sup> Gen 1, Gen 2 × Gen 1, Gen 2  
<sup>b</sup> beide Gene gekoppelt  
<sup>c</sup> beide Gene frei spaltend  
\* signifikant bei  $p \leq 0,05$   
\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$   
\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

### Endopeptidase (ENP)

In den Zymogrammen zeigte sich nur eine Färbezone mit drei Bandenpositionen, welche den Allelen *a*, *b* und *c* eines spaltenden Locus *Enp* entsprechen (Abb. 2.3). In Kombination der Allele konnten insgesamt fünf Phänotypenklassen beobachtet werden (Abb. 2.2). Anhand der in der Nachkommenschaft von 'Alkmene' × Pi-A-43,31 erhaltenen Phänotypen und der vergleichsweise schwachen Intensität der a-Bande bei Pi-A-43,31 ist das Vorhandensein eines zusätzlichen Nullallels *n* an diesem Locus wahrscheinlich. Die in Tab. 2.5 dargestellten Spaltungsdaten sind mit einer monogen disomen Vererbung vereinbar. Die geringfügige signifikante Abweichung vom erwarteten Spaltungsergebnis in einer von sieben Spaltungen ('Alkmene' × Pi-A-43,31) kann für die Interpretation der Vererbung vernachlässigt werden.



**Abb. 2.3:** Aufspaltung am Locus *Enp* mit den Phänotypen [ab], [ac], [bc] und [c].

### Esterase (EST)

Da Esterasen substratspezifisch reagieren können, wurden zwei verschiedene Färbungen durchgeführt, in denen entweder  $\alpha$ -Naphthylacetat oder  $\beta$ -Naphthylacetat getestet wurde. Beide Färbungen zeigten ähnliche, sehr komplexe Zymogramme, deren Banden über das gesamte Gel hinweg exprimiert wurden. Unterschiede zwischen den Zymogrammen beider Esterasen bestanden nur in der Intensität und Schärfe der Banden. Der anodischen Gelseite konnten vier Aktivitätszonen zugeordnet werden, deren Banden unterschiedliche Aktivitäten aufwiesen. Unterschiede im Bandenmuster waren nur in schwach gefärbten Bereichen erkennbar, die sich aber nicht durch genetische Aufspaltungen erklären ließen. Im kathodischen pH-Bereich 9,0-11,0 prägten die EST-Typen zwei möglicherweise genetisch spaltende Zonen mit diffusen Banden auf sehr schnell anfärbendem Hintergrund aus. Eine mehrfache Modifikation der Gelzusammensetzung und der Färbemethodik bewirkte jedoch keine optische Verbesserung der Zymogramme. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurde auf eine genetische Analyse verzichtet.

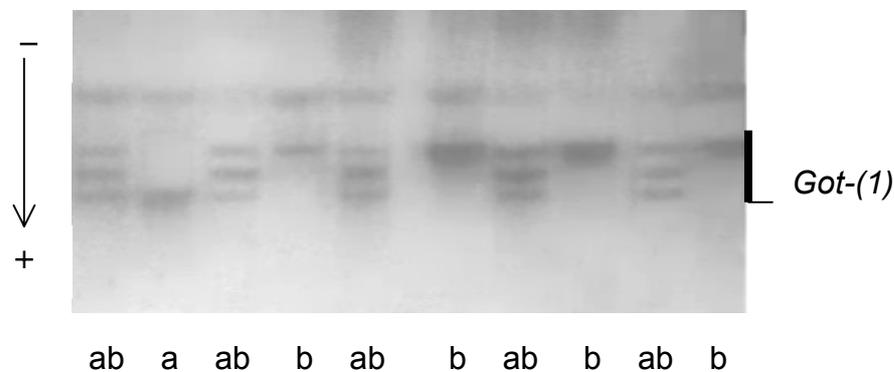
**Tab. 2.5:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Enp*.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft					Genotypen der Eltern	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[a]	[ab]	[ac]	[bc]	[c]			
'Alkmene' [c] × Pi-A-43,31 [a]	–	–	1	–	9	<i>cc</i> × <i>an</i>	1:1	6,40 *
'Antonowka' [ac] × 'Alkmene' [c]	–	–	7	–	7	<i>ac</i> × <i>cc</i>	1:1	0
'Piglos' [ac] × 'Pilot' [ac]	4	–	8	–	3	<i>ac</i> × <i>ac</i>	1:2:1	0,27
'Pikant' [c] × 'Remo' [c]	–	–	–	–	15	<i>cc</i> × <i>cc</i>	–	–
'Pinova' [a] × 'Piglos' [ac]	4	–	11	–	–	<i>aa</i> × <i>ac</i>	1:1	3,27
'Releika' [ab] × 'Dülmener Rosenapfel' [ac]	2	5	4	4	–	<i>ab</i> × <i>ac</i>	1:1:1:1	1,77
'Releika' [ab] × 'Rewena' [c]	–	–	4	11	–	<i>ab</i> × <i>cc</i>	1:1	3,27
'Remo' [c] × 'Piros' [ac]	–	–	8	–	6	<i>cc</i> × <i>ac</i>	1:1	0,29

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

### Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Die im Gegensatz zu den anderen Enzymen mittels PAGE aufgetrennte GOT zeigte drei Zonen. Die Zone mit der größten Mobilität, GOT-1, wies Variationen auf, welche einer genetischen Analyse unterzogen und dem Locus *Got-(1)* zugeordnet werden konnten. Insgesamt wurden drei verschiedene Phänotypen ausgeprägt (Abb. 2.2 und 2.4). Während die beiden einbandigen Muster den Allelen *a* bzw. *b* in homozygotem Zustand entsprachen, verdeutlichten drei Banden den dimeren Charakter des Isoenzym mit einer zusätzlichen mittleren Hybridbande im heterozygoten Zustand. Die in Tab. 2.6 aufgeführten Spaltungsdaten verweisen auf eine monogen disome Vererbung.



**Abb. 2.4:** Aufspaltungen am Locus *Got-(1)* mit den Phänotypen [a], [ab] und [b].

### Isocitrat-Dehydrogenase (IDH)

Alle Elterngenotypen sowie die  $F_1$ -Familien waren durch ein einheitliches zwölfbandiges Muster gekennzeichnet, das bei monogener Vererbung durch das Vorhandensein gleicher homozygoter Allele, oder – im Fall von digener Vererbung – durch eine entsprechende Allelkombination, welche phänotypisch zu "fixierter Heterozygotie" führt, hervorgerufen worden sein könnte.

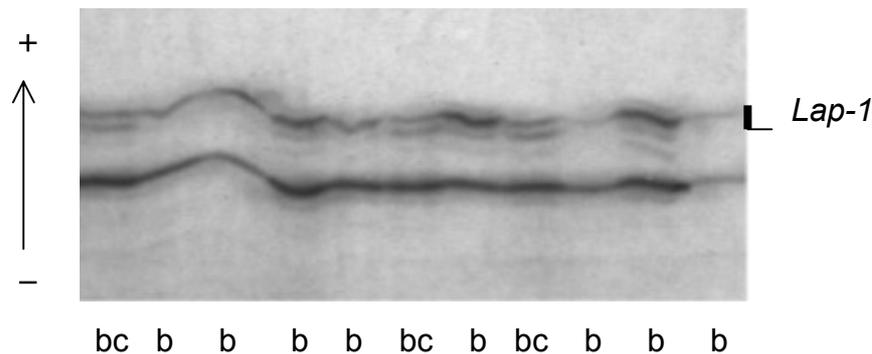
### Leucin-Aminopeptidase (LAP)

Die Zymogramme der LAP zeigten fünf Aktivitätszonen. Im pH-Bereich 4,5-4,9 befanden sich eng aneinanderliegend die Zonen 1 und 2. Die übrigen Zonen konnten nur sporadisch und mit sehr unterschiedlichen Intensitäten im pH-Bereich 5,0-6,0 beobachtet werden.

**Tab. 2.6:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Got-(1)*.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft			Genotypen der Eltern	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[a]	[ab]	[b]			
'Alkmene' [b] × Pi-A-43,31 [b]	–	–	10	<i>bb</i> × <i>bb</i>	–	–
'Antonowka' [ab] × 'Alkmene' [b]	–	10	5	<i>ab</i> × <i>bb</i>	1:1	1,67
'Piglos' [ab] × 'Pilot' [b]	–	4	11	<i>ab</i> × <i>bb</i>	1:1	3,27
'Pikant' [ab] × 'Remo' [ab]	5	9	1	<i>ab</i> × <i>ab</i>	1:2:1	2,73
'Pinova' [b] × 'Piglos' [ab]	–	5	9	<i>bb</i> × <i>ab</i>	1:1	1,14
'Releika' [b] × 'Dülmener Rosenapfel' [b]	–	–	15	<i>bb</i> × <i>bb</i>	–	–
'Releika' [b] × 'Rewena' [ab]	–	8	7	<i>bb</i> × <i>ab</i>	1:1	0,07
'Remo' [ab] × 'Piros' [ab]	5	6	3	<i>ab</i> × <i>ab</i>	1:2.:1	0,86

Für eine genetische Analyse war nur die Zone 1 geeignet (Abb. 2.5). Sie wies zwei Hauptbandenpositionen auf, von denen nach Vergleich der eigenen Zymogramme mit den Ergebnissen der Untersuchungen von MANGANARIS und ALSTON (1992a) angenommen wurde, dass sie den von den genannten Autoren beobachteten Allelen *b* und *c* entsprechen. Aufgrund sekundärer Banden an der Position der jeweils anderen Hauptbande, die jedoch nur bei hohen Enzymaktivitäten exprimiert wurden, war eine exakte Zuordnung nur unter Berücksichtigung der Intensitätsunterschiede zwischen beiden Bandenarten möglich.



**Abb. 2.5:** Aufspaltung am Locus *Lap-1* mit den Phänotypen [bc] und [c].

Die Allele bildeten drei verschiedene Phänotypen in den Nachkommenschaften aus (Abb. 2.2). Mit Ausnahme der Kreuzung 'Piglos' × 'Pilot' verweisen die in Tab. 2.7 ersichtlichen Spaltungsdaten auf eine monogen disome Vererbung. Der Genotyp 'Pilot' zeigte trotz mehrmaliger Auftrennung keine Aktivität am Locus *Lap-1*. Auch unter Zugrundelegung von Nullallelen bei 'Pilot' ist das Spaltungsergebnis in 'Piglos' × 'Pilot' nicht erklärbar.

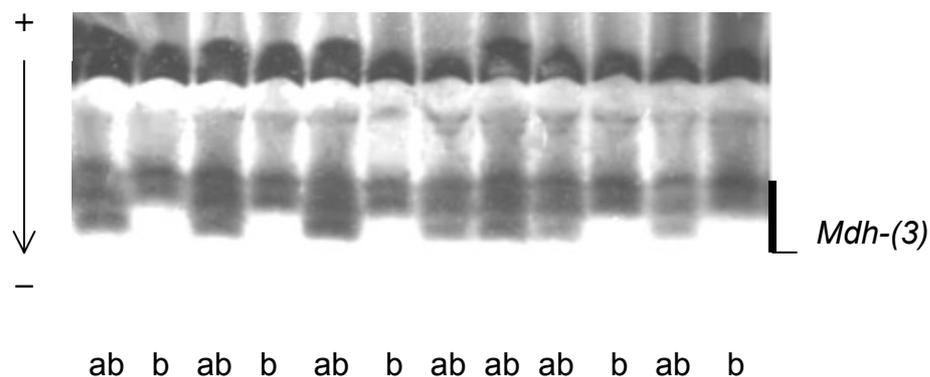
### Malat-Dehydrogenase (MDH)

Die Banden der MDH konnten drei Aktivitätszonen zugeordnet werden. Die im pH-Bereich 5,0-5,7 gelegene Zone 1 zeigte sechs bis acht sehr eng aneinanderliegende Banden unterschiedlicher Intensität und Schärfe, welche auf Grund dieser Eigenschaften sehr schwer zuzuordnen waren und deshalb keiner Spaltungsanalyse unterzogen wurden. MDH-2 war bei allen Genotypen durch eine einheitliche Doppelbande gekennzeichnet. Lediglich die nahe der Kathode (pH 8,8-9,2) gelegene dritte Zone wies sehr gut auswertbare Variationen auf, wobei zwei Phänotypen mit jeweils zwei bzw. drei Banden beobachtet wurden (Abb. 2.2 und 2.6).

**Tab. 2.7:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Lap-1*.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft			Genotypen der Eltern	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[b]	[bc]	[c]			
'Alkmene' [bc] × Pi-A-43,31 [bc]	–	8	2	<i>bc</i> × <i>bc</i>	1:2:1	3,20
'Antonowka' [b] × 'Alkmene' [bc]	10	4	–	<i>bb</i> × <i>bc</i>	1:1	2,57
'Piglos' [b] × 'Pilot' [?]	5	–	10	<i>bb</i> × ?	?	–
'Pikant' [b] × 'Remo' [b]	14	–	–	<i>bb</i> × <i>bb</i>	–	–
'Pinova' [bc] × 'Piglos' [b]	10	4	–	<i>bc</i> × <i>bb</i>	1:1	2,57
'Releika' [b] × 'Dülmener Rosenapfel' [bc]	8	7	–	<i>bb</i> × <i>bc</i>	1:1	0,07
'Releika' [b] × 'Rewena' [b]	15	–	–	<i>bb</i> × <i>bb</i>	–	–
'Remo' [b] × 'Piros' [b]	14	–	–	<i>bb</i> × <i>bb</i>	–	–

Dabei entspricht das zweibandige Muster dem Allel *b*, während der dreibandige Phänotyp als heterozygot durch die Allele *a* und *b* interpretiert werden kann. Da auch innerhalb der Nachkommenschaften, in denen beide Eltern Heterozygotie aufwiesen, nur diese beiden beschriebenen Phänotypen aufgetreten waren, ist eine monogene Vererbungsweise, bei der auch [a]-Phänotypen entstehen müssten, auszuschließen. Die in Tab. 2.8 ersichtlichen Spaltungsdaten sind dagegen durch das Vorhandensein zweier Gene erklärbar, wobei verschiedene elterliche Genotypen für die in den Nachkommenschaften beobachteten Phänotypen kombiniert werden konnten. Bei der Analyse der Spaltungen wurde dabei wiederum zwischen der gekoppelten und der frei spaltenden Variante unterschieden. Aufgrund des signifikanten  $\chi^2$ -Wertes in der Kreuzung 'Releika'  $\times$  'Rewena', der ausschließlich bei der Prüfung der frei spaltenden Genotypenkombinationen auftrat, kann Kopplung beider Gene angenommen werden. In Abhängigkeit von der Kombination bekräftigen die in den übrigen spaltenden Nachkommenschaften erzielten Ergebnisse diese Hypothese bzw. stehen ihr nicht entgegen.



**Abb. 2.6:** Aufspaltung am duplizierten Locus *Mdh-(3)* mit den Phänotypen [*ab*] und [*b*].

### Malisches Enzym (ME)

Alle  $F_1$ -Familien einschließlich der Eltern zeigten das gleiche 13-bandige Zymogramm. Als mögliche Ursachen für die fehlende Variabilität können wiederum Homozygotie oder "fixierte Heterozygotie" in allen Kreuzungsnachkommenschaften genannt werden.

**Tab. 2.8:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Mdh-(3)*.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft		Genotypen der Eltern <sup>a</sup>	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[ab]	[b]			
'Alkmene' [b] × Pi-A-43,31 [b]	–	10	<i>bb, bb × bb, bb</i>	–	–
'Antonowka' [b] × 'Alkmene' [b]	–	14	<i>bb, bb × bb, bb</i>	–	–
'Piglos' [b] × 'Pilot' [b]	–	15	<i>bb, bb × bb, bb</i>	–	–
'Pikant' [b] × 'Remo' [ab]	7	8	<i>bb, bb × ab, bb</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	0,07
			<i>bb, bb × ab, ab</i>	1:1 <sup>b</sup>	0,07
				3:1 <sup>c</sup>	6,42 *
'Pinova' [ab] × 'Piglos' [b]	10	5	<i>ab, bb × bb, bb</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	1,67
			<i>ab, ab × bb, bb</i>	1:1 <sup>b</sup>	1,67
				3:1 <sup>c</sup>	0,56
'Releika' [ab] × 'Dülmener Rosenapfel' [ab]	12	3	<i>ab, bb × ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,20
				1:3 <sup>c</sup>	24,20 ***
			<i>ab, bb × ab, ab</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,20
				7:1 <sup>c</sup>	0,77
			<i>ab, ab × ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,20
			7:1 <sup>c</sup>	0,77	

Tab. 2.8: Fortsetzung.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft		Genotypen der Eltern <sup>a</sup>	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[ab]	[b]			
'Releika' [ab] × 'Rewena' [ab]	10	5	<i>ab, bb</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,55
			<i>ab, bb</i> × <i>ab, ab</i>	1:3 <sup>c</sup>	13,89 ***
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,55
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, ab</i>	7:1 <sup>c</sup>	5,28 *
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	0,55
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, ab</i>	7:1 <sup>c</sup>	5,28 *
'Remo' [ab] × 'Piros' [ab]	13	1	<i>ab, bb</i> × <i>ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	2,39
			<i>ab, bb</i> × <i>ab, ab</i>	1:3 <sup>c</sup>	34,38 ***
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, ab</i>	3:1 <sup>b</sup>	2,39
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, bb</i>	7:1 <sup>c</sup>	0,37
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, ab</i>	3:1 <sup>b</sup>	2,39
			<i>ab, ab</i> × <i>ab, bb</i>	7:1 <sup>c</sup>	0,37

<sup>a</sup> Gen 1, Gen 2 × Gen 1, Gen 2

<sup>b</sup> beide Gene gekoppelt

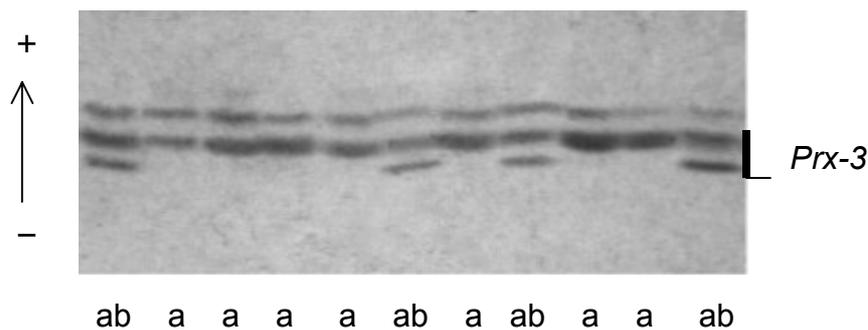
<sup>c</sup> beide Gene frei spaltend

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

### Peroxidase (PRX)

Peroxidaseaktivitäten waren sowohl auf der anodischen als auch auf der kathodischen Gelhälfte sichtbar. Die unmittelbar an die Anode angrenzenden Banden der Zone 1 (pH-Bereich 2,0-2,5) waren für eine fehlerlose Auswertung zu schwach ausgeprägt. Die nächstfolgenden zwischen den pH-Punkten 3,0 und 3,5 liegenden Banden konnten zwei verschiedenen Zonen zugeordnet werden. Zone 2 war bei allen Eltern und ihren Nachkommenschaften einheitlich durch eine Bande gekennzeichnet. Variationen im Bandenmuster traten dagegen innerhalb der dritten Zone auf, wobei drei verschiedene Phänotypen (Abb. 2.2 und 2.7) beobachtet werden konnten, die durch Spaltung der beiden monomeren Allele *a* und *b* unter Beteiligung eines Nullallels erklärbar sind. Bis auf die beobachtete signifikante Abweichung in der Nachkommenschaft von 'Alkmene' × Pi-A-43-31 entsprachen die Ergebnisse den erwarteten Spaltungsverhältnissen, die einen monogenen Erbgang verdeutlichen (Tab. 2.9).



**Abb 2.7:** Aufspaltung am Locus *Prx-3* mit den Phänotypen [a] und [ab].

Zwei weitere Zonen zeigten sich bei pH 4,0 und 5,5 mit je einer nur teilweise vorhandenen Bande unterschiedlicher Intensität sowie zwei bis mehreren sehr schwachen Banden, die jedoch ebenfalls nur gelegentlich sichtbar waren. Darüber hinaus traten auf der kathodischen Gelhälfte mehrere Banden auf, die nicht analysiert wurden, da sie bei einer Reihe von Kreuzungsnachkommen nur eine sehr geringe Intensität aufwiesen.

**Tab. 2.9:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Prx-3*.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft				Genotypen der Eltern	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[a]	[ab]	[b]	[n]			
'Alkmene' [a] × Pi-A-43,31 [ab]	10	–	–	–	<i>aa</i> × <i>ab</i>	1:1	10 **
'Antonowka' [ab] × 'Alkmene' [a]	9		5	–	<i>ab</i> × <i>aa</i>	1:1	1,14
'Piglos' [a] × 'Pilot' [a]	12	–	–	3	<i>an</i> × <i>an</i>	3:1	0,20
'Pikant' [ab] × 'Remo' [ab]	5	7	3	–	<i>ab</i> × <i>ab</i>	1:2:1	0,87
'Pinova' [a] × 'Piglos' [a]	15		–	–	<i>aa</i> × <i>an</i>	–	–
'Releika' [a] × 'Dülmener Rosenapfel' [a]	15	–	–	–	<i>aa</i> × <i>aa</i>	–	–
'Releika' [a] × 'Rewena' [ab]	6	9	–	–	<i>aa</i> × <i>ab</i>	1:1	0,60
'Remo' [ab] × 'Piros' [a]	4	10	–	–	<i>ab</i> × <i>aa</i>	1:1	2,57

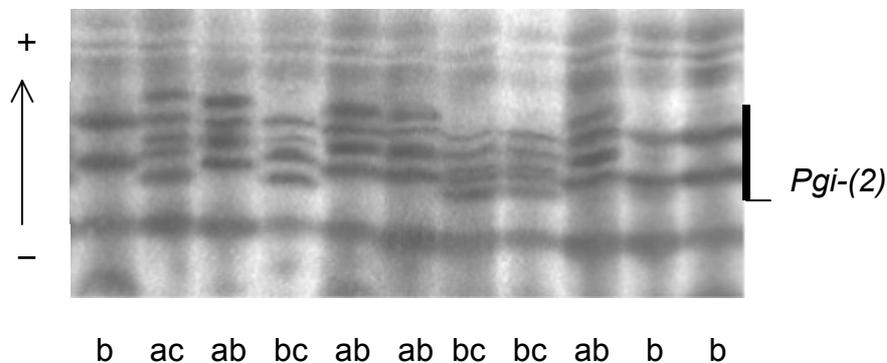
\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

### 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (PGD)

Alle Eltern und die Nachkommenschaften der Kreuzungen zeigten zwölf eng beieinander liegende intensive Banden im pH-Bereich 5,0-6,0. Wie im Fall der IDH könnten diese invariablen Zymogramme durch das Vorhandensein gleicher homozygoter Allele bei monogener Vererbung oder durch "fixierte Heterozygotie" bei digener Vererbung hervorgerufen worden sein. In Richtung Anode und Kathode angrenzende diffuse und schwache Banden wurden trotz möglicher Variabilität keiner Spaltungsanalyse unterzogen.

### Phosphogluco-Isomerase (PGI)

Die Aktivitäten der PGI erstreckten sich über einen pH-Bereich von 5,2-7,0 und konnten vier Farbzonen zugeordnet werden. Die der Anode am nächsten liegende Zone war bei allen Elterngenotypen und den Nachkommenschaften durch den gleichen dreibandigen Phänotyp gekennzeichnet. In der nächstfolgenden zweiten Zone zeigten sich insgesamt sechs Bandenpositionen, die paarweise gruppiert von den drei Allelen *a*, *b* und *c* kontrolliert wurden, wobei sich die zweite Bande von Allel *a* und die erste Bande von Allel *b* im Zymogramm überlagerten. Allein oder in Kombination ergaben die Allele fünf verschiedene Phänotypen (Abb. 2.2 und 2.8).



**Abb. 2.8:** Aufspaltung am Locus *Pgi*-(2) mit den Phänotypen [ab], [ac], [b] und [bc].

Da die Bande an Position 3 nie allein bzw. in einem zweibandigen (homozygoten) Muster, sondern stets in den heterozygoten Phänotypen auftrat, wurde auf eine dimere Struktur des Isoenzym mit Ausbildung eben dieser Hybridbande geschlossen.

Aufgrund der Lage der einzelnen zu den verschiedenen Allelen gehörenden Banden und der geringen Abstände zwischen den einzelnen Bandenpositionen ergaben sich keine unterschiedlich positionierten Hybridbanden, so dass Bande 3 gleichzeitig die Hybridbande für die Phänotypen [ab], [ac] und [bc] darstellte.

**Tab. 2.10:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Pgi*-(2).

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft					Genotypen der Eltern	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[ab]	[ac]	[b]	[bc]	[c]			
'Alkmene' [bc] × Pi-A-43,31 [bc]	–	–	–	4	6	<i>bc</i> × <i>bc</i>	1:2:1	7,60 *
'Antonowka' [ab] × 'Alkmene' [bc]	3	4	2	5	–	<i>ab</i> × <i>bc</i>	1:1:1:1	1,43
'Piglos' [b] × 'Pilot' [b]	–	–	15	–	–	<i>bb</i> × <i>bb</i>	–	–
'Pikant' [b] × 'Remo' [b]	–	–	15	–	–	<i>bb</i> × <i>bb</i>	–	–
'Pinova' [bc] × 'Piglos' [b]	–	–	7	8	–	<i>bc</i> × <i>bb</i>	1:1	0,07
'Releika' [bc] × 'Dülmener Rosenapfel' [bc]	–	–	9	1	5	<i>bc</i> × <i>bc</i>	1:2:1	14,92 ***
'Releika' [bc] × 'Rewena' [bc]	–	–	5	4	6	<i>bc</i> × <i>bc</i>	1:2:1	3,27
'Remo' [b] × 'Piros' [b]	–	–	14	–	–	<i>bb</i> × <i>bb</i>	–	–

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$ \*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$



**Tab. 2.11:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Acp-(1)*.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft		Genotypen der Eltern	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[a]	[n]			
'Alkmene' [n] × Pi-A-43,31 [a]	4	6	<i>nn</i> × <i>an</i>	1:1	0,40
'Antonowka' [a] × 'Alkmene' [n]	14	–	<i>aa</i> × <i>nn</i>	–	–
'Piglos' [a] × 'Pilot' [a]	9	6	<i>an</i> × <i>an</i>	3:1	1,80
'Pikant' [n] × 'Remo' [a]	10	5	<i>nn</i> × <i>an</i>	1:1	1,67
'Pinova' [n] × 'Piglos' [a]	8	7	<i>nn</i> × <i>an</i>	1:1	0,07
'Releika' [n] × 'Dülmener Rosenapfel' [a]	8	7	<i>nn</i> × <i>an</i>	1:1	0,07
'Releika' [n] × 'Rewena' [n]	–	15	<i>nn</i> × <i>nn</i>	–	–
'Remo' [a] × 'Piros' [a]	14	–	<i>an</i> × <i>aa</i>	–	–

**Tab. 2.12:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Acp*-(2).

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft				Genotypen der Eltern	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[a]	[ab]	[b]	[n]			
'Alkmene' [n] × Pi-A-43,31 [b]	–	–	10	–	<i>nn</i> × <i>bb</i>	–	–
'Antonowka' [a] × 'Alkmene' [n]	14	–	–	–	<i>aa</i> × <i>nn</i>	–	–
'Piglos' [a] × 'Pilot' [a]	12	–	–	3	<i>an</i> × <i>an</i>	3:1	0,07
'Pikant' [ab] × 'Remo' [a]	6	9	–	–	<i>ab</i> × <i>aa</i>	1:1	0,60
'Pinova' [ab] × 'Piglos' [a]	7	4	4	–	<i>ab</i> × <i>an</i>	2:1:1	0,07
'Releika' [a] × 'Dülmener Rosenapfel' [ab]	7	5	3	–	<i>an</i> × <i>ab</i>	2:1:1	0,60
'Releika' [a] × 'Rewena' [n]	5	–	–	10	<i>an</i> × <i>nn</i>	1:1	1,67
'Remo' [a] × 'Piros' [ab]	7	7	–	–	<i>aa</i> × <i>ab</i>	1:1	0

In diesem Bereich waren einige Variationen sichtbar, die jedoch nicht alle auf genetisch spaltende Allele zurückzuführen waren. Nur die der Anode am nächsten liegenden Banden schienen trotz geringerer Intensitäten für eine genetische Analyse geeignet. Die Variationen wurden auf das Vorhandensein zweier Loci *Acp-(1)* und *Acp-(2)*, die mit ihren beobachteten Phänotypen in den Abb. 2.2 und 2.9 dargestellt worden sind, zurückgeführt.

Am Locus *Acp-(1)*, der an pH 4,5 im Gel zu erkennen war, konnte mit unterschiedlicher, von der Kreuzungskombination abhängigen Frequenz eine einzelne Bande beobachtet werden. Unter der Voraussetzung der gleichzeitigen Existenz eines Nullallels *n* wurde angenommen, dass diese Bande dem Allel *a* entspricht. Die Spaltungsdaten in Tab. 2.11 entsprechen dieser Vermutung und verweisen auf einen monogenen disomen Erbgang.

Aus den Variationen an den nächstfolgenden zwei Bandenpositionen (pH 4,6-4,8) wurde auf den zweiten Locus *Acp-(2)* mit den beiden aktiven Allelen *a* und *b* sowie einem Nullallel *n* geschlossen. Die in Tab. 2.12 angegebenen Frequenzen der auftretenden drei phänotypischen Bandenmuster [a], [b] und [ab] verdeutlichen wiederum einem monogen disomen Erbgang.

### **Shikimat-Dehydrogenase (SKD)**

Auch für die SKD konnte keine Spaltungsanalyse durchgeführt werden. Alle Kreuzungsnachkommenschaften wiesen ein zehnbändiges Zymogramm ohne Unterschiede in den Bandenpositionen auf.

### **Superoxid-Dismutase (SOD)**

Die SOD-Zymogramme umfassten eine Zone mit einem invariablen fünfbandigen Muster sowie eine sich in Richtung Kathode anschließende zweite Zone, die durch eine oder zwei intensive Hauptbanden bei pH 5,3 bzw. 5,4 charakterisiert war. Beide Bandenpositionen wurden als die Allele *a* und *b* interpretiert und bildeten die beiden beobachteten Phänotypenklassen [ab] und [b], die in den Abb. 2.2 und 2.10 dargestellt sind. Allel *a* besaß drei der Anode zugewandte schwächere sekundäre Banden, die mit der ersten Zone überlappten. Die Ergebnisse der Spaltungsanalyse sind in Tab. 2.13 aufgeführt und deuten aufgrund der fehlenden Aufspaltung in der Nachkommenschaft von 'Releika' × 'Rewena' sowie der nicht vorhandenen [a]-Phänotypen in der Kreuzung 'Releika' × 'Dülmener Rosenapfel' auf einen digenen Vererbungsweg. Wie im Fall der spaltenden Isoenzyme *Dia* und *Mdh-(3)* konnten mehrere elterliche Genotypenkombinationen für die Ausprägung der Phänotypen in den Nachkommenschaften in Betracht gezogen werden.

**Tab. 2.13:** Spaltungsdaten und genetische Interpretation für *Sod*-(2).

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft		Genotypen der Eltern <sup>a</sup>	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[ab]	[b]			
'Alkmene' [b] × Pi-A-43,31 [b]	–	10	<i>bb, bb × bb, bb</i>	–	–
'Antonowka' [ab] × 'Alkmene' [b]	5	9	<i>ab, bb × bb, bb</i> <i>ab, ab × bb, bb</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	0,14
				1:1 <sup>b</sup>	0,14
				3:1 <sup>c</sup>	11,52 ***
'Piglos' [ab] × 'Pilot' [b]	6	9	<i>ab, bb × bb, bb</i> <i>ab, ab × bb, bb</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	0,60
				1:1 <sup>b</sup>	0,60
				3:1 <sup>c</sup>	9,80 **
'Pikant' [ab] × 'Remo' [b]	7	8	<i>ab, bb × bb, bb</i> <i>ab, ab × bb, bb</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	0,07
				1:1 <sup>b</sup>	0,07
				3:1 <sup>c</sup>	6,42 *
'Pinova' [b] × 'Piglos' [ab]	4	11	<i>bb, bb × ab, bb</i> <i>bb, bb × ab, ab</i>	1:1 <sup>b, c</sup>	3,27
				1:1 <sup>b</sup>	3,27
				3:1 <sup>c</sup>	18,69 ***
'Releika' [ab] × 'Dülmener Rosenapfel' [ab]	14	1	<i>ab, bb × ab, bb</i>  <i>ab, bb × ab, ab</i>  <i>ab, ab × ab, bb</i>	3:1 <sup>b</sup>	2,69
				1:3 <sup>c</sup>	37,36 ***
				3:1 <sup>b</sup>	2,69
				7:1 <sup>c</sup>	0,47
				3:1 <sup>b</sup>	2,69
			7:1 <sup>c</sup>	0,47	

**Tab. 2.13:** Fortsetzung.

Phänotypen der Eltern	Phänotypen in der Nachkommenschaft		Genotypen der Eltern	Erwartetes Verhältnis	$\chi^2$
	[ab]	[b]			
'Releika' [ab] × 'Rewena' [ab]	15	–	<i>ab, bb × aa, bb</i>	– <sup>b, c</sup>	–
			<i>ab, bb × aa, ab</i>	– <sup>b, c</sup>	–
			<i>ab, ab × aa, bb</i>	– <sup>b, c</sup>	–
'Remo' [b] × 'Piros' [b]	–	14	<i>bb, bb × bb, bb</i>	–	–

<sup>a</sup> Gen 1, Gen 2 × Gen 1, Gen 2

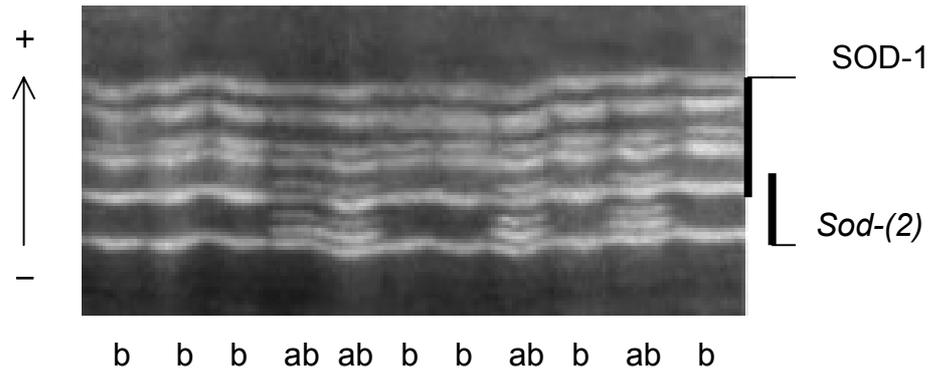
<sup>b</sup> beide Gene gekoppelt

<sup>c</sup> beide Gene frei spaltend

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$



**Abb. 2.10:** Aufspaltung am duplizierten Locus *Sod-(2)* mit den Phänotypen [ab] und [b].

Die Prüfung auf freie Spaltung beider Gene ergab in allen fünf spaltenden Nachkommenchaften signifikante Abweichungen von den erwarteten Verhältnissen. Damit ist auch bei diesem Isoenzym das Vorliegen einer Kopplung beider Gene sehr wahrscheinlich.

Die Prüfung auf Kopplung der Loci ergaben für alle paarweisen Vergleiche jeder Population LOD-Werte unter 3,0. Die Loci liegen somit ungekoppelt vor.

### 2.3.1.2 Gewebespezifische Expression und Stabilität der spaltenden Loci

Erwartungsgemäß wurden die Bandenmuster der spaltenden Loci aller Enzyme bei Verwendung der jungen Blätter von Freilandbäumen während des Knospenaustriebs mit der höchsten Intensität ausgeprägt. Ebenso intensive Bandenmuster konnten auch bei sich öffnenden Blattknospen vorgetriebener Reiser festgestellt werden, wobei hier jedoch bei *Acp-(1)* und *Acp-(2)* relativ hohe Intensitätsschwankungen zu verzeichnen waren, die die Auswertung oftmals erschwerten. Mit fortschreitender Vegetationsperiode nahm die Intensität der Banden in Abhängigkeit vom Enzym zwar mehr oder weniger stark ab, die genotypspezifischen Bandenmuster blieben jedoch erhalten. Mit Ausnahme der beiden ACP-Isoenzyme konnte bei Extraktion der jüngsten, sich noch im Wachstum befindlichen Blätter bis in den Spätsommer hinein deutliche und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Nach Triebabschluss hatten die Enzyme ihre Aktivität verloren, nur *Mdh-(3)* exprimierte noch gelegentlich die genotypspezifischen Banden.

Die Untersuchung von unterschiedlichem In-vitro-Material ergab, dass *Dia* und *Prx-3* als Marker für diese Gewebe ungeeignet sind. Während bei *Dia* das *a*-Allel nicht oder nur äußerst schwach ausgeprägt wurde, zeigte *Prx-3* an beiden Bandenpositionen keine Aktivitäten. Die genotypspezifischen Muster von *Acp-(1)* und *Acp-(2)* waren nur in sekundären Embryoiden

bzw. Keimblättern intensiv ausgeprägt. Alle anderen In-vitro-Gewebe zeigten für beide Loci überwiegend nur äußerst schwache, kaum auswertbare Banden.

Die spaltenden Zonen der Enzyme ENP, GOT, LAP, MDH, PGI und SOD erwiesen sich, mit gewissen Einschränkungen, als geeignet für die Untersuchung von In-vitro-Material. Die höchsten Intensitäten waren wiederum bei sekundären Embryoiden und Keimblättern sowie bei Adventivknospen zu beobachten. Frisch regenerierte Sprosse sowie In-vitro-Vermehrungssprosse zeigten, solange sie sich in gutem physiologischen Zustand befanden, gut sichtbare und stabile Banden in den spaltenden Zonen. Glasigkeit der Regenerate beeinflusste nur den Locus *Pgi-(2)* negativ, der in derartigen Geweben nur äußerst schwache oder gar keine Banden ausbildete. In einer Reihe von sekundären Embryoiden bzw. Keimblättern, Adventivknospen, unmittelbar regenerierten und in-vitro-vermehrten Sprossen, die optisch eine gute Vitalität aufwiesen, konnte in den Zymogrammen der Zone MDH-3 eine zusätzliche, zwischen den beiden Banden des *b*-Allels gelegene Bande beobachtet werden. Diese Bande zeigte stets eine etwas geringere Intensität als die Banden der beiden Allele und übte in keinem Fall einen Einfluss auf deren Ausprägung auf.

Die Qualität der Zymogramme innerhalb einer Subkultur nahm mit zunehmendem Alter der Sprosse ab. War die Analyse von vier Wochen alten Sprossen für die Mehrzahl der Isoenzyme gut möglich, so waren nach sechs Wochen kaum noch Aktivitäten vorhanden. Die Aktivität von *Sod-(2)* hing am deutlichsten vom Alter der Sprosse ab. Hier konnten zufriedenstellende Intensitäten nur während der unmittelbaren Sprossregeneration sowie nach zweiwöchiger Subkulturdauer, d. h. während intensivsten Wachstums beobachtet werden. Die Analyse einzelner Blätter erwies sich im Gegensatz zu der ganzen Sprosse als weniger günstig, da die genotypspezifischen Banden zwar vorhanden, aber oftmals deutlich schwächer bzw. besonders im Falle der Entnahme nach vier- und sechswöchiger Subkultur überhaupt nicht sichtbar waren.

Die Nährmedienzusammensetzung übte, ungeachtet der Art des In-vitro-Materials, keinen Einfluss auf die quantitative und qualitative Bandenexpression der spaltenden Loci der ENP, GOT, LAP, MDH, PGI und SOD aus. Ebenso bestanden keine Unterschiede zwischen frisch etablierten In-vitro-Sprossen und solchen, die sich seit mehr als einem Jahr in Kultur befanden.

Basierend auf den beschriebenen Beobachtungen ergaben sich für die Anwendung der Loci als potentielle Marker hinsichtlich des zu untersuchenden Pflanzenmaterials die in Tab. 2.14 zusammengefassten Einsatzmöglichkeiten.

**Tab. 2.14 :** Isoenzymloci und ihre gewebespezifischen Einsatzmöglichkeiten.

Locus	Pflanzenmaterial	Anmerkungen
<i>Enp</i> , <i>Got-(1)</i> , <i>Lap-1</i> , <i>Mdh-(3)</i> , <i>Pgi-(2)</i> , <i>Sod-(2)</i>	alle In-vitro-Entwicklungsstadien während der Antheren- und Mikrosporenkultur einschließlich der In-vitro-Vermehrung  regenerierende und sich vermehrende In-vitro-Sprosse während und nach der Kultur unreifer Embryonen bzw. Kotyledonen im Anschluss an die In-situ-Parthenogenese  junges Blattmaterial während der Überführungsphase sowie aus Gewächshaus und Freiland	<i>Sod-(2)</i> nur während höchster Wachstumsintensität des In-vitro-Materials  <i>Pgi-(2)</i> nicht bei Glasigkeit des In-vitro-Materials
<i>Dia</i> , <i>Prx-3</i>	junges Blattmaterial aus Gewächshaus und Freiland	
<i>Acp-(1)</i> , <i>Acp-(2)</i>	unmittelbar austreibende Knospen aus dem Freiland	mehrere Proben pro Pflanze untersuchen

### 2.3.1.3 Donorspezifische Marker

Anhand der Ergebnisse der Spaltungsanalysen und der Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression und Stabilität der Loci wurden für die einzelnen Donorgenotypen die spezifischen Marker ermittelt, die in Tab. 2.15 mit ihren phänotypischen und genotypischen Erscheinungsbildern im Donor und den sich daraus ergebenden möglichen Phänotypen im Regenerat zusammenfassend dargestellt sind. Aufgrund der Heterozygotie des betreffenden Isoenzymstandorten standen pro Donor ein bis sechs Marker für den Homozygotietest zur Verfügung. Infolge der gewebespezifischen Expression und der Stabilität ergaben sich jedoch für *Acp-(1)*, *Acp-(2)*, *Dia*, *Pgi-(2)*, *Prx-3* sowie *Sod-(2)* Einschränkungen in der Anwendung.

Tab. 2.15 : Donorspezifische Marker für den Homozygotienachweis.

Donor	Locus	Vererbung	Allelzustand des Donors		Phänotyp des Regenerats	
			Phänotyp	Genotyp	homozygoter Zustand	heterozygoter Zustand
Alkmene	<i>Dia</i> <sup>a</sup>	digen	[ab]	<i>ab, ab</i> <i>ab, bb</i>	[a] oder [b] [ab] oder [b]	[ab] [ab]
	<i>Lap-1</i>	monogen	[bc]	<i>bc</i>	[b] oder [c]	[bc]
	<i>Pgi-(2)</i> <sup>b</sup>	monogen	[bc]	<i>bc</i>	[b] oder [c]	[bc]
	<hr/>					
Alkmene × Delbard	<i>Enp</i>	monogen	[ac]	<i>ac</i>	[a] oder [c]	[ac]
<hr/>						
Piglos	<i>Acp-(1)</i> <sup>c</sup>	monogen	[a]	<i>an</i>	[a] oder [n]	[a]
	<i>Acp-(2)</i> <sup>c</sup>	monogen	[a]	<i>an</i>	[a] oder [n]	[a]
	<i>Enp</i>	monogen	[ac]	<i>ac</i>	[a] oder [c]	[ac]
	<i>Got-(1)</i>	monogen	[ab]	<i>ab</i>	[a] oder [b]	[ab]
	<i>Sod-(2)</i> <sup>d</sup>	digen	[ab]		<i>ab, ab</i>	[a] oder [b]
<i>ab, bb</i>					[ab] oder [b]	[ab]
<hr/>						
Releika	<i>Acp-(2)</i> <sup>c</sup>	monogen	[a]	<i>an</i>	[a] oder [n]	[a]
	<i>Dia</i> <sup>a</sup>	digen	[ab]	<i>ab, ab</i>	[a] oder [b]	[ab]
				<i>ab, bb</i>	[ab] oder [b]	[ab]
	<i>Enp</i>	monogen	[bc]	<i>bc</i>	[b] oder [c]	[bc]
	<i>Mdh-(3)</i>	digen	[ab]	<i>ab, ab</i>	[a] oder [b]	[ab]
				<i>ab, bb</i>	[ab] oder [b]	[ab]
<i>Pgi-(2)</i> <sup>b</sup>	monogen	[bc]	<i>bc</i>	[b] oder [c]	[bc]	
<i>Sod-(2)</i> <sup>d</sup>	digen	[ab]		<i>ab, ab</i>	[a] oder [b]	[ab]
				<i>ab, bb</i>	[ab] oder [b]	[ab]

Tab. 2.15 : Fortsetzung.

Donor	Locus	Vererbung	Allelzustand des Donors		Phänotyp des Regenerats	
			Phänotyp	Genotyp	homozygoter Zustand	heterozygoter Zustand
Remo	<i>Acp-(1)<sup>c</sup></i>	monogen	[a]	<i>an</i>	[a] oder [n]	[a]
	<i>Dia<sup>a</sup></i>	digen	[ab]	<i>ab, ab</i> <i>ab, bb</i>	[a] oder [b] [ab] oder [b]	[ab] [ab]
	<i>Got-(1)</i>	monogen	[ab]	<i>ab</i>	[a] oder [b]	[ab]
	<i>Mdh-(3)</i>	digen	[ab]	<i>ab, ab</i> <i>ab, bb</i>	[a] oder [b] [ab] oder [b]	[ab] [ab]
	<i>Prx-3<sup>d</sup></i>	monogen	[ab]	<i>ab</i>	[a] oder [b]	[ab]
Remura	<i>Lap-1</i>	monogen	[bc]	<i>bc</i>	[b] oder [c]	[bc]
Rene	<i>Got-(1)</i>	monogen	[ab]	<i>ab</i>	[a] oder [b]	[ab]
	<i>Mdh-(3)</i>	digen	[ab]	unbekannt	[a], [ab] oder [b]	[ab]
Pi-A-5,164	<i>Enp</i>	monogen	[ac]	<i>ac</i>	[a] oder [c]	[ac]
	<i>Mdh-(3)</i>	digen	[ab]	unbekannt	[a], [ab] oder [b]	[ab]
Pi-A-15,38	<i>Enp</i>	monogen	[ac]	<i>ac</i>	[a] oder [c]	[ac]
Pi-A-16,97	<i>Enp</i>	monogen	[ac]	<i>ac</i>	[a] oder [c]	[ac]
Pi-A-24,45	<i>Enp</i>	monogen	[ac]	<i>ac</i>	[a] oder [c]	[ac]
	<i>Lap-1</i>	monogen	[bc]	<i>bc</i>	[b] oder [c]	[bc]
	<i>Mdh-(3)</i>	digen	[ab]	unbekannt	[a], [ab] oder [b]	[ab]

<sup>a</sup> nur junge Blätter aus Gewächshaus und Freiland

<sup>b</sup> nicht bei Glasigkeit von In-vitro-Geweben

<sup>c</sup> unmittelbar austreibende Knospen aus dem Freiland in mehreren Wiederholungen

<sup>d</sup> wenn In-vitro-Material, dann nur während intensiven Wachstums

### 2.3.2 Homozygotietest

#### Regenerate aus der Antherenkultur

Die Ergebnisse der im Homozygotietest geprüften 2418 Regenerate, die von 136 Linien abstammten, sind detailliert in Tab. 2.16 aufgeführt.

**Tab. 2.16:** Anzahl homozygoter und nicht charakterisierbarer Antherenkulturregenerate in Abhängigkeit von Donor und Marker.

Donor	Marker	Anzahl der Regenerate		
		insgesamt untersucht	homozygot	nicht charakterisierbar
Alkmene	<i>Lap-1</i>	1000	1000	0
Alkmene × Delbard	<i>Enp</i>	15	15	0
Releika	<i>Enp</i>	29	29	0
Remo	<i>Mdh-(3)</i>	225	163	62
	<i>Got-(1)</i>	15	15	0
Remura	<i>Lap-1</i>	109	109	0
Rene	<i>Mdh-(3)</i>	504	257	247
	<i>Got-(1)</i>	134	134	0
Pi-A-5,164	<i>Enp</i>	407	407	0
	<i>Mdh-(3)</i>	405	230	175
Pi-A-15,38	<i>Enp</i>	22	22	0
Pi-A-16,97	<i>Enp</i>	14	14	0
Pi-A-24,45	<i>Enp</i>	78	78	0
	<i>Lap-1</i>	69	69	0
	<i>Mdh-(3)</i>	77	41	36

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, die bei den Doppel- bzw. Dreifachcharakterisierungen einer Reihe von Regeneraten der Donoren 'Remo', 'Rene', Pi-A-5,164 und Pi-A-24,45 erzielt worden sind, erwiesen sich insgesamt 89,8 % der Regenerate als homozygot; 10,2 % konnten nicht eindeutig charakterisiert werden. Die nicht charakterisierbaren Regenerate, die das phänotypisch heterozygote Bandenmuster [ab] für *Mdh-(3)* zeigten, stammten von 18 Linien der Donoren 'Remo' und 'Rene' ab. Die nachfolgende Untersuchung einzelner Regenerate von sieben dieser Linien ergaben Homozygotie für *Got-(1)*. Somit konnten insgesamt 125 der 136 Linien (91,9 %) als homozygot klassifiziert werden. Sieben der elf verbleibenden Linien wiesen jedoch nicht nur die den Phänotyp *Mdh-(3)*-[ab]

tragenden, nicht zuzuordnenden Regenerate auf, sondern auch homozygote, die durch *Mdh-(3)*-[b] gekennzeichnet waren.

### Regenerate aus der Mikrosporenkultur

Aufgrund der für die einzelnen Regenerate erhaltenen Ergebnisse, die in Tab. 2.17 aufgeführt sind, erwiesen sich alle drei Linien als homozygot. Bezogen auf die insgesamt 165 Regenerate waren 113 homozygot (68,5 %). Die restlichen 52 Regenerate (31,5 %) konnten nicht eindeutig charakterisiert werden, da sie nur mittels des digenen Markers *Mdh-(3)* getestet worden sind.

**Tab. 2.17:** Ergebnisse des Homozygotietests an Regeneraten aus der Mikrosporenkultur in Abhängigkeit vom verwendeten Marker.

Linie	Pflanzenmaterial	Marker	Ergebnis
2/97	52 In-vitro-Vermehrungssprosse	<i>Mdh-(3)</i>	nicht charakterisierbar
	53 In-vitro-Vermehrungssprosse	<i>Got-(1)</i> <i>Mdh-(3)</i>	homozygot nicht charakterisierbar
	1 Freilandpflanze	<i>Got-(1)</i> <i>Mdh-(3)</i>	homozygot nicht charakterisierbar
128/1/II/98	32 In-vitro-Vermehrungssprosse	<i>Got-(1)</i> <i>Mdh-(3)</i>	homozygot 3 Sprosse homozygot, 29 Sprosse nicht charakterisierbar
113/1/98	27 In-vitro-Vermehrungssprosse	<i>Got-(1)</i> <i>Mdh-(3)</i>	homozygot homozygot

### Regenerate aus der In-situ-Parthenogenese

In Ergebnis der Isoenzymanalysen zur Charakterisierung der Regenerate aus der In-situ-Parthenogenese wurden sechs von 21 getesteten Linien als homozygot eingestuft (A1/1, A18/3, A20/2, P3/4, P13/1, R6/1; vgl. Tab. 2.18). Sie zeigten an den jeweiligen monogenen Markern *Enp*, *Got-(1)*, *Lap-1* und *Pgi-(2)* homozygote Phänotypen. Der Einsatz von *Dia*, *Mdh-(3)* und *Sod-(2)* ergab aufgrund der digenen Vererbungsweise sowohl homozygote als auch heterozygote Bandenmuster. Während der homozygote Phänotyp [b] die mittels der oben genannten monogenen Marker erzielten Ergebnisse ergänzte, durfte der heterozygote Phänotyp [ab] nicht für die Charakterisierung verwendet werden.

**Tab 2.18:** Isoenzymanalysen bei Regeneraten aus der In-situ-Parthenogenese.

Linie	Phänotyp am Markerlocus			Hinweis auf fehlerhafte Bestäubung	Aussage des Tests
	Hinweis auf Homozygotie	Hinweis auf Heterozygotie	Ergebnis nicht interpretierbar		
A1/1	<i>Lap-1</i> -[b], <i>Pgi</i> -(2)- [b]		<i>Dia</i> -[ab]		<b>homozygot</b>
A3/1		<i>Lap-1</i> -[bc]		<i>Acp</i> -(2)-[b], <i>Prx</i> -3-[ab]	heterozygot
A4/2		<i>Lap-1</i> -[bc]			heterozygot
A9/2		<i>Lap-1</i> -[bc]			heterozygot
A12/4		<i>Lap-1</i> -[bc]			heterozygot
A14/4		<i>Lap-1</i> -[bc]			heterozygot
A18/3	<i>Lap-1</i> -[c], <i>Dia</i> -[b]				<b>homozygot</b>
A20/2	<i>Lap-1</i> -[b], <i>Dia</i> -[b], <i>Pgi</i> -(2)-[b]				<b>homozygot</b>
A21/1		<i>Lap-1</i> -[bc]			heterozygot
A26/2		<i>Lap-1</i> -[bc]			heterozygot
A34/1		<i>Lap-1</i> -[bc]			heterozygot
P3/4	<i>Enp</i> -[c], <i>Got</i> -(1)-[a]		<i>Acp</i> -(1)-[a], <i>Acp</i> -(2)-[a], <i>Sod</i> -(2)-[ab]		<b>homozygot</b>
P5/1	<i>Enp</i> -[c]	<i>Got</i> -(1)-[ab]	<i>Sod</i> -(2)-[ab]	<i>Pgi</i> -(2)-[bc]	heterozygot
P5/4/I	<i>Enp</i> -[c], <i>Sod</i> -(2)-[b]	<i>Got</i> -(1)-[ab]	<i>Sod</i> -(2)- [ab]		heterozygot

Tab 2.18: Fortsetzung.

Linie	Phänotyp am Markerlocus			Hinweis auf fehlerhafte Bestäubung	Aussage des Tests
	Hinweis auf Homozygotie	Hinweis auf Heterozygotie	Ergebnis nicht interpretierbar		
P5/4/II		<i>Enp</i> -[ac], <i>Got</i> -(1)-[ab]			heterozygot
P7/1	<i>Enp</i> -[a], <i>Got</i> -(1)-[a]		<i>Sod</i> -(2)-[ab]	<i>Mdh</i> -(3)-[ab]	heterozygot
P12/1	<i>Enp</i> -[a]		<i>Acp</i> -(1)-[a], <i>Acp</i> -(2)-[a]	<i>Mdh</i> -(3)-[ab]	heterozygot
P13/1	<i>Enp</i> -[c], <i>Got</i> -(1)-[b], <i>Sod</i> -(2)-[b]				<b>homozygot</b>
P15/1	<i>Enp</i> -[c]	<i>Got</i> -(1)-[ab]	<i>Sod</i> -(2)-[ab]	<i>Dia</i> -[ab]	heterozygot
R6/1	<i>Acp</i> -(1)-[n], <i>Got</i> -(1)-[b], <i>Mdh</i> -(3)-[b]		<i>Dia</i> -[ab]		<b>homozygot</b>
R7/1			<i>Mdh</i> -(3)-[ab]	<i>Acp</i> -(2)-[ab]	heterozygot

Ähnlich wie die digenen Marker ergaben auch die beiden durch ein Nullallel gekennzeichneten Loci *Acp-(1)* und *Acp-(2)* homozygote [n]- sowie nicht interpretierbare [a]-Phänotypen. Alle sechs Linien zeigten bei der Untersuchung weiterer, im Donor homozygot vorliegender Loci kein zusätzliches unerwartetes Allel, so dass eine versehentliche Bestäubung und Befruchtung mit Fremdpollen ausgeschlossen wurde.

Die Testung homozygoter Loci gab jedoch für sechs weitere Linien (A3/1, P5/1, P7/1, P12/1, P15/1 und R7/1) trotz teilweiser Homozygotie der donorspezifischen Marker den Hinweis auf Entstehung durch Befruchtung mit Fremdpollen. Für den Bestäuber *Malus pumila* var. *Niedzwetskyana* waren die Phänotypen *Acp-(1)*-[a], *Acp-(2)*-[b], *Enp*-[c], *Got-(1)*-[b], *Lap-1*-[b], *Mdh-(3)*-[ab], *Prx-3*-[a] und *Sod-(2)*-[b] ermittelt worden. Damit wurde zumindest für A3/1 die Befruchtung durch den Bestäuber ausgeschlossen, da der in den Regeneraten für *Prx-3* gefundene Phänotyp [ab] nicht der Kreuzung 'Alkmene' × *M. pumila* var. *Niedzwetskyana* entstammen kann. Für die Linien P7/1, P12/1, P15/1 und R7/1 hingegen war der Ausschluss der Befruchtung durch *M. pumila* var. *Niedzwetskyana* nicht möglich. Ob Bestäuberpollen an der Entstehung der Linie P5/1 beteiligt war, konnte aufgrund fehlender Kenntnis seines Phänotyps am Locus *Pgi-(2)* nicht beurteilt werden.

Neun Linien (A4/2, A9/2, A12/4, A14/4, A21/1, A26/2, A34/1, P5/4/I, P5/4/II) wiesen an mindestens einem der für den jeweiligen Donor relevanten monogenen Marker Heterozygotie auf. Somit konnte eine Entstehung über In-situ-Parthenogenese und die daraus resultierende Homozygotie der Regenerate ausgeschlossen werden.

### 2.3.3 Spaltung der Marker bei Antherenkulturlinien

Die Analyse der Phänotypenverteilung für die Marker *Enp*, *Got-(1)*, *Lap-1* und *Mdh-(3)* zwischen den Regenerationslinien sollte Aufschluss darüber geben, ob die Gameten bezüglich ihrer Regenerationsfähigkeit Selektionsfaktoren unterworfen sind, die Kopplung zu den Markern aufweisen. Die Ergebnisse sind in Tab. 2.19 ersichtlich.

Das erwartete Spaltungsverhältnis von 1:1 wurde uneingeschränkt nur am Locus *Enp* beobachtet; an den anderen drei Loci ergaben sich bei einzelnen Donoren signifikante Abweichungen. Betroffen waren 'Rene' für *Got-(1)*, 'Remura' für *Lap-1* und Pi-A-5,164 für *Mdh-(3)*. Die am Locus *Mdh-(3)* für alle Donoren bestehende Tendenz zur Bevorteilung von Linien, welche durch den Phänotyp [b] gekennzeichnet sind, führte in der Gesamtheit der Linien zu einem Übermaß dieses Phänotyps auf hochsignifikantem Niveau. Auch für *Got-(1)* konnte für die Gesamtheit aller geprüften Linien Signifikanz nachgewiesen werden.

**Tab 2.19:** Phänotypenspaltung der Antherenkulturlinien für die Marker *Enp*, *Got-(1)*, *Lap-1* und *Mdh-(3)* mit Prüfung auf Signifikanz.

Locus	Donor	Anzahl Linien	Phänotypenspaltung	$\chi^2$ (1:1)
<i>Enp</i>	Pi-A-5,164	17	6 [a] : 11 [c]	1,47
	Pi-A-24,45	5	1 [a] : 4 [c]	1,80
	Gesamt	22	7 [a] : 15 [c]	2,91
<i>Got-(1)</i>	'Remo'	3	2 [a] : 1 [b]	0,33
	'Rene'	14	11 [a] : 3 [b]	4,57 *
	Gesamt	17	13 [a] : 4 [b]	4,76 *
<i>Lap-1</i>	'Alkmene'	55	26 [b] : 29 [c]	0,16
	'Remura'	4	4 [b] : 0 [c]	4,00 *
	Pi-A-24,45	5	3 [b] : 2 [c]	0,20
	Gesamt	64	33 [b] : 31 [c]	0,06
<i>Mdh-(3)</i>	'Remo'	6	1 [ab] : 5 [b]	2,67
	'Rene'	13	6 [ab] : 7 [b]	0,08
	Pi-A-5,164	9	1 [ab] : 8 [b]	5,44 *
	Pi-A-24,45	5	1 [ab] : 4 [b]	1,80
	Gesamt	33	9 [ab] : 24 [b]	6,82 **

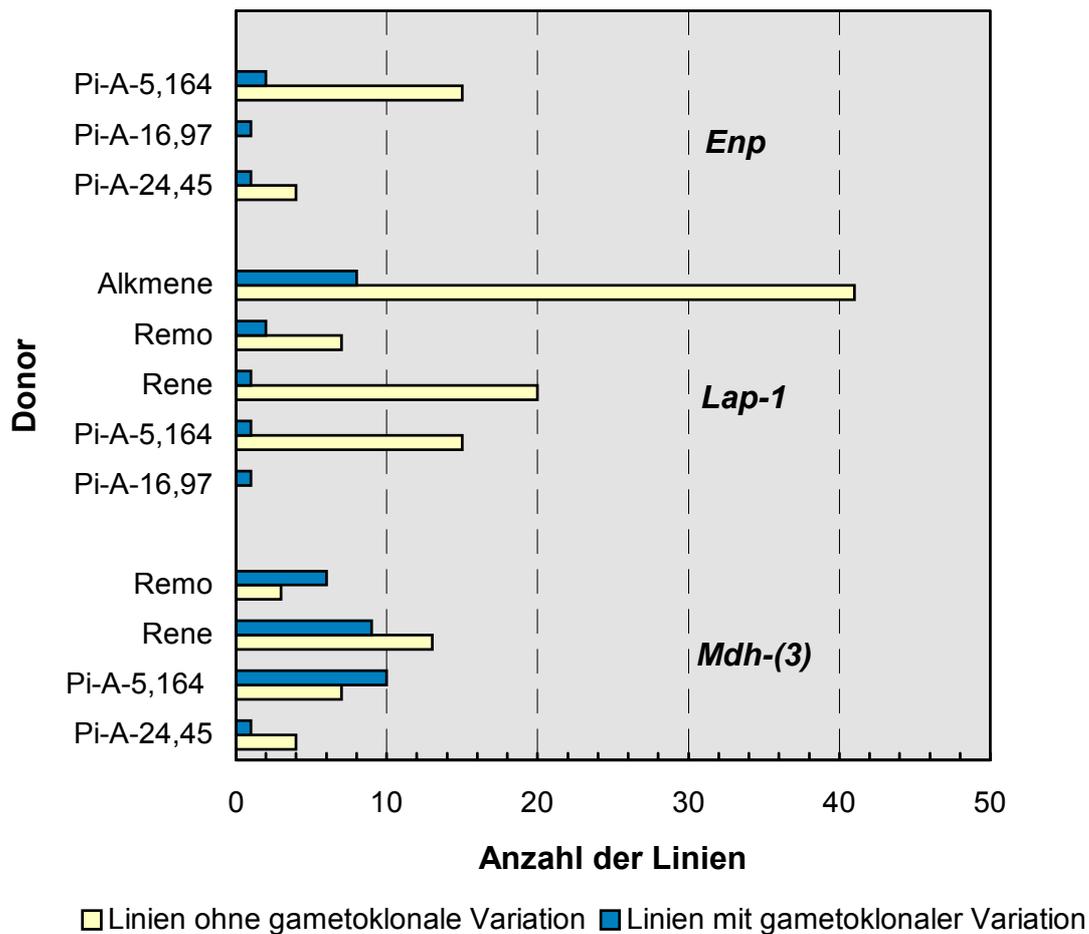
\* signifikant bei  $0,01 < p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $0,001 < p \leq 0,01$

Der signifikanten Abweichung in 'Remura' für *Lap-1* wird jedoch keine Bedeutung beigemessen, da es bei geringen Häufigkeiten ( $n = 4$ ) zur Verzerrung des  $\chi^2$ -Wertes kommt. Sinnvoll ist hier die Anwendung des Binoms  $(1/2 + 1/2)^4$ . Sie ergibt für diesen Wert eine Wahrscheinlichkeit von  $1/16 = 0,0625$  und ist damit nicht signifikant.

### 2.3.4 Gametoklonale Variation bei Antherenkulturregeneraten

Linien, von denen nur ein einzelnes Regenerat untersucht worden war, zeigten keine unerwarteten Phänotypen. Dagegen konnten gametoklonale Variationen in 40 der 112 Linien, von denen mehrere Regenerate betrachtet worden waren, festgestellt werden. Dabei waren drei Linien an zwei Loci, die übrigen an nur einem Locus betroffen. Sie stammten von den Donoren 'Alkmene', 'Remo', 'Rene', Pi-A-5,164, Pi-A-16,97 und Pi-A-24,45 ab (Abb. 2.11). Bei den Regeneraten von 'Alkmene'  $\times$  'Delbard', 'Releika', 'Remura' und Pi-A-15,38 wurden keine gametoklonalen Variationen beobachtet.



**Abb. 2.11:** Gametoklonale Variation in Antherenkulturlinien in Abhängigkeit von Donor und Locus. Es sind nur Donor × Locus-Kombinationen dargestellt, in denen gametoklonale Variation beobachtet wurde.

Die gametoklonale Variation äußerte sich bei 39 Linien im Auftreten von unterschiedlichen Phänotypen innerhalb der Linie am jeweils betrachteten Locus; die Linien waren somit durch Inhomogenität gekennzeichnet. Inhomogene Linien konnten für jeden Locus beobachtet werden, unabhängig davon, ob dieser im Donor durch Homo- oder Heterozygotie gekennzeichnet war. Im Fall eines im Donor homozygot vorliegenden Isoenzym wurden neben Regeneraten, die den erwarteten gleichen Phänotyp wie der Donor zeigten, auch Regenerate mit einem unerwarteten Phänotyp gefunden. Von dieser Art der Inhomogenität waren insgesamt vier Linien am Locus *Lap-1* betroffen. Obwohl alle Donoren dieser Linien ('Remo', 'Rene', Pi-A-5,164 und Pi-A-16,97) Homozygotie für Allel *b* zeigen, wurden bei 16 der 114 Regenerate die Phänotypen [c] bzw. [bc] gefunden. Trat die Inhomogenität dagegen an Loci auf, die im Donor heterozygot vorliegen, so zeigten die Regenerate einer Linie zwar

keine grundsätzlich unerwarteten Phänotypen; es wurden jedoch beide Phänotypenklassen beobachtet, die durch Aufspaltung der heterozygoten Allelkombination entstehen konnten. Demnach hatten die betroffenen acht 'Alkmene'-Linien am Locus *Lap-1* Regenerate mit den Phänotypen [b] und [c] gebildet. Insgesamt 26 Linien von 'Remo', 'Rene', Pi-A-5,164 und Pi-A-24,45 umfassten für *Mdh-(3)* Regenerate mit den Phänotypen [ab] und [b]. Schließlich wiesen insgesamt vier Linien der Genotypen Pi-A-5,164, Pi-A-16,97 und Pi-A-24,45 am Locus *Enp* Regenerate mit den Phänotypen [a] und [c] auf.

In einer weiteren Linie des Donors 'Rene' zeigte sich die gametoklonale Variation dahingehend, dass alle untersuchten Regenerate für *Lap-1* zwar einen einheitlichen Phänotyp exprimierten, dieser jedoch nicht wie erwartet durch [b] sondern durch [c] gekennzeichnet war.

Die Linien mit gametoklonaler Variation wurden in zwölf der 30 getesteten Donor × Locus-Kombinationen gefunden. Die betroffenen Kombinationen sind in Abb. 2.11 dargestellt. Die Variabilität trat bevorzugt bei Linien phänotypisch heterozygoter Donor × Locus-Kombinationen auf. Bei gesonderter Betrachtung der Loci zeigte sich für *Enp* und *Mdh-(3)* der sehr deutliche Zusammenhang zum Phänotyp des Donors. An beiden Loci stammten die Linien mit gametoklonaler Variation ausnahmslos von heterozygoten Donoren. Von den Donoren, deren Linien Variabilität für *Lap-1* gezeigt hatten, wies dagegen nur 'Alkmene' Heterozygotie auf.

Wie in Abb. 2.11 weiterhin ersichtlich ist, ergab der Vergleich von Linien mit und ohne Variation für die Loci unterschiedliche Ergebnisse. Die meisten der durch Variabilität gekennzeichneten Linien wurden am digenen Marker *Mdh-(3)* gefunden. Ihr Anteil betrug hier bei gemeinsamer Betrachtung aller Donoren 49,1 %. Bei 'Remo' und Pi-A-5,164 wiesen sogar mehr als die Hälfte der Linien Variabilität auf. Demgegenüber betrug die Anteile der Linien mit gametoklonaler Variation an den monogenen Loci *Enp* und *Lap-1* nur 17,4 bzw. 15,7 %.

## 2.4 Diskussion

### 2.4.1 Markerentwicklung

#### 2.4.1.1 Spaltungs- und Kopplungsanalysen

Beschreibungen von Enzym polymorphismen bei unterschiedlichsten Apfelgenotypen (u. a. WEEDEN und LAMB 1985, BOURNIVAL und KORBAN 1987) bildeten die Grundlage für erste Hypothesen zur Vererbung einiger Isoenzyme. In der Folgezeit wurden gezielte Vererbungsanalysen unter Nutzung ausgewählter Kreuzungsnachkommenschaften bei *Malus domestica* sowie einigen *Malus*-Wildarten von mehreren Autoren in unterschiedlichem Umfang durchgeführt (CHEVREAU et al. 1985, 1999, CHEVREAU und LAURENS 1987, MANGANARIS und ALSTON 1987, 1988a, b, 1992a, b, c, 1997, WEEDEN und LAMB 1987). Als Trennmethode in diesen Untersuchungen wurden die Stärkegel- und Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Enzyme mit Ausnahme der GOT mittels Isoelektrischer Fokussierung dargestellt. Die erzielten Zymogramme sind teilweise mit denen der genannten Autoren vergleichbar; es konnten jedoch auch Beobachtungen gemacht werden, die in den bisherigen Veröffentlichungen nicht beschrieben worden sind.

Die Hauptursache der unterschiedlichen Ergebnisse besteht höchstwahrscheinlich in der jeweils angewendeten Trennmethode, aber auch eine unterschiedliche Vorgehensweise in der Extrakterstellung könnte eine Rolle spielen. Weiterhin muss beachtet werden, dass für die eigenen Spaltungsanalysen Kreuzungsfamilien genutzt worden sind, die von anderen Autoren nicht untersucht wurden. Im folgenden soll nun näher auf die vorliegenden Literaturdaten im Vergleich zu den eigenen Zymogrammen und deren genetischer Interpretation eingegangen werden.

Die Polymorphismen in den sehr komplexen ACP-Zymogrammen werden in der Literatur auf fünf Loci zurückgeführt. Das Gen *ACP-1* mit zwei aktiven Allelen *a* und *b* sowie einem Nullallel *n* kodiert die Zone mit der höchsten Wanderungsgeschwindigkeit, die jedoch nur in Extrakten von Kotyledonen nachgewiesen wurde (MANGANARIS und ALSTON 1988b). Eine in Blattextrakten aktive angrenzende Zone mit den drei Allelen *a*, *b* und *c* beschrieben CHEVREAU (1984), LAURENS (1986) sowie CHEVREAU und LAURENS (1987), die die Bezeichnung *Acp-2* erhielt (ALSTON et al. 2000). Für diese Zone fanden CHEVREAU et al. (1999) ein zusätzliches Nullallel. HEMMAT et al. (1994) verwiesen ohne nähere Angaben auf die Existenz des dritten *Acp*-Gens, während CHEVREAU et al. (1999) von Spaltungen für *Acp-4* bzw. *Acp-5* unter Beteiligung von je zwei Allelen in einigen Kreuzungen berichteten.

In den ebenfalls sehr komplexen eigenen ACP-Zymogrammen konnten nur die beiden der Anode am nächsten liegenden Zonen analysiert und auf die Existenz zweier Loci mit den Allelen *a* und *n* bzw. *a*, *b* und *n* zurückgeführt werden. Ob diese beiden Loci den in der Literatur beschriebenen entsprechen, kann trotz einiger Ähnlichkeiten bezüglich der beobachteten Allele vor allem deshalb nicht geklärt werden, weil in den verschiedenen Arbeiten unterschiedliche Genotypen untersucht wurden.

Innerhalb des sehr komplexen Bandenmusters der DIA war nur eine einzelne Zone mit Polymorphismen vorhanden. WEEDEN und LAMB (1985) fanden bei der Charakterisierung der Isoenzymphänotypen von 54 Sorten ebenfalls nur eine einzige polymorphe Zone, die jedoch im Gegensatz zu den in den eigenen Untersuchungen beobachteten ein- und zweibandigen Phänotypen durch ein ein- und dreibandiges Muster gekennzeichnet war, was auf eine dimere Struktur dieses Isoenzym hindeutete. Zudem bestand ein Unterschied bezüglich der Lage im Gel. Spaltungsanalysen von Nachkommenschaften, deren Eltern nicht nur Kulturapfelsorten sondern auch Wildarten wie z. B. *M. robusta* bzw. interspezifische Kreuzungsprodukte mit verschiedenen Resistenzen darstellten, ergaben vier polymorphe Zonen, die durch jeweils ein Gen kodiert wurden (WEEDEN und LAMB 1987, CHEVREAU et al. 1999). Beide Arbeiten bestätigen die von WEEDEN und LAMB (1985) anhand der erhaltenen Bandenmuster aufgestellte Vermutung der Existenz eines dimeren Isoenzym.

Die fixierte Heterozygotie in der Kreuzung 'Releika' × 'Rewena' sowie die fehlenden [a]-Phänotypen in zwei weiteren Nachkommenschaften heterozygoter Eltern führte zu der Annahme eines Zwei-Locus-Systems. Im Gegensatz dazu gaben die von CHEVREAU et al. (1999) erhaltenen Daten, die jedoch nur von zwei der insgesamt fünf untersuchten Nachkommenschaften stammten, keinen Hinweis auf digene Vererbung. WEEDEN und LAMB (1987) fanden jedoch bei ihren Untersuchungen zwei verschiedene Isoenzyme, die als dupliziertes Set aktive Hybriddimere bildeten. Insgesamt wurden nur sehr wenige Berichte über pflanzliche Diaphorasen veröffentlicht, so dass es schwierig ist, duplizierte Loci in diesem System zu identifizieren.

Das Isoenzymssystem ENP zeigte wie in der Literatur beschrieben (CHEVREAU et al. 1985, LAURENS 1986, CHEVREAU und LAURENS 1987, MANGANARIS und ALSTON 1988b, CHEVREAU et al. 1999) nur eine einzige Färbezone. Der Polymorphismus wurde auf ein einzelnes Gen mit zwei Allelen (CHEVREAU et al. 1985, CHEVREAU et al. 1999), drei Allelen (LAURENS 1986) bzw. vier Allelen (CHEVREAU und LAURENS 1987) zurückgeführt. In Abkömmlingen von Wildarten konnten MANGANARIS und ALSTON (1988b) noch zwei

weitere Allele dieses Gens feststellen. In allen Fällen stellte die Endopeptidase ein monomeres Isoenzym dar.

Mit Ausnahme der Kreuzung 'Alkmene' × Pi-A-43,31, deren Spaltung nur durch das Vorhandensein eines Nullallels erklärbar ist, für dessen Existenz es in der Literatur bisher keine Hinweise gibt, stimmen die eigenen Ergebnisse gut mit denen aus der Literatur überein. Ausgehend von der Lage und den Abständen der Banden im Gel scheint auch hinsichtlich der Allelbezeichnung Übereinstimmung vorzuliegen. Bekräftigt wird diese Vermutung außerdem dadurch, dass die im Rahmen des Kap. 2.3.1.2 untersuchten Blattextrakte von 'Golden Delicious' den Phänotyp [a] aufwiesen. CHEVREAU und LAURENS (1987) und MANGANARIS und ALSTON (1988b) hatten bei ihren Untersuchungen für 'Golden Delicious' ebenfalls den Phänotyp [a] gefunden.

Für Apfel beschrieben CHEVREAU (1984) und CHEVREAU et al. (1985) erstmals Esterase-Polymorphismen. In Pollenextrakten fanden sie zwei Zonen, die von jeweils einem Gen (*EST-1* und *EST-2*) mit zwei bzw. drei Allelen einschließlich eines Nullallels kodiert wurden. Allerdings wurde *EST-2* nur beobachtet, wenn  $\beta$ -Naphthylacetat als Substrat in der Färbelösung verwendet worden war. In Blattextrakten konnten CHEVREAU und LAURENS (1987) innerhalb sehr komplexer Bandenmuster nur die Zone *EST-1* auswerten.

Die umfangreichsten Studien über die Genetik der Esterasen bei Apfel wurden von MANGANARIS und ALSTON (1992b) vorgelegt. Sie beschrieben neben dem schon bekannten Gen *EST-1* zwei weitere, in Blattextrakten aktive Gene, *EST-3* und *EST-4*, mit jeweils zwei kodominanten Allelen und einem Nullallel. Außerdem wurden am Locus *EST-1* zwei zusätzliche Allele gefunden. In neueren Untersuchungen wiesen CHEVREAU et al. (1999) das ebenfalls in Blattextrakten aktive Gen *EST-5* nach. In den zitierten Arbeiten wird die Vererbung übereinstimmend als monogen beschrieben.

Im Gegensatz zu diesen z. T. mehrfach beschriebenen Loci konnten in den eigenen Arbeiten keine Polymorphismen nachgewiesen werden, die genetisch auswertbar waren. Als Grund muss neben dem Einsatz der Isoelektrischen Fokussierung als Trenntechnik die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Eltern der zahlenmäßig begrenzten Anzahl der untersuchten Kreuzungen für die Loci homozygot waren und demzufolge keine Aufspaltungen in den Nachkommenschaften auftraten.

Neben den vorstehend diskutierten anodischen Zonen verwiesen MANGANARIS und ALSTON (1992b) auf die Existenz kathodischer Banden. In den eigenen Untersuchungen wurden ebenfalls derartige Banden, die offensichtlich zwei verschiedenen Zonen angehörten,

beobachtet. Aufgrund mangelnder Schärfe auf schnell anfärbendem Hintergrund konnten sie wie bei MANGANARIS und ALSTON (1992b) nicht ausgewertet werden. Demgegenüber hatten CHEVREAU et al. (1999) in einer von fünf untersuchten Kreuzungen eine kathodische Esterase erhalten, die durch ein aktives Allel und ein Nullallel gekennzeichnet war.

Auf Polymorphismen der GOT bei Apfel verwiesen zunächst CHYI und WEEDEN (1984). Basierend auf den Bandenmuster-Phänotypen von 54 Apfelsorten sowie den Ergebnissen von Spaltungsanalysen verschiedener Kreuzungsnachkommenschaften beschrieben WEEDEN und LAMB (1985, 1987) zwei Loci, *Aat-p* und *Aat-c*, mit vier (*a, b, c, d*) bzw. drei (*a, b, c*) Allelen. BOURNIVAL und KORBAN (1987) berichteten ebenfalls über zwei polymorphe anodische Loci, von denen jedoch nur einer klare Bandenmuster zeigte. Dabei ließen die an drei Bandenpositionen identifizierten Phänotypen eine dimere Struktur des Isoenzym vermuten. Umfangreiche Vererbungs- und Kopplungsanalysen sowie die Charakterisierung eines breiten Sorten- und Unterlagenspektrums zeigten insgesamt vier Aktivitätszonen, von denen drei jeweils durch die Gene *GOT-1* (6 Allele – *a, b, c, d, e, n*), *GOT-2* (3 Allele – *a, b, n*) sowie *GOT-4* (2 Allele – *a, b*) kodiert wurden (MANGANARIS und ALSTON 1987, 1988a, 1989). Neuere Spaltungsanalysen (CHEVREAU et al. 1999) bestätigten nicht nur die bereits beschriebenen Vererbungsmodelle an den Loci *GOT-1*, *GOT-2* und *GOT-4*, sondern die Autoren berichteten weiterhin über Aufspaltungen an einem weiteren Locus *Aat-5*.

In den eigenen Untersuchungen konnte von drei entdeckten Aktivitätszonen nur die mit der größten Mobilität ausgewertet und auf die Existenz eines Gens, welches mit *Got-(1)* bezeichnet wurde, zurückgeführt werden. Es wird jedoch vermutet, dass das Gen *Got-(1)* eher dem von MANGANARIS und ALSTON (1988a) als *GOT-2* bezeichneten Locus als dem *GOT-1*-Locus aus gleicher Veröffentlichung entspricht. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kreuzungseltern waren in ihrer Herkunft sehr verschiedenartig. Daher ist das ausschließliche Vorkommen der Allele *a* und *b* kritisch im Hinblick einer Übereinstimmung der Loci *Got-(1)* und *GOT-1* mit sechs möglichen Allelen zu betrachten. Bei der Analyse von 61 Sorten waren von diesen sechs Allelen zumindest die Allele *a, b, c* und *d* in nahezu der gleichen Häufigkeit (17,1-22,5 %) vertreten (MANGANARIS und ALSTON 1989). Obwohl in der zitierten Literatur keiner der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kreuzungseltern untersucht worden ist, erhärten indirekte Vergleiche verwandter Genotypen die oben formulierte Vermutung. So ist 'Gloster 69' für *GOT-1* durch *cc* und für *GOT-2* durch *ab* gekennzeichnet. In den eigenen Untersuchungen wies 'Piglos' – eine Mutante von 'Gloster 69' – am spaltenden Locus *ab* auf, was der Allelkombination von 'Gloster 69' am Locus *GOT-2* entspricht. Ähnliches konnte bei

der Gegenüberstellung von 'Golden Delicious' und 'Pinova', einem Kreuzungsprodukt von 'Clivia' × 'Golden Delicious', beobachtet werden. 'Golden Delicious' weist genotypisch die Allele *ae* (*GOT-1*) sowie *bn* (*GOT-2*) auf (MANGANARIS und ALSTON 1987, 1989); für 'Pinova' wurde in den Kreuzungsanalysen *bb* gefunden.

Die im Vergleich zur Literatur abweichende Anzahl der beobachteten Aktivitätszonen und die daraus resultierende veränderte Locusnummerierung könnten möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme während der elektrophoretischen Trennung zurückzuführen sein.

CHEVREAU et al. (1985) konnten in den sehr komplexen IDH-Zymogrammen von Pollenextrakten eine polymorphe Zone, die durch zwei Allele gekennzeichnet war, interpretieren. Die Spaltungsdaten entsprachen am besten einer digenen disomen sowie einer tetrasomen Vererbung. Auf der Grundlage von Arbeiten zur Identifizierung von Apfelsorten durch Isoenzymphänotypen (WEEDEN und LAMB 1985), in denen zwei Gene, *Idh-1* und *Idh-2*, vermutet wurden, veröffentlichten WEEDEN und LAMB (1987) die Spaltungsdaten dieser Gene in verschiedenen Kreuzungsnachkommenschaften. Sie stellten fest, dass das zweite Isoenzym mit einer Untereinheit von *Idh-1* interagiert, wobei sich zwischen beiden Genen Hybriddimere und ein fixierter heterozygoter Phänotyp ausbildete. Somit konnten die Beobachtungen am besten mit einem digenen disomen Vererbungsmodell erklärt werden. MANGANARIS (1989, zit. in CHEVREAU et al. 1999) verwies auf einen dritten Locus, *IDH-3*, für den CHEVREAU et al. (1999) zwei Allele beschrieben.

Die in den eigenen Untersuchungen erhaltenen, ebenfalls sehr komplexen Bandenmuster wiesen keine Polymorphismen auf. Als mögliche Ursachen können neben dem Einsatz der anderen Trenntechnik entweder Homozygotie aller Eltern für das gleiche Allel oder "fixierte Heterozygotie", die einem digenen Vererbungsmodell entsprechen würde, genannt werden.

Das Enzymsystem LAP ist für Apfel erstmals von CHEVREAU (1984) untersucht worden. In Pollenextrakten wurden vier Banden nachgewiesen; Vererbungsanalysen wurden jedoch nicht durchgeführt. In umfangreichen genetischen Studien an unterschiedlichen Geweben wiesen MANGANARIS und ALSTON (1992a) sechs, z. T. gewebespezifische Aktivitätszonen nach. Vier von ihnen werden durch die Gene *LAP-1*, *LAP-2*, *LAP-3* und *LAP-4* mit insgesamt 17 Allelen kodiert. Wie in anderen Pflanzen, so z. B. in *Prunus amygdalus* (HAUAGGE et al. 1987) oder in *Pisum sativum* (WEEDEN und MARX 1987) zeigten die Isoenzyme einen monomeren Charakter.

Die eigenen Ergebnisse sind sehr gut mit denen von MANGANARIS und ALSTON (1992a) vergleichbar. Wie in der zitierten Arbeit wurden bis zu fünf Aktivitätszonen in den untersuchten Blattextrakten mit der typischen monomeren Enzymstruktur erhalten. Die besten Aktivitäten wurden ebenfalls in der Zone LAP-1 erzielt, LAP-3 war deutlich schwächer ausgeprägt und LAP-2, LAP-4 sowie LAP-6 verloren während der Lagerung vollständig ihre Aktivität. Die Spaltungen von sieben der acht Nachkommenschaften entsprechen dem beschriebenen monogenen Erbgang. Lediglich die Aufspaltung in 'Piglos' × 'Pilot' konnte nicht in dieser Weise erklärt werden. Eine Ursache für diese Abweichung zu finden ist schwierig, da 'Pilot' in mehreren Untersuchungen keine Aktivitäten gezeigt hatte. Theoretisch ist ein derartiges Spaltungsergebnis selbst unter Annahme von Nullallelen bei 'Pilot' nicht möglich.

Im Gegensatz zu BOURNIVAL und KORBAN (1987), die bei der Testung mehrerer Sorten das Enzym MDH als monomorph charakterisierten, beschrieben WEEDEN und LAMB (1987) unter Verwendung anderer Sorten und eines anderen Puffersystems Polymorphismen in einer der fünf beobachteten Aktivitätszonen (MDH-4). Anhand der Bandenmuster wurde auf eine dimere Struktur geschlossen sowie Interaktionen zu einer weiteren, jedoch invarianten Zone vermutet. Die These von einem verdoppelten Locus wurde außerdem durch Untersuchungen von Pollenextrakten gestützt. Darüber hinaus zeigte eine der sieben untersuchten Kreuzungsnachkommenschaften in der zweiten Aktivitätszone einen weiteren Polymorphismus, der sich im Vorhandensein bzw. Fehlen einer einzelnen Bande äußerte. Da beide Phänotypenklassen zu gleichen Teilen vertreten waren, wurde ein weiteres Gen, *Mdh-2*, vermutet.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen ŠTAMPAR et al. (1994), die Polymorphismen in Form von ein- und dreibandigen Mustern in einer von vier Aktivitätszonen erhielten. Die Spaltungsanalysen gaben jedoch keinen Hinweis auf ein Zwei-Locus-System. Auf die Existenz von zwei weiteren Genen, *MDH-1* und *MDH-3*, verwies MANGANARIS (1989, zit. in CHEVREAU et al. 1999).

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten IEF-Zymogramme zeigten im anodischen Gelbereich zwar zwei Aktivitätszonen, es konnten jedoch keine unterschiedlichen Muster beobachtet werden. Variationen, die gut durch ein digenes Vererbungsmodell erklärbar waren, traten nur im kathodischen Gelbereich auf. Der aufgrund der Position im Gel als *Mdh-(3)* bezeichnete kodierende Locus ist nicht mit dem von MANGANARIS (1989, zit. in CHEVREAU et al. 1999) beschriebenen Locus *MDH-3*, der bei anodischer Auftrennung erhalten wurde, identisch. Bislang lagen zu kathodischen MDH-Aktivitäten keine Berichte vor. Unter

Berücksichtigung der von ALSTON et al. (2000) vorgelegten Zusammenstellung aller bisher bekannten *Malus*-Gene sowie der vorgeschlagenen Kriterien zur Benennung der Loci wäre die Bezeichnung *Mdh-c* sicherlich treffender.

In der Literatur ist nur ein polymorpher Locus des Enzyms ME mit zwei Allelen beschrieben worden (WEEDEN und LAMB 1987, ŠTAMPAR et al. 1994, CHEVREAU et al. 1999). WEEDEN und LAMB (1987) vermuteten anhand mehrbandiger Muster Interaktionen zu mindestens einem anderen Locus. Die Spaltungsdaten der anderen Autoren lassen auf einen rein monogenen Erbgang schließen. In allen drei Arbeiten beruht der Polymorphismus an diesem Locus auf der Heterozygotie mindestens eines Elters, der als resistenter Zuchtstamm entweder Erbgut verschiedener Wildarten (*M. floribunda*, *M. purpurea* und *M. robusta*) besitzt oder direkt das unmittelbare Kreuzungsprodukt zwischen Sorte und Wildart darstellt. Demgegenüber zeigten alle Eltern, die Kulturapfelsorten repräsentieren, mit Ausnahme von 'Rome Beauty' den gleichen homozygoten Phänotyp.

Es wird vermutet, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kreuzungen, die bis auf einen Zuchtstamm ausschließlich Sorten umfassten, wahrscheinlich auch durch diesen homozygoten Phänotyp gekennzeichnet sind und es daher nicht möglich war, die polymorphe Zone zu erkennen.

WEEDEN und LAMB (1987) beobachteten in Blattextrakten ein plastidenspezifisches sowie zwei cytosolische PGD-Isoenzyme. Das plastidenspezifische Enzym zeigte vier verschiedene Phänotypen, die von einem Kerngen *Pgd-p* kodiert wurden. Beide cytosolische Isoenzyme – eines mit, das andere ohne Variationen – ließen eine dimere Struktur vermuten. Nach Vergleichen mit Pollenextrakten lagen dem variablen eine monogene Vererbung und dem invariablen eine digene Vererbung zugrunde. ŠTAMPAR et al. (1994) fanden zwei polymorphe Isoenzyme, die auf jeweils einen Locus zurückgeführt wurden. Bezüglich der Allel- und Phänotypenanzahl bestehen unter Berücksichtigung der in den Kreuzungen verwendeten Eltern starke Ähnlichkeiten zu den von WEEDEN und LAMB (1987) beschriebenen Loci.

Im Gegensatz zu den vorstehend angeführten Arbeiten wiesen die eigenen Zymogramme keine Unterschiede im intensiv gefärbten und damit auswertbaren Gelbereich auf. Die von den zitierten Autoren beschriebenen Phänotypen und Aufspaltungen für *Pgd-p* bzw. *6-PGD-I* waren in diesem Bereich nicht vorhanden, obwohl bei Berücksichtigung der Elterngenotypen Polymorphismen zu erwarten gewesen wären. Stattdessen konnten nur andeutungsweise Polymorphismen in sehr schwach gefärbten Gelbereichen beobachtet werden. Es könnte

möglich sein, dass es sich bei einer dieser Zonen um das plastidenspezifische Isoenzym handelt, was durch die genutzte Extraktionsmethodik nur ungenügend herausgelöst wurde.

Das variable, von WEEDEN und LAMB (1987) beschriebene cytosolische Isoenzym sowie der Locus *6-PGD-2* (ŠTAMPAR et al. 1994) hingegen könnten sehr gut durch eine einzige Bande im gut angefärbten Gelbereich vertreten sein. Alle in den zitierten Arbeiten als Eltern genutzten Sorten hatten den gleichen homozygoten Phänotyp gezeigt; die Variationen waren ausschließlich auf Wildarten zurückzuführen gewesen. Da in den eigenen Kreuzungen mit Ausnahme von Pi-A-43,31 ebenfalls Sorten genutzt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass alle Eltern die beschriebene Homozygotie aufweisen und daher keine Spaltung beobachtet werden konnte. Darüber hinaus könnte das invariable dreibandige cytosolische Isoenzym (WEEDEN und LAMB 1987) ebenso in dem eigenen komplexen Zymogramm enthalten sein.

In der Literatur werden für das Isoenzymssystem PGI bis zu drei Färbezonen mit unterschiedlichen Angaben zu beobachteten Polymorphismen beschrieben. WEEDEN und LAMB (1987) berichteten von zwei Isoenzymen, GPI-1 und GPI-2 mit je zwei Allelen, die den Loci *Gpi-p* und *Gpi-c1* zugeordnet wurden. Beide Isoenzyme besaßen eine heterodimere Struktur. Ein weiteres Isoenzym, GPI-3, war in jedem Genotyp der untersuchten Kreuzungen durch ein invariantes dreibandiges Muster gekennzeichnet. Vergleichende Untersuchungen an Pollenextrakten zeigten, dass für GPI-2 und GPI-3 jeweils duplizierte Loci kodieren. Am Locus *Pgi-2*, der den Locus *Gpi-c1* (WEEDEN und LAMB 1987) entspricht, erhielten CHEVREAU et al. (1999) ebenfalls Aufspaltungen mit zwei beteiligten Allelen.

Demgegenüber fanden BOURNIVAL und KORBAN (1987), CHEVREAU und LAURENS (1987) sowie ŠTAMPAR et al. (1994) bei allen untersuchten Genotypen nur monomorphe Muster, die jedoch ebenfalls auf eine dimere Struktur des Isoenzym (BOURNIVAL und KORBAN 1987, CHEVREAU und LAURENS 1987) hindeuten. Die fehlenden Aufspaltungen in den Kreuzungsnachkommenschaften wurden durch das Vorhandensein eines duplizierten Genes erklärt (CHEVREAU und LAURENS 1987).

Aktivitätszonen, deren Muster mit den Beobachtungen und Interpretationen der zitierten Autoren vereinbar sind, wurden auch in den eigenen Kreuzungen gefunden (Zonen 1, 3 und 4). Aufgrund von Invarianz bzw. ungenügender Aktivität erfolgte jedoch keine Spaltungsanalyse.

Im Vergleich zu den Literaturangaben konnte erstmals ein Locus mit drei Allelen beschrieben werden, der ebenfalls eine dimere Struktur aufweist und infolge seiner Position im Gel als *Pgi-(2)* bezeichnet wurde. Abweichend von allen bisher veröffentlichten Daten wurden jedoch Allele mit zwei Banden beobachtet.

Die Frage, ob dieser Locus dem bereits bekannten gleichnamigen Locus (CHEVREAU et al. 1999) bzw. dem einer anderen beschriebenen Färbezone entspricht, oder ob es sich um einen weiteren PGI-Locus handelt, kann aufgrund der unterschiedlichen Trennmethode und der unterschiedlichen untersuchten Genotypen nicht geklärt werden.

Der ähnlich wie bei anderen Pflanzenarten auch bei Apfel sehr hohe Polymorphiegrad der Peroxidasen wurde von MIŠIĆ et al. (1980a), VINTERHALTER und JAMES (1983, 1986), MENENDEZ et al. (1986a, b) sowie QUARTA und ARONE (1987) im Rahmen von Arbeiten zur Sorten- und Unterlagenidentifizierung beschrieben.

Zur Vererbung der Peroxidase-Isoenzyme wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Zunächst wurden sieben Bandengruppen, sechs anodische und eine kathodische, beobachtet und die Vererbung von drei der anodischen Zonen untersucht (MIŠIĆ et al. 1980b). Dabei wurde die Existenz von mindestens sieben eng gekoppelten polymorphen Genen mit je einem aktiven und einem inaktiven Allel vermutet. CHEVREAU und LAURENS (1987) beschrieben vier Gruppen im selben Gelbereich und schlossen auf eine digene Vererbung mit je drei Allelen einschließlich eines Nullallels. BOURNIVAL und KORBAN (1987) berichteten von einem Gen mit fünf Allelen.

Auf der Basis zahlreicher kontrollierter Kreuzungen zwischen Sorten und Selektionen sowie der Untersuchung sehr unterschiedlicher Wildarten und Unterlagen beschrieben MANGANARIS und ALSTON (1992c, 1993) sechs anodische (PRX-1 bis PRX-6) und zwei kathodische Zonen (PRX-7, PRX-8). Die gefundenen Phänotypen wurden von mindestens acht Genen kodiert. Die Analyse der Zonen PRX-2, PRX-3, PRX-4 und PRX-7 mit insgesamt zwölf Allelen sowie drei Nullallelen verwies auf einen monogenen Erbgang. Ergänzend dazu wurden kürzlich Spaltungsdaten von zwei Kreuzungen für einen zweiten kathodischen Locus *Prx-C2*, welcher zwei Allele umfasst, veröffentlicht, die ebenfalls eine monogene Vererbung vermuten lassen (CHEVREAU et al. 1999).

Die Zymogramme der eigenen Untersuchungen weisen große Ähnlichkeiten zu den Beobachtungen der zitierten Autoren auf, auch wenn aufgrund der geringeren Aktivität die nahe der Elektroden gelegenen Banden nicht ausgewertet wurden. Der anodische Gelbereich war durch maximal fünf Färbezonen gekennzeichnet; im kathodischen Bereich waren Banden sichtbar, die deutlich zwei Zonen zugeordnet werden konnten. Die innerhalb der dritten Zone gefundene Spaltung von zwei aktiven Allelen *a* und *b* sowie des Nullallels *n* entsprechen den Ergebnissen, die von MANGANARIS und ALSTON (1992c) für *PRX-3* beschrieben worden sind. Es wurde daher angenommen, dass die Loci *Prx-3* und *PRX-3* identisch sind.

Für die sich in den eigenen Kreuzungen als invariant erwiesene SKD liegen in der Literatur nur begrenzte Angaben vor. Bei Analysen im Rahmen von Sortendifferenzierungen fanden BOURNIVAL und KORBAN (1987) ebenfalls keine Polymorphismen. HEMMAT et al. (1994) verwiesen dagegen auf einen Locus *Skdh*, für den die Untersuchung der Nachkommenschaft einer Kreuzung von 'Fiesta' mit einem für dieses Gen heterozygoten Abkömmling von *M. robusta* eine 1:1-Spaltung unter Beteiligung der Allele *a* und *b* ergeben hatte. Offensichtlich wurden jedoch weder in der vorliegenden Arbeit noch in der von BOURNIVAL und KORBAN (1987) heterozygote Genotypen verwendet, in deren Nachkommenschaften Spaltungen zu erwarten gewesen wären.

Für das Enzym SOD sind bisher fünf Aktivitätszonen beschrieben worden (CHEVREAU und LAURENS 1987, MANGANARIS und ALSTON 1997, CHEVREAU et al. 1999). Dabei ergaben die Spaltungsanalysen der schnellsten Zone SOD-1 konträre Ergebnisse. Während CHEVREAU und LAURENS (1987) aufgrund fehlender Aufspaltung der beiden beobachteten Phänotypen in einigen Kreuzungen eine Vererbung mit Beteiligung zweier homöologer Gene vermuteten, fanden MANGANARIS und ALSTON (1997), dass die Aktivität dieser Zone – ebenso wie die von SOD-3 und SOD-4 – durch nur ein Gen kodiert wird. Für zwei weitere Loci, *Sod-2* und *Sod-5*, liegen Informationen zu Aufspaltungen unter der Beteiligung von zwei Allelen vor (CHEVREAU et al. 1999).

Die in den eigenen Untersuchungen gefundenen Zymogramme weisen bezüglich ihrer Bandenmuster Ähnlichkeiten zu den in der Literatur beschriebenen Zonen 1 und 2 auf. Das fünfbandige Muster von SOD-1 entspricht sehr gut dem von CHEVREAU und LAURENS (1987) sowie von MANGANARIS und ALSTON (1997) beobachteten heterozygoten Phänotyp.

Die Frage, ob diese Zone mit dem in der Literatur zitierten Locus *Sod-1* übereinstimmt, kann trotz der Ähnlichkeiten der Bandenmuster aufgrund der Invarianz nicht eindeutig beantwortet werden. Im Falle einer Übereinstimmung würden die fehlenden Aufspaltungen jedoch die von CHEVREAU und LAURENS (1987) postulierte These einer digenen Vererbung unterstützen.

In der zweiten Zone wurden wie in der Literatur (MANGANARIS und ALSTON 1997, CHEVREAU et al. 1999) zwei Allele beobachtet, von denen die Bande *b* im Gegensatz zur Bande *a* immer präsent war. Es ist möglich, dass der in der vorliegenden Arbeit analysierte Locus *Sod-(2)* und der in der Literatur beschriebene Locus für die zweite Aktivitätszone identisch sind. Da für diesen Locus jedoch noch keine umfangreichen Vererbungsstudien vorliegen, wurde auf die Übernahme des Symbols *Sod-2* verzichtet.

In den 14 untersuchten Enzymsystemen konnten zehn Isoenzyme gefunden werden, deren Polymorphismen auf die genetische Aufspaltung unterschiedlicher Allele der kodierenden Loci zurückzuführen waren. Obwohl die Nachkommenschaften selbst als auch die je Kreuzung analysierten Individuen zahlenmäßig relativ begrenzt waren, konnte aufgrund der geringen Anzahl der erwarteten phänotypischen Klassen eine Interpretation der Spaltungen erfolgen. Dabei entsprachen die Spaltungsdaten von sieben Isoenzymen einer monogenen Vererbung, während bei drei weiteren eine digene Kodierung zugrunde lag.

Die digene Vererbung der Isoenzyme *Dia*, *Mdh-(3)* sowie *Sod-(2)* ist sehr wahrscheinlich auf den allopolyploiden Ursprung des Kulturapfelgenoms zurückzuführen, der mittels zytologischer (SAX 1933) und morphologischer (STEBBINS 1950) Studien sowie durch die Untersuchung phenolischer Verbindungen (CHALLICE 1981) und Isoenzymen (CHEVREAU und LAURENS 1987, CHEVREAU et al. 1985) belegt worden ist. Einige Isoenzyme behielten im Laufe der Evolution ihre duplizierte Kontrolle durch homöologe Gene bei, während andere die doppelte Expression durch "gene-silencing" verloren haben.

Von 80 Spaltungen, die insgesamt analysiert worden sind, konnte ein Ergebnis nicht erklärt werden ('Piglos' × 'Pilot', *Lap-1*); sechs weitere Spaltungen wiesen Störungen in der zahlenmäßigen Besetzung der erwarteten Phänotypenklassen auf, wobei allein vier auf die Nachkommenschaft von 'Alkmene' × Pi-A-41,31 entfielen. Genetische Ursachen für die Entstehung abweichender Spaltungsverhältnisse können Selektionsprozesse am untersuchten Locus selbst oder an einem gekoppelten unbekanntem Locus sein. Die Selektion kann auf der Ebene der Gameten oder der Ebene der Zygote stattfinden. Bei Gametenselektion zeigen die Gameten eine unterschiedliche Lebensfähigkeit, die zu einer bevorzugten Fusion bestimmter Gameten führt. Zygotenselektion hingegen zeigt sich in einer unterschiedlichen Fitness der verschiedenen Zygotengenotypen. Welche Art der Selektion den hier beobachteten gestörten Spaltungsverhältnissen zugrunde liegt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht sicher geklärt werden. MANGANARIS und ALSTON (1987, 1997) diskutierten gametophytische Selektion als Ursache für abweichende Spaltungsergebnisse in ihren Untersuchungen.

Zwischen den in dieser Arbeit beschriebenen Loci konnten keine Kopplungen gefunden werden. Im Rahmen früherer Untersuchungen zur Genetik der Isoenzyme sowie in Arbeiten zur Erstellung einer genetischen Karte für Apfel sind jedoch einzelne Kopplungen (WEEDEN und LAMB 1987, MANGANARIS und ALSTON 1988b) bzw. Kopplungsgruppen, die teilweise auch mehrere Isoenzyme beinhalten (HEMMAT et al. 1994, CONNER et al. 1997, MALIE-PAARD 1998, CHEVREAU et al. 1999) beschrieben worden. Eine Wertung des eigenen Ergebnisses im Hinblick auf die Literaturdaten ist aufgrund der Unklarheiten bezüglich der

Übereinstimmung der Loci nicht möglich. Außerdem sind in den Kopplungsgruppen mehrere Isoenzyme lokalisiert, für die in dieser Arbeit keine Spaltungen gefunden wurden oder die nicht Gegenstand der Spaltungsanalysen waren.

Die freie Spaltung der zehn untersuchten Isoenzyme ist für den Einsatz als Marker in der Charakterisierung der Regenerate aus der Haploidenkultur jedoch als günstig zu bewerten, da somit ein größerer Teil des Genoms abgedeckt worden ist.

#### **2.4.1.2 Gewebespezifische Expression und Stabilität der spaltenden Loci**

Die Untersuchungen zu Polymorphismen sowie zur Genetik der Isoenzyme erfolgen unabhängig von der Pflanzenart an adulten Pflanzen aus dem Freiland, nicht jedoch an In-vitro-Material, das von Kreuzungspopulationen in der Regel nicht vorhanden ist. Nahezu alle Vererbungsstudien bei Apfel, die in Kap. 2.4.1.1 zitiert worden sind, wurden mit jungen Blättern von Sämlingen aus Gewächshaus und Freiland oder von bereits veredelten Bäumen durchgeführt. Der Vorteil dieses Pflanzenmaterials besteht darin, dass es stets in ausreichender Menge über einen nicht allzu kurzen Zeitraum verfügbar ist, sich relativ leicht extrahieren lässt und in vielen Fällen gute Aktivitäten zeigt. Aus diesen Gründen wurde für die eigenen Untersuchungen ebenfalls Blattmaterial adulter Bäume genutzt. Zudem ist Blattgewebe besser mit In-vitro-Material vergleichbar als beispielsweise Pollen, Blütenknospen oder Rinde.

Um zu sichern, dass die spaltenden Isoenzymloci als Marker für den Homozygotietest in möglichst allen Entwicklungsstadien der Regenerate, vor allem aber bereits während der In-vitro-Kultur eingesetzt werden können, mussten entsprechende Tests durchgeführt werden. Außerdem waren Erkenntnisse über den Zeitpunkt der Probennahme bei überführten bzw. veredelten Regeneraten im Verlauf der Vegetationsperiode notwendig.

Die Untersuchungen ergaben für die einzelnen Loci unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten. *Enp*, *Got-(1)*, *Lap-1*, *Mdh-(3)*, *Pgi-(2)* und *Sod-(2)* zeigten in allen getesteten Geweben die gleichen Muster, während *Dia*, *Prx-3*, *Acp-(1)* und *Acp-(2)* nicht in In-vitro-Geweben exprimiert wurden. Diese Loci sind somit nur als Marker bei bewurzelten bzw. veredelten Regeneraten, welche in Gewächshaus oder Freiland kultiviert werden, einzusetzen.

Einige der erstgenannten Enzymloci werden auch in der Literatur bei Vergleich verschiedener Gewebe von Sämlingen und adulten Pflanzen als stabil eingeschätzt. So ist die in Blättern gefundene einzige Färbezone der ENP der Zone identisch, die in Kotyledonen gefunden wurde (CHEVREAU und LAURENS 1987, MANGANARIS und ALSTON 1988b). Für GOT-1,

GOT-2, LAP-1 und SOD-1 bis SOD-4 stellten MANGANARIS und ALSTON (1987, 1988a, 1992a, 1997) keine qualitativen Bandenunterschiede zwischen mehreren Geweben fest. Die Enzyme ACP und besonders PRX sind hingegen für gewebespezifische und entwicklungsphysiologische Variationen bekannt. Dies bestätigten auch für Apfel die Untersuchungen von MANGANARIS und ALSTON (1988b, 1992c), die für PRX nicht nur entwicklungs- und gewebespezifische Veränderungen, sondern auch jahreszeitlich bedingte qualitative Unterschiede beobachteten. Für DIA, MDH und PGI hingegen liegen für Apfel keine gewebevergleichenden Untersuchungen anderer Autoren vor.

Die an fast allen interessierenden Loci im Zuge der saisonalen Blattalterung beobachtete nachlassende Aktivität ist eine Eigenschaft der Isoenzyme, die schon häufig beschrieben wurde und die der Grund dafür ist, dass Isoenzymanalysen in der Regel mit jungen Pflanzenmaterial durchgeführt werden. WEEDEN und LAMB (1985) verglichen gezielt junge Blätter, die während des Winters von vorgetriebenen Reisern und während des Frühjahrsaustriebes gesammelt worden waren, mit voll entfaltetten Blättern im Frühsommer und stellten fest, dass die älteren Blätter zwar die gleichen Bandenmuster, aber eine deutlich geringere Aktivität für die untersuchten Enzyme DIA, IDH, GOT, PGD, PGI und TPI aufwiesen. Bei ihren Untersuchungen zur Genetik der LAP erzielten MANGANARIS und ALSTON (1992a) mit jungen Blättern die besten Ergebnisse.

Vergleichende Untersuchungen der Isoenzymmuster von Pflanzen, die unter normalen Umweltbedingungen sowie unter In-vitro-Bedingungen wuchsen, sind in der Literatur ebenso begrenzt vorhanden wie Vergleiche unterschiedlicher In-vitro-Gewebe selbst. FOISSET et al. (1993) verwiesen darauf, dass androgenetisch erzeugte Embryoide von Raps vergleichbare Isoenzymmuster wie Blattmaterial von im Freiland angebauten Pflanzen besitzen.

Die besonders guten Enzymaktivitäten einzelner Kotyledonen bzw. ganzer Embryoide sowie von Adventivknospen sind Ausdruck dafür, dass in diesen Entwicklungsstadien sehr intensive Stoffwechselforgänge stattfinden, die zu Differenzierung und Wachstum führen. Die deutlich geringeren Aktivitäten isoliert extrahierter In-vitro-Blätter gegenüber Sprossextrakten ist durch das Fehlen des meristematischen Gewebes der Sprossspitze, der Zone größter Wachstumsintensität, erklärbar.

Die mit zunehmender Subkulturdauer nachlassenden Aktivitäten weisen Parallelen zu den sinkenden Aktivitäten in Zuge der entwicklungsphysiologischen und jahreszeitlichen Alterung der Freilandblätter auf. Gegen Ende der normalen Subkulturdauer von vier Wochen

beginnt das Wachstum zu stagnieren. Das Absinken der Enzymaktivitäten bis hin zum völligen Erliegen ist vergleichbar mit dem Triebabschluss im Freiland.

Die Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression und Stabilität der spaltenden Loci führten zu Einschränkung in der Anwendbarkeit als Marker. Dennoch erscheinen die für jedes Entwicklungsstadium nutzbaren Marker als ausreichend für eine frühzeitige Charakterisierung eines Großteils der Regenerate.

### 2.4.1.3 Donorspezifische Marker

Auf der Grundlage der Heterozygotie konnten für alle Donoren ein bis sechs Isoenzymloci als Marker für den Homozygotienachweis bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Einschränkungen die sich aus der Genetik, der Gewebespezifität und der Stabilität der Loci ergaben, weisen die Marker jedoch eine unterschiedliche Eignung auf.

Bezugnehmend auf die Genetik sind in der Anwendung die monogen vererbenden Marker *Acp-(1)*, *Acp-(2)*, *Enp*, *Got-(1)*, *Lap-1*, *Pgi-(2)* und *Prx-3* den digenen vorzuziehen. Aus dem phänotypischen Erscheinungsbild des Donors heraus konnte nicht nur seine genotypische Allelkombination sicher bestimmt werden, sondern ein weiterer Vorteil dieser Marker besteht darin, dass – bei Kodominanz beider Allele – für jedes Regenerat eine eindeutige Zuordnung möglich ist. Es können somit alle Regenerate sicher charakterisiert werden. Ist der Donor am monogenen Markerlocus jedoch durch die Kombination eines aktiven Allels mit einem Nullallel gekennzeichnet, so kann eine sichere Zuordnung nur für die Regenerate erfolgen, die das Nullallel tragen. Mögliche homozygote, durch den Phänotyp des aktiven Allels gekennzeichnete Regenerate, sind dagegen nicht vom Donor zu unterscheiden.

Demgegenüber waren für die digenen Marker *Dia*, *Mdh-(3)* und *Sod-(2)* eindeutige Angaben zu den im Donor vorliegenden genotypischen Allelkombinationen nicht möglich gewesen. Es konnten nur für die im Rahmen der Spaltungsanalysen untersuchten Donoren 'Alkmene', 'Releika', 'Remo' und 'Piglos' einige Allelkombinationen ausgeschlossen werden. Für 'Rene', Pi-A-5,164 und Pi-A-24,45 mussten alle möglichen Allelkombinationen in Betracht gezogen werden, was zu unterschiedlichen Varianten des phänotypischen Erscheinungsbildes für homo- bzw. heterozygote Regenerate führte. Für die angenommene Allelkombination *ab*, *bb*, aber auch für die Kombinationen *aa*, *bb* oder *ab*, *aa*, die in den Donoren 'Rene', Pi-A-5,164 und Pi-A-24,45 nicht auszuschließen sind, ist eine Zuordnung von [ab]-Regeneraten nicht möglich, auch wenn sie tatsächlich aus normalen, reduzierten Mikrosporen hervorgegangen sind. Aus diesen beiden Gründen – einerseits der Unkenntnis der im Donor vorliegenden

genotypischen Allelkombination und andererseits der möglichen Zweideutigkeit der [ab]-Regenerate – kann die Homozygotie eines Regenerates nur dann nachgewiesen werden, wenn sein Phänotyp durch nur ein Allel gekennzeichnet ist. Alle [ab]-Regenerate müssen dagegen als "nicht charakterisierbar" eingestuft werden.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression und der Stabilität der spaltenden Loci unterliegen die monogenen Marker *Acp-(1)*, *Acp-(2)*, *Pgd-(2)* und *Prx-3* sowie die digenen Marker *Dia* und *Sod-(2)* bestimmten Einschränkungen bezüglich der Anwendbarkeit. Es dürfen nur Gewebeproben untersucht werden, in denen sie ohne Variationen ausgeprägt werden. Während *Acp-(1)*, *Acp-(2)*, *Dia* und *Prx-(3)* für die frühzeitige Untersuchung von In-vitro-Material völlig ungeeignet sind, können *Pgi-(2)* und *Sod-(2)* unter bestimmten Voraussetzungen (keine Glasigkeit bzw. intensives Wachstum) für derartige Regenerate eingesetzt werden.

Eine in jedem Entwicklungsstadium durchzuführende und stets eindeutige Aussagen erbringende Charakterisierung ist somit nur mit den Markern *Enp*, *Lap-1* und *Got-(1)* möglich. Da für jeden Donor mindestens einer dieser Marker zur Verfügung steht, können alle Regenerate auf Homozygotie getestet werden. Die anderen Marker können unter Beachtung ihrer Nutzungseinschränkungen einer ergänzenden Untersuchung dienen.

## 2.4.2 Homozygotietest

### Regenerate aus der Antheren- und Mikrosporenkultur

Die Untersuchung der androgenetischen Regenerate mit den monogenen Markern *Lap-1*, *Enp* und *Got-(1)* einerseits und dem digenen Marker *Mdh-(3)* andererseits erbrachte teilweise unterschiedliche Ergebnisse, für deren Interpretation die Genetik der Marker berücksichtigt werden musste.

Alle Regenerate, die für *Enp* und *Lap-1* getestet worden waren, wiesen Homozygotie für diese Loci auf. *Mdh-(3)* hingegen zeigte erwartungsgemäß homozygote und heterozygote Phänotypen. Aufgrund des duplizierten Locus konnten die heterozygoten Phänotypen sowohl haploiden Ursprungs (Mikrospore) als auch diploiden Ursprungs (unreduzierte Mikrospore, Antherenwand) sein. Folglich waren diese Regenerate nicht eindeutig charakterisierbar. Es musste in einem solchen Fall das Ergebnis eines monogenen Locus betrachtet werden, um eine endgültige Aussage zum Zygotiegrad des Regenerates bzw. der Regenerationslinie zu erhalten.

Da für die Regenerate der Donoren 'Remo' und 'Rene' die Marker *Enp* und *Lap-1* infolge Homozygotie nicht zu nutzen waren, erfolgte aus arbeitstechnischen Gründen zu einem späteren Zeitpunkt der Nachweis der Homozygotie am Locus *Got-(1)* für die Linien, die mittels *Mdh-(3)* nicht charakterisiert werden konnten. Dabei zeigte sich, dass alle Primärembryoide, aus denen die getesteten Regenerate gebildet worden waren, ihren Ursprung in haploiden Mikrosporen hatten.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse für den Homozygotienachweis androgenetischer Regenerate basieren auf den bislang zahlenmäßig umfangreichsten Untersuchungen bei Apfel. Sie sind gut mit Ergebnissen einer belgischen Arbeitsgruppe vergleichbar, die für den Homozygotienachweis von Antherenkulturregeneraten *S*-Allele und Mikrosatelliten als Marker einsetzte (VERDOODT et al. 1998, GEYSEN et al. 2000, KENIS und KEULEMANS 2000). VERDOODT et al. (1998) wiesen bei 29 der 30 geprüften Sprosse Homozygotie nach, während als Ursprung für das heterozygote Regenerat entweder eine unreduzierte Mikrospore oder sporophytisches Antherengewebe vermutet wurde. KENIS und KEULEMANS (2000) fanden bei 25 von 26 Sprossen Homozygotie. Einige Sprosse und androgenetische Kalli, die von GEYSEN et al. (2000) getestet wurden, waren ebenfalls homozygot.

Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass die zur Verfügung stehenden monogenen isoenzymatischen Marker sehr gut für eine frühzeitige Testung einer großen Anzahl androgenetischer Regenerate bei Apfel geeignet sind. Die Untersuchung kann bereits an Komplexen sekundärer Embryoide unter Entnahme kleiner Gewebemengen (5 mg) erfolgen. Es bietet sich damit die Möglichkeit für die Erfassung hinreichend großer Datenumfänge für genetische Studien im Rahmen der Androgenese.

### **Regenerate aus der In-situ-Parthenogenese**

Aufgrund der an den untersuchten Isoenzymloci erhaltenen Bandenmuster wurden sechs der 21 Linien als homozygot charakterisiert. Dieses Ergebnis ist jedoch unter Berücksichtigung der verschiedenartigen Ursprungsmöglichkeiten, die den Regeneraten während der In-situ-Parthenogenese gegeben sind, sowie der im Vergleich dazu geringen Anzahl der angewendeten Marker als vorläufig anzusehen. Die homozygoten Phänotypen der Markerloci können sowohl durch die gewünschte parthenogenetische Entwicklung der Eizelle oder anderer haploider Zellen der Samenanlage als auch durch eine Selbstung hervorgerufen worden sein.

Mit den angewendeten Markern war jedoch die sichere Negativselektion von 15 heterozygoten Linien möglich. Für sechs dieser Linien konnte versehentliche Befruchtung durch Fremdpollen nachgewiesen werden. Für die übrigen neun Linien kann diese Entstehungsvariante ebenfalls nicht ausgeschlossen werden; möglich sind jedoch auch Selbststungen, oder bei einigen anderen auch die Regeneration aus diploidem sporophyischen Gewebe.

VERDOODT et al. (1998) analysierten 15 über In-situ-Parthenogenese erzeugte Sprosse der Donorsorte 'Idared' mit nur einem Marker, dem multiallelen Selbstinkompatibilitätsgen *S*. Elf Sprosse wurden aufgrund ihres homozygoten Phänotyps als homozygot klassifiziert, vier Sprosse waren ungeachtet ihres grünen Erscheinungsbildes aus der Befruchtung der Eizelle mit dem bestrahlten Markerpollen von 'Baskatong' hervorgegangen.

Die spätere Testung von je zehn Sprossen der Donoren 'Idared', 'Elstar' und 'Delbard Jubilé' mittels zehn bzw. elf SSR-Markern (KENIS und KEULEMANS 2000) zeigte hingegen für keinen Spross ausschließlich homozygote Bandenmuster. Die Allelkombinationen verwiesen entweder auf Selbstbefruchtung oder Befruchtung durch den Markerpollen; in manchen Fällen wurden unspezifische Amplifikationsprodukte beobachtet.

Die Ergebnisse von KENIS und KEULEMANS (2000) bekräftigen die Vermutung, dass für eine hinreichend sichere Charakterisierung aller Linien die zur Verfügung stehenden Isoenzymmarker nicht ausreichend waren. Somit erweist sich die Untersuchung der verbliebenen sechs homozygoten Linien durch weitere Marker, wie z. B. Mikrosatelliten, als notwendig. Mit steigender Anzahl sich homozygot zeigender Marker wächst die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Aussage bezüglich des tatsächlichen Zytiegrades der Linien. Die Isoenzyme sind dabei ein Teil der notwendigen bzw. möglichen Marker.

### **2.4.3 Spaltung der Marker bei Antherenkulturlinien**

Abweichende Spaltungsverhältnisse bei Nutzung verschiedener Markertypen sind häufig für androgenetische Populationen beschrieben worden; eine Zusammenstellung geben FOISETT und DELOURME (1996). Auf der Grundlage von Vergleichen der Markerspaltung androgenetischer Populationen mit Spaltungsergebnissen, die in alternativ mittels der *Hordeum-bulbosum*-Technik erzeugten DH-Linien (POWELL et al. 1990, SCHÖN et al. 1990, KJAER et al. 1991, KLEINHOFs et al. 1993) sowie F<sub>2</sub>-Populationen, Rückkreuzungen und Einkornramschen (GRANER et al. 1991, THOMPSON et al. 1991, BENTOLILA et al. 1992,

FOISSET et al. 1993, MURIGNEUX et al. 1993a) erhalten worden sind, wird als eine mögliche Ursache die Wirkung von Selektion während der In-vitro-Androgenese angenommen. In den androgenetischen DH-Linien bzw. deren Nachkommenschaften waren nicht nur die meisten abweichenden Spaltungsverhältnisse festgestellt worden, sondern es hatte sich auch gezeigt, dass diese spezifisch für dieses Pflanzenmaterial waren.

Während der gametischen In-vitro-Selektion kann der Markerlocus entweder mit Majorgenen, die das Verhalten bei der Antherenkultur beeinflussen, oder mit Letalfaktoren gekoppelt sein (HAYWARD et al. 1990). So vermuteten HENRY et al. (1993) bei Weizen, dass das bevorzugte Vorkommen des translocierten Chromosoms 1BL-1RS in Verbindung mit Majorgenen steht, welche auf dem 1RS-Arm liegen und die Regeneration stimulieren. Demgegenüber charakterisierten DUFOUR et al. (2001) anhand gestörter Spaltungsverhältnisse von AFLP-Markern, die in verschiedenen Entwicklungsstadien der Mikrosporenenembryogenese bei Mais beobachtet wurden, sieben partielle androgenetische Letalfaktoren als mögliche selektiv wirkende Gene.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Spaltungsanalysen hatten für die Linien von 'Rene' für *Got-(1)* und Pi-A-5,164 für *Mdh-(3)* sowie für die Summe aller geprüften Linien an den Loci *Got-(1)* und *Mdh-(3)* signifikante Abweichungen vom erwarteten 1:1-Spaltungsverhältnis ergeben. Aus dem für *Got-(1)* gestörten Gesamtspaltungsverhältnis sollten jedoch keine verallgemeinernden Schlussfolgerungen gezogen werden, da nur zwei Donoren betrachtet wurden und die 'Remo'-Linien eine deutliche zahlenmäßige Überlegenheit aufwiesen. Das hochsignifikante Gesamtspaltungsergebnis hingegen, welches für *Mdh-(3)* erhalten wurde, ist auf die Signifikanz der für Pi-A-5,164 erzielten Spaltung und die Tendenz zur Bevorteilung des [b]-Phänotyps bei 'Remo' und Pi-A-24,45 zurückzuführen. Von diesen drei Donoren waren Linien, deren Probematerial sich zu einem großen Teil aus sekundären Embryoiden, Adventivknospen und unmittelbar regenerierten Sprossen zusammensetzte, untersucht worden. Einen beträchtlichen Anteil bildeten dabei Linien, die teilweise nach der Regeneration oder während der Mikrovermehrung abstarben (pers. Mitt. HÖFER 1999). Das Untersuchungsmaterial der Linien von 'Rene', das eine nahezu gleichmäßige Verteilung aufwies, bestand hingegen fast vollständig aus In-vitro-Vermehrungssprossen. Eine Testung der Phänotypenverteilung am Locus *Mdh-(3)* für Linien, die sich in stabiler In-vitro-Vermehrung befanden oder schon bewurzelt bzw. veredelt worden waren, zeigte eine gleichmäßige Phänotypenverteilung (HÖFER und GRAFE 2000). Daraus kann geschlossen werden, dass während der Regeneration der Phänotyp [b] bevorteilt ist; die

Bevorteilung jedoch durch eine offensichtlich geringere Überlebensrate dieser Linien später wieder ausgeglichen wird. Das gestörte Spaltungsverhältnis kann somit Ausdruck einer Korrelation des Markers *Mdh-(3)* und einer spezifischen Phase der In-vitro-Androgenese sein.

Gestörte Spaltungsverhältnisse in Markern, die für die Charakterisierung der Regenerate eingesetzt werden, haben zunächst keinen direkten Einfluss auf die Nutzung der homozygoten Regeneratpflanzen in der praktischen Züchtung. Sie können jedoch dann von Bedeutung sein, wenn der betreffende gestörte Marker mit dem Marker eines wichtigen agronomischen Merkmals oder dem Gen selbst, das für dieses Merkmal kodiert, gekoppelt ist. Für Apfel sind einige enge Kopplungen zwischen Isoenzymen und agronomisch bedeutsamen Merkmalen bekannt. So liegen Kopplungen zwischen dem Gen *GOT-1*, das jedoch höchstwahrscheinlich nicht dem in dieser Arbeit beschriebenen Gen *Got-(1)* entspricht (vgl. Kap. 2.4.1.1, S. 60), und dem Selbstinkompatibilitätslocus *S* (MANGANARIS und ALSTON 1987), zwischen dem Gen *Pgm-1*, welches für ein Isoenzym der Phosphoglucomutase kodiert, und dem Schorf-resistenzgen *V<sub>f</sub>* (MANGANARIS et al. 1994) sowie zwischen dem Isoenzym *Lap-2* und dem Mehлтаuresistenzgen *Pl<sub>w</sub>* (BATTLE und ALSTON 1996) vor. Außerdem ist eine enge Kopplung zwischen *Enp* und einem rezessiven Letalfaktor *l* beschrieben worden, welcher sich in mangelndem Chlorophyllgehalt und schwachem Wurzelwachstum bei Sämlingen zeigt und deren baldiges Absterben bewirkt (MANGANARIS und ALSTON 1988b). Ob agronomisch wichtige Merkmale ebenso wie einige hier geprüfte Markerloci von einer Gametenselektion während der In-vitro-Androgenese betroffen sind, kann erst der spätere Einsatz der homozygoten Pflanzen im Zuchtprozess zeigen.

#### **2.4.4 Gametoklonale Variation in Antherenkulturregeneraten**

Zur Beschreibung der genetischen Variabilität, die oft in Regeneraten von Zell- und Gewebekulturen beobachtet werden kann, prägten LARKIN und SCOWCROFT (1981) den Begriff "somaklonale Variation". Infolge der Notwendigkeit, zwischen somatischen und gametischen Geweben zu unterscheiden, fassten EVANS et al. (1984) genetische Variabilität, die bei der In-vitro-Kultivierung von Mikro- oder Megasporen entstehen kann, als "gametoklonale Variation" zusammen, während "somaklonale Variation" auf somatisches Ausgangsgewebe bezogen wurde.

Gametoklonale Variation kann sowohl vorteil- als auch nachteilhaft für die Verbesserung der Pflanzen sein. Um brauchbare homozygote Linien über androgenetische In-vitro-Kulturen zu erhalten, ist es einerseits notwendig, dass die genetische Stabilität der Linien erhalten bleibt.

Andererseits wird gametoklonale Variation auch als Quelle genetischer Variation angesehen (EVANS und SHARP 1986), wobei ein Vorteil darin besteht, dass nur ein oder einige wenige Merkmale im Genom geändert werden, was durch konventionelle Zuchtmethoden oft nicht erreicht werden kann. Jedoch hat sich in der Praxis gezeigt, dass nur in seltenen Fällen agronomisch wertvolle Variationen in In-vitro-Kulturen erzeugt worden sind, die Pflanzen stattdessen eine Reihe unerwünschter genetischer Veränderungen zeigten (VASIL 1988). Um gametoklonale Variation zu verhindern oder nutzen zu können, ist es wichtig, den Grad der Instabilität zu kontrollieren (KARP 1989) sowie ihre Natur und die möglichen Mechanismen ihrer Entstehung zu kennen (KARP und BRIGHT 1985).

Gametoklonale Variationen, die sich beispielsweise in Veränderungen in Morphologie und Wachstum (STOER und ZSUFFA 1990, CHLYAH et al. 1990), Ertragsfaktoren (MORDEN et al. 1989, ROTINO et al. 1991), Resistenzverhalten (PICARD et al. 1990), Fertilität (SREE RAMULU 1982), Inhaltsstoffen (HEROUART et al. 1988) oder Isoenzym- und DNA-Bandenmustern (BUI DANG HA und PERNES 1982, MURIGNEUX et al. 1993b, BOHANEK et al. 1995) zeigten, wurden in vielen Pflanzenarten beobachtet. Sie können auf Veränderungen in Chromosomenzahl und -struktur, auf Änderungen im Kerngenom auf molekularer Ebene sowie im Zytoplasma und auf epigenetischen Veränderungen basieren. Eine umfassende Übersicht zum Auftreten entsprechender Variationen bei verschiedensten Pflanzenarten ist in LOGUE (1996) zu finden. Als Ursprung der in den Gewebekulturen beobachteten genetischen Veränderungen spielen sowohl Veränderungen, die schon vor Etablierung der Gewebekulturen im Donorgewebe existierten als auch Veränderungen, die während des Gewebekulturprozesses selbst induziert wurden, eine Rolle (EVANS et al. 1984, MORRISON und EVANS 1987). In beiden Fällen können Veränderungen in Form von Mutationen auftreten, jedoch gelten die Bedingungen, die während der Gewebekultur herrschen, als besonders mutationsbegünstigend. Eine relativ kurze Gewebekulturphase, in der die Regeneration oft über eine direkte Embryoidbildung erfolgt, ist häufig verbunden mit wenigen Variationen (FINNIE et al. 1991, MURIGNEUX et al. 1993b). Demgegenüber zeigen Regenerate, die aus primären Kallusgewebe entstanden sind, häufiger gametoklonale Variationen (CHEN und CHEN 1980, KUDIRKA et al. 1983).

Obwohl die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Regenerate ohne Kallusphase gebildet worden sind, zeigte ein beträchtlicher Teil der Linien innerhalb ihrer Regenerate an mindestens einem der geprüften Loci Variationen. DE PAEPE et al. (1981) beobachteten in DH-Populationen von *Nicotiana glauca*, die ebenfalls über direkte Embryogenese entstanden waren, eine starke Variabilität in Blattmorphologie und Wuchsstärke. Ähnliche

Berichte liegen über somaklonale Variationen in Regeneraten, die über somatische Embryogenese und kultivierte Meristeme erhalten worden sind, vor (ULLRICH et al. 1991, BAILLIE et al. 1992).

Hinsichtlich des Erscheinungsbildes der beobachteten gametoklonalen Variationen standen weniger unerwartete Phänotypen zahlenmäßig im Vordergrund, sondern vielmehr das gleichzeitige Auftreten verschiedener Phänotypen innerhalb einer Regenerationslinie. Da alle Regenerate einer Linie ihren Ursprung in einem einzelnen Primärembryoid haben, dessen Genotyp und Phänotyp genau definiert ist, kann zumindest für die inhomogenen Linien ausgeschlossen werden, dass die Variationen schon vor der In-vitro-Kultivierung der Antheren entstanden sind. Die Möglichkeit der Entstehung von Regeneraten mit unterschiedlichen Phänotypen pro Locus ergab sich aus dem Charakter und dem Verlauf der Regeneration (HÖFER 1995, 1997). Demnach kann das verändernde Ereignis einerseits bereits in einer einzelnen, sich zu einem sekundären Embryoid entwickelnden Zelle des Primärembryoids hervorgerufen worden sein, während andere sich ebenfalls weiterentwickelnde Zellen unverändert geblieben sind. Andererseits können die Veränderungen aber auch erst in Komplexen sekundärer Embryoide stattgefunden haben.

Aus den Variationen der monogenen Marker *Enp* und *Lap-1* können Rückschlüsse auf die Zeit der Entstehung im Hinblick auf die spontane Di- bzw. Polyploidisierung gezogen werden. Unerwartete homozygote Muster bzw. unterschiedliche homozygote Regenerate innerhalb einer Linie verweisen auf die Entstehung vor diesem Ereignis; die unerwartet heterozygoten Phänotypen sind in bereits di- bzw. polyhaploiden Zellen gebildet worden.

Zu den Faktoren, die die Stabilität von Mikrosporen- und Antherenkulturen während der In-vitro-Phase beeinflussen können, zählen neben dem Genotyp (FOROUGH-WEHR und FRIEDT 1984, FINNIE et al. 1989, LOGUE et al. 1993), dem Alter der Antheren (HU und HUANG 1987, XU 1990), der Länge der Kulturdauer (TING und GU 1990, FINNIE et al. 1991), dem Ploidiegrad der Donoren (SNAPE et al. 1988, KARP 1989) und der Colchizinbehandlung (FRANCIS und JONES 1989) mögliche mutagene Effekte bestimmter Substanzen der Nährmedien. Als Hauptauslöser von somaklonalen und gametoklonalen Variationen gelten dabei Hormone, die sich in unterschiedlichen Konzentrationen und Verhältnissen zueinander in den Medien befinden (JAIN et al. 1998, OLHOFT und PHILLIPS 1999); aber auch Nukleotiden und ihren Abkömmlingen wie Thymidin und Adeninsulfat wird eine mutagene Wirkung zugeschrieben (MORRISON und EVANS 1987). So beobachtete beispielsweise CHEN (1986), dass das Auxin 2,4-D einen Einfluss auf die Chromosomenstabilität in Antheren-

kulturen bei Reis ausübte; Thymidin und Adeninsulfat wurden als Auslöser der Variation in DH-Pflanzen bei Tabak, die über Antherenkultur regeneriert worden waren, vermutet (BROWN und WERNSMAN 1982). Für die Embryoidinduktion des hier getesteten Pflanzenmaterials sind Nährmedien, die ebenfalls 2,4-D und Adeninsulfat enthielten, genutzt worden (HÖFER 1995, 1997).

WALBOT und CULLIS (1983, 1985) diskutierten als auslösende Ursache genetischer Variabilität Stressfaktoren. Sie vermuteten, dass sich das Pflanzengenom mit Veränderungen seiner DNA in bestimmten Regionen, die phänotypische Effekte haben können, an die neuen Bedingungen anpasst, wenn die normalen physiologischen Antworten auf umweltbedingten Stress erschöpft sind. Gerade für die häufigen Variationen des Markers *Mdh-(3)* könnte dieser Aspekt eine mögliche Erklärung geben. Für naturgemäß hochgradig heterozygote Apfelpflanzen bedeutet Homozygotie, die zudem unter den unnatürlichen Bedingungen der In-vitro-Kultur hervorgerufen wurde, eine Stressbelastung. Die Rückkehr zum heterozygoten Phänotyp in einigen wenigen, aber möglicherweise wichtigen Regionen könnte die Überlebenschance der Regenerate verbessert haben. Die Tatsache, dass die Untersuchungen von Regeneraten, die das eigentliche Regenerationsstadium überlebt hatten und sich bereits in der Vermehrungsphase befanden, nicht mehr den ursprünglichen Phänotypenüberschuss von *MDH-(3)-[b]* zeigten (HÖFER und GRAFE 2000, vgl. Kap. 2.3.3), unterstützt diese Vermutung. Andererseits könnten die im Vergleich zu den beiden monogenen Markern öfter am digenen Marker *Mdh-(3)* vorkommenden Variationen auch nur eine Folge des duplizierten Locus sein, der die Chance einer phänotypisch sichtbaren Veränderung verdoppelt.

Gametoklonale Variationen, die an Isoenzymmarkern auftreten, sind – solange sie keinen Einfluss auf ein wichtiges agronomisches Merkmal haben – für den Züchter unbedeutend. Die hier beschriebenen Variationen dieser Marker sind jedoch ein Hinweis darauf, dass möglicherweise auch einige für die Obstzucht wichtige Merkmale von Variationen betroffen sein könnten, die während oder kurz nach der Gewebekultur nicht sichtbar bzw. erfassbar sind. Unabhängig davon, ob gametoklonale Variation in der Apfelmehrung genutzt werden kann oder ob sie vermieden werden soll, – wofür bislang keine Erfahrungen vorliegen – ist es wichtig, ihr Auftreten kontrollieren zu können. Als erster Schritt dazu wäre eine Analyse der Gewebekulturphase hinsichtlich der Nährmedienbestandteile (2,4-D, Adeninsulfat), der Dauer und dem Charakter der Regeneration sowie des Ploidiegrades der einzelnen Linien im Hinblick auf die Häufigkeit des Vorkommens inhomogener Linien bzw. unerwarteter Phänotypen denkbar.

## 2.5 Zusammenfassung

Für die Suche nach Markern, die eine Charakterisierung von Regeneratpflanzen aus der Haploidentechnik ermöglichen sollten, sind zunächst acht Kreuzungsnachkommenschaften auf spaltende Isoenzyme untersucht worden. In 14 betrachteten Enzymsystemen konnten zehn ungekoppelt vorliegende Loci ermittelt werden. Nachfolgende Untersuchungen zur gewebe-spezifischen Expression und zur Stabilität dieser Loci lieferten Erkenntnisse über die Anwendbarkeit in Bezug auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Regenerate sowie die Art des zu entnehmenden Gewebes.

Unter Berücksichtigung teilweiser Einschränkungen in Aussagekraft und Anwendung standen pro Donorgenotyp ein bis sechs Marker für die Charakterisierung der Regenerate zur Verfügung.

Die Untersuchungen bestätigten für 125 der 136 geprüften Antherenkulturlinien Homozygotie. Elf Linien konnten nicht charakterisiert werden. Hinsichtlich der untersuchten Regenerate erwiesen sich 89,8 % als homozygot, für 10,2 % war keine Zuordnung möglich. Alle drei mittels Mikrosporenkultur erzeugte Linien konnten als homozygot klassifiziert werden. Mit Bezug auf die einzelnen Regenerate waren 68,5 % homozygot, für 31,5 % war keine eindeutige Aussage möglich. Von den 21 Regenerationslinien aus der In-situ-Parthenogenese können sechs als vorläufig homozygot betrachtet werden. Anhand der Ergebnisse wird auf die Eignung und die Anzahl der notwendigen Marker eingegangen.

Die Prüfung der Aufspaltung von vier Markern in Antherenkulturlinien ergab für zwei einzelne Marker  $\times$  Donor-Kombinationen sowie für zwei Marker in der Gesamtheit der untersuchten Donoren signifikante Abweichungen vom erwarteten 1:1-Spaltungsverhältnis. Weiterhin wurden in 40 von 112 Antherenkulturlinien gametoklonale Variationen beobachtet, die sich im Auftreten der beiden möglichen Phänotypenklassen, aber auch in unerwarteten Phänotypen am betrachteten Locus äußerten. Ursachen gestörter Spaltungsverhältnisse und gametoklonaler Variation sowie die Auswirkungen auf einen späteren Einsatz der Regenerate in der praktischen Züchtung werden diskutiert.

## **Kapitel 3**

# **Biochemische Charakterisierung und Beeinflussung der Regeneration an somatischen Geweben**

### **3.1 Einleitung**

In den letzten Jahren ist eine bedeutende Anzahl Publikationen zur In-vitro-Regeneration über Organogenese und/oder somatische Embryogenese an unterschiedlichen somatischen Geweben bei Apfel erschienen (u. a. SWARTZ et al. 1990, HANKE et al. 1991, KORBAN und CHEN 1992, WELANDER und MAHESWARAN 1992, DURHAM und KORBAN 1994, GERCHEVA et al. 1994, KEULEMANS und DE WITTE 1994, KOLOVA und STOYANOV 1994, YEPES und ALDWINCKLE 1994, LIU et al. 1998, DIEKMANN et al. 1999). Dabei wurde nicht nur ein breites Spektrum züchterisch wertvoller Apfelgenotypen betrachtet, sondern die Untersuchungen waren auch auf solche regenerationsbeeinflussende Faktoren wie Art, Alter, Vorbehandlung und Ausrichtung der Explantate, physikalische Kultivierungsbedingungen oder Art und Konzentration bestimmter Nährmedienbestandteile gerichtet. Trotz der Fortschritte, die dabei in der Regeneration des als schwierig geltenden Apfels erzielt wurden, treten noch immer Probleme, auf, die sich gerade in der weiterführenden biotechnologischen Nutzung als nachteilig erweisen.

Obwohl unter Anwendung verschiedener Regenerationssysteme in einer Reihe obstbaulich bedeutender Genotypen morphogenetische Prozesse induziert werden konnten, zeigen sich deutliche Unterschiede in deren Regenerationsfähigkeit (JAMES et al. 1984, WELANDER 1988, JAMES et al. 1988, KORBAN et al. 1992, HUANCARUNA PERALES und SCHIEDER 1993, HANKE 1994, DIEKMANN et al. 1999). Darüber hinaus ist der zahlenmäßige Umfang der in den Transformationsexperimenten gebildeten Sprosse im Vergleich zur Regeneration auf Medien, welche kein selektives Agens beinhalten, relativ gering; die Genotypabhängigkeit der Regeneration kommt dabei zusätzlich zum Tragen (HANKE 1999, DOLGOV et al. 2000). Eine ebenfalls geringere Regenerationsfähigkeit ist beobachtet worden, wenn Explantate zur Testung der Kombination In-vitro-Regeneration und In-vitro-Mutagenese (PREDIERI und FASOLO FABRI MALAVASI 1989) bzw. zur gezielten Auslösung von mutagenen Effekten (SCHUM et al. 1999) mit ionisierender Strahlung behandelt wurden.

Seit längerem ist bekannt, dass für die Auslösung verschiedener Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse das Auxin/Cytokinin-Verhältnis eine entscheidende Rolle spielt (REINERT und BAJAJ 1977). Während hohe Auxin/Cytokinin-Verhältnisse gewöhnlich Wurzelbildungen induzieren, fördern niedrige Auxin/Cytokinin-Verhältnisse Sprossbildungen. Mittlere Auxin/Cytokinin-Verhältnisse hingegen begünstigen eine unorganisierte zelluläre Proliferation in Form der Kallusbildung. Über die Mechanismen, mit denen die Auxin/Cytokinin-Verhältnisse diese Prozesse beeinflussen, ist jedoch wenig bekannt. Ungeklärt sind daher auch die Ursachen, die die große Variabilität in der Regenerationsfähigkeit zwischen Pflanzenarten, Genotypen und Gewebearten hervorrufen. Die entwickelten Regenerationsprotokolle basieren somit größtenteils auf Erfahrungswerten. Doch die empirische Bestimmung von In-vitro-Kultivierungsbedingungen, die eine Morphogenese erlauben, ist zeit- und kostspielig. Alternativ könnte ein besseres Verständnis der Prozesse, die eine pflanzliche Regeneration auslösen und kontrollieren, zu einer rationelleren Lösung von Regenerationsproblemen führen. Einen ersten Schritt in diese Richtung stellen biochemische und molekulare Vergleiche zwischen regenerationsfähigen und nicht regenerationsfähigen Zellen bzw. Geweben dar. Auf Grundlage dieser Vergleiche können Marker entwickelt werden, die mit der Kompetenz zur Regeneration korrelieren. Mit ihrer Hilfe können früher Aussagen über die regenerativen Eigenschaften der Kulturen getroffen und damit gezielt empirisch erarbeitete Kultursysteme verbessert werden. Ebenso könnten Mechanismen, die der Differenzierung zugrunde liegen, identifiziert werden.

In einigen Regenerationssystemen krautiger Pflanzen ist die erfolgreiche Entwicklung und Anwendung derartiger Marker bereits gezeigt worden. So führte der Vergleich embryogener und nicht embryogener Kalluskulturen bei der Erbse zur Identifizierung eines Proteins, das mit sehr frühen Stadien der somatischen Embryogenese korreliert ist. Monoklonale Antikörper, die gegen dieses Protein gerichtet sind, erlauben einen schnellen und sensitiven Nachweis auch in wenigen Zellen (STIRN und JACOBSEN 1990, ALTHERR et al. 1993). Mit Hilfe des Antikörpers konnte aus verschiedenen Protoplastenfraktionen eine Fraktion mit deutlich höherem Regenerationspotential ausgelesen werden (KOONEN und JACOBSEN 1992). In vergleichbaren RNA-Untersuchungen bei Mais wurde ein frühes embryo-spezifisches Gen gefunden, das nur in embryogenen Suspensionen exprimiert wird (BELLMANN und WERR 1992). ABE und FUTSUHARA (1989) selektierten bei Reis höher regenerative Kalli und beschrieben Änderungen im PRX-Isoenzymmuster, die mit dem endogenen Auxingehalt der Kulturen korrelierten und somit die Fähigkeit zur Sprossbildung erhöhten.

In Untersuchungen von GRAFE und WRICKE (1998) konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Phosphataseinhibitoren zum Nährmedium die Sprossregeneration von Blattexplantaten bei Apfel deutlich erhöhte. Solche Untersuchungen sind geeignet, die molekularbiologischen Ursachen für eine hohe In-vitro-Regeneration zu verstehen und damit praktisch nutzbar zu machen.

Im nachfolgenden Kapitel soll die Regeneration an somatischem Gewebe von Apfel am Beispiel von Primärexplantaten und subkultivierten Kalluskulturen im Hinblick auf die Entwicklung von möglichen Markern und deren Anwendung für die Verbesserung der Regenerationsleistungen untersucht werden. Aufgrund der relativ einfachen und kostengünstigen Untersuchungsmöglichkeiten (MOORE und DURHAM 1992) sowie der häufigen Anwendung zur Beschreibung von In-vitro-Differenzierungsprozessen (u. a. SWARNAKAR et al. 1986, COPPENS und GILLIS 1987, CHIBBAR et al. 1988, IQBAL et al. 1989, RAO et al. 1989) erfolgte die Charakterisierung der Regeneration mittels Isoenzymen.

## **3.2 Material und Methoden**

### **3.2.1 Pflanzliches Material und In-vitro-Kultur**

#### **Donorpflanzenmaterial**

Als Donormaterial für die Explantat- und Kalluskulturen dienten In-vitro-Sprosse der Kulturapfelsorten 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious', 'Pinova', 'Reka', 'Remo' und 'Retina' sowie der Wildart *Malus robusta* 'Persicifolia'. Die Kultivierung der In-vitro-Sprosse erfolgte auf zwei verschiedenen Sprossvermehrungsmedien in Erlenmeyerkolben, die mit Aluminiumfolie verschlossen waren. Für die Genotypen 'Elstar', 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* wurde das Medium S1 verwendet, während für 'Gala', 'Reka', 'Remo' und 'Retina' Medium S2 zum Einsatz kam.

Beide Medien setzten sich aus Makro- und Mikronährsalzen nach MURASHIGE und SKOOG (1962), 2,2 µM BAP, 1 µM IBA, 1,4 µM GA<sub>3</sub> und 1,1 % Agar zusammen. Die Unterschiede bestanden im Vitamingehalt und in der Art der Kohlenstoffquelle. Während S2 alle Vitamine nach MURASHIGE und SKOOG (1962) und 3 % (w/v) Sorbitol beinhaltete, enthielt S1 als Vitamine nur 1,2 µM Thiamin und 0,5 mM Inositol sowie 3 % Saccharose (w/v). Der pH-Wert beider Medien wurde vor dem Autoklavieren auf 5,7 eingestellt.

Die Kultivierung der Sprosse erfolgte bei 23 °C und einem Tag/Nacht-Wechsel von 16/8 h. Die Beleuchtungsstärke betrug 5000 lx. Eine Subkultur dauerte vier Wochen.

### **Explantat- und Kalluskulturen**

Die Gewinnung der Explantate für die Etablierung der Primärexplantat- sowie der Kalluskulturen erfolgte drei Wochen nach dem letzten Umsetzen der In-vitro-Sprosse. Als Explantatarten wurden etwa 4 × 4 mm große Blattquadrate verwendet, die von den vier jüngsten voll entfalteten Blättern gewonnen wurden, sowie 1 mm lange Stücke der beiden jüngsten Internodien. Die Versuche zur Adventivsprossbildung am Primärexplantat erfolgten ausschließlich mit Blattexplantaten, während für die Herstellung der Kalluslinien in Abhängigkeit vom jeweiligen Versuch beide Explantatarten Verwendung fanden.

In Versuchen, in denen die Adventivsprossbildung am Primärexplantat im Mittelpunkt stand, wurden die mit der oberen Epidermis auf das entsprechende Medium gelegten Blattquadrate bei 23 °C zunächst zwei Wochen völliger Dunkelheit und anschließend für die weitere Dauer des jeweiligen Versuches dem oben beschriebenen Tag/Nacht-Wechsel ausgesetzt.

Explantate, an denen eine Kallusbildung induziert werden sollte, wurden vier Wochen lang bei 24-stündiger Dunkelheit und ebenfalls 23 °C kultiviert. Danach wurden die Kalli abgetrennt und auf frischem Medium der gleichen Zusammensetzung nochmals vier Wochen zur weiteren Kallusproliferation im Dunkeln belassen. Beginnend mit einer nochmaligen Medienerneuerung erfolgte die Kultivierung innerhalb des eigentlichen Beobachtungszeitraumes im 16/8-stündigen Tag/Nacht-Wechsel unter den beschriebenen Temperaturbedingungen.

Als Kulturgefäße für die Primärexplantate und für die Kalluskulturen dienten mit Aluminiumfolie verschlossene Glasröhrchen (Länge 95 cm, Ø 27 mm), die während der Gelierung des Nährmediums zur Vergrößerung der Medienoberfläche schräg standen.

Auf die Zusammensetzung der für die Explantat- und Kalluskulturen verwendeten Nährmedien wird in der Beschreibung der jeweiligen Versuche eingegangen.

### **3.2.2 Isoenzymmuster in Regenerationssystemen**

#### **Regenerationssysteme**

Die Eignung von Isoenzymen als Marker für Regenerationsvorgänge wurde an Blatt- und Internodienkalluslinien der Genotypen 'Pinova' und *M. robusta* sowie an Primärexplantaten von 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* untersucht.

Die Kultivierung der vier Varianten Kallusart  $\times$  Genotyp erfolgte 16 Wochen lang (ohne Kallusinduktions- und Kallusproliferationsphase) auf den Regenerationsmedien R1, R2, und R3. Für die Primärexplantate kamen die Medien R3 und R4 zum Einsatz. Der Kultivierungszeitraum der Primärexplantate betrug gerechnet vom Aufsetzen an 22 Wochen. Die Medien, auf denen in unterschiedlichem Maße Regenerationsvorgänge ausgelöst werden sollten, unterschieden sich, wie in Tab. 3.1 ersichtlich, hauptsächlich in der Hormonzusammensetzung sowie teilweise im Gehalt an Makro- und Mikronährsalzen. Der pH-Wert aller Medien betrug 5,7 vor dem Autoklavieren.

**Tab. 3.1:** Zusammensetzung der Regenerationsmedien für die Explantat- und Kalluskulturen.

Substanz bzw. Substanzgruppe	R1 (Kallus)	R2 (Kallus)	R3 (Kallus und Explantate)	R4 (Explantate)
Makro- und Mikronährsalze	MS	MS	MS	FeNa-EDTA •2H <sub>2</sub> O: 1 $\times$ MS, übrige Salze: 0,5 $\times$ MS
Vitamine	MS	MS	MS	MS
BAP	-	-	4,4 $\mu$ M	-
IBA	0,5 $\mu$ M	-	-	0,5 $\mu$ M
NAA	-	1,1 $\mu$ M	2,7 $\mu$ M	-
TDZ	0,9 $\mu$ M	2,25 $\mu$ M	-	0,9 $\mu$ M
Saccharose	3 %	3 %	3 %	3 %
Agar	0,9 %	0,9 %	0,9 %	0,9 %

Die Bonituren zur Merkmalerfassung (s. Kap. 3.2.7, S. 90) erfolgten regelmäßig mit dem Ende festgelegter Kultivierungsphasen. Die Gesamtkulturdauer der Kalluskulturen wurde in die Kultivierungsphasen 0-4., 5.-8., 9.-12. und 13.-16. Woche untergliedert, während für die Primärexplantate die Kultivierungsphasen 0.-6., 7.-10., 11.-14., 15.-18. und 19.-22. Woche gewählt wurden.

### Isoenzymanalysen

Während der Bonituren wurden je nach Verfügbarkeit des Materials ein bis zehn regenerierende sowie nicht regenerierende Kallusteile bzw. Primärexplantate als Probenmaterial für die Isoenzymanalysen entnommen. Die Homogenisation der Kalli und der Primärexplantate wurde in Eppendorf-Tubs unter Zusatz von PVP-40 und des Extraktionspuffers im Verhältnis

200 mg Kallus/100 mg PVP-40/1 ml Puffer vorgenommen. Die Zusammensetzung des Puffers sowie die weitere Verfahrensweise in der Extrakterstellung sind in Kap. 2.2.1.1, S. 6 beschrieben.

Analysiert wurden die Enzyme Alkohol-Dehydrogenase (ADH, E.C.-Nr. 1.1.1.1), ACP, DIA, EST, MDH und PRX. Die Auftrennung und die Färbung der Enzyme ACP, DIA, EST, MDH und PRX erfolgte nach den ebenfalls in Kap. 2.2.1.1 dargestellten Methoden. Die ADH wurde in gleicher Weise mittels IEF unter Verwendung von Gelen mit einem 59 %igen Anteil Servalyt pH 3-10 und einem 41 %igen Anteil Servalyt pH 4-7 (bezogen auf die Gesamtservalytkonzentration) aufgetrennt und anschließend 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur in folgender Lösung gefärbt (mod., pers. Mitt. CHEVREAU und GALLET 1992):

20 ml	0,2 M Tris / HCl pH 8,0
15 mg	NAD
2 ml	NBT (1 %ig)
0,2 ml	PMS (1 %ig)
2 ml	Ethanol (96 %ig), kurz vor der Inkubation zugeben

Nach der Färbung erfolgte eine zehnmünütige Fixierung in der für IEF-Gele vorgesehenen Lösung. (vgl. Kap. 2.2.1.1, S. 12).

### 3.2.3 ACP-Muster und Regenerationsfähigkeit

Mit den nachfolgend beschriebenen drei Experimenten sollte der vermutete Zusammenhang zwischen den Merkmalen Intensität der Banden 4 und 5 der ACP-Muster und der Regenerationsfähigkeit (s. Kap. 3.3.1) überprüft werden.

#### Experiment 1

In diesem Experiment sind die Regenerationsleistungen verschiedener Kultivierungsvarianten von Primärexplantaten mit der Häufigkeit des Auftretens der unterschiedlichen Intensitätstypen an den Bandenpositionen 4 und 5 verglichen worden. Als Donorgenotypen kamen 'Golden Delicious' und 'Pinova' zum Einsatz, deren Explantate auf den Medien R3 und R4 unterschiedlich lange mit bzw. ohne Umsetzen kultiviert wurden.

Pro Variante (Medium × Genotyp) wurden 60 Explantate aufgesetzt. Nach sechs Wochen Kultivierungszeit erfolgte an den ersten 20 Explantaten die Datenerfassung bezüglich der Regenerationsleistungen sowie die Untersuchung der ACP-Muster. Gleichzeitig wurden

weitere 20 Explantate auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung überführt. Die restlichen 20 Explantate verblieben auf ihrem alten Medium. Für die beiden letztgenannten Explantatgruppen wurden die zwischen der siebenten und zehnten Woche erbrachten Regenerationsleistungen bonitiert und die Explantate anschließend der ACP-Untersuchung unterzogen.

### **Experiment 2**

Dieses Experiment ist in zweifacher Wiederholung mit Primärexplantaten von 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* durchgeführt worden. Ziel war neben dem wiederholten Vergleich der Regenerationsleistungen mit der Häufigkeit der Bandenmustertypen innerhalb einer Variante die Darstellung des unmittelbaren Zusammenhanges zwischen Regenerationsfähigkeit und ACP-Muster bei Betrachtung jedes einzelnen Explantats.

Die Kultivierung erfolgte über zwei bzw. vier Wochen wiederum auf den Medien R3 und R4. Der Stichprobenumfang pro Variante (Genotyp × Medium × Kultivierungsdauer) betrug 45 bis 51 Explantate. Am Ende der jeweiligen Kultivierungszeit wurden die Regenerationsleistungen erfasst und die ACP-Muster der einzelnen Explantate analysiert.

### **Experiment 3**

Anhand dieses dritten Experiments sollte geklärt werden, inwieweit das Erscheinungsbild der Banden ACP-4 und ACP-5 mit der Regenerationsfähigkeit subkultivierter Kalluslinien korreliert.

Von den Genotypen 'Pinova' und *M. robusta* wurden auf Medium R1 je 30 Blatt- und Internodienkalli sowie auf Medium R3 30 Blattkalli angezogen. Nach vier Wochen Regenerationszeit wurden die Kalli bonitiert und anschließend ihre ACP-Muster untersucht. Dabei wurden die ersten 15 Kalli vollständig für die Isoenzymanalyse verarbeitet.

Von der zweiten Hälfte der Kalli wurden jeweils drei, wenn möglich unterschiedliche, nach optisch sichtbaren Gewebeunterschieden ausgewählte Teilstücke extrahiert. Dabei wurden von regenerierenden Gesamtkalli stets regenerierende sowie nicht regenerierende Regionen selektiert.

### 3.2.4 Einfluss von Phosphataseinhibitoren

#### 3.2.4.1 Natriumfluorid und Natriumvanadat

##### Experiment 1

Das Experiment wurde mit Primärexplantaten der Genotypen 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious', 'Pinova', 'Reka', 'Remo', 'Retina', und *M. robusta* durchgeführt, um die Wirkung der Phosphataseinhibitoren Natriumfluorid (NaF) und Natriumvanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) auf die Adventivsprossbildung zu testen.

Je eine der beiden Substanzen wurde dem Medium R4 in den Konzentrationen 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 25, 50, 75 und 100  $\mu\text{M}$  zugegeben. Dementsprechend erhielten die Medien die Bezeichnungen F0,5 bis F100 sowie V0,5 bis V100. Als Kontrolle diente R4 ohne Inhibitorzusatz.

Zu zwei verschiedenen Zeitpunkten wurden auf allen Medien einschließlich der Kontrolle je 40 bzw. 20 Explantate aller Genotypen getestet. Da zu dem späteren Zeitpunkt nur 20 Explantate untersucht worden waren, wurden die 40 zuerst aufgesetzten Explantate in zwei Gruppen mit je 20 Explantaten geteilt. Damit bestand das Experiment aus drei Wiederholungen pro Inhibitorbehandlung und Genotyp. Die Bonitur erfolgte nach sechswöchiger Kulturdauer.

##### Experiment 2

Der längerfristige Einfluss verschiedener Konzentrationen der Inhibitoren NaF und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  auf die Adventivsprossbildung wurde an Primärexplantaten von 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious', 'Pinova', 'Reka', 'Remo' und 'Retina' untersucht.

Als Grund- und Kontrollmedium diente wiederum R4, zu welchem bei den Inhibitorvarianten entweder NaF oder  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  in den Konzentrationen 5, 50 und 100  $\mu\text{M}$  zugegeben wurde (Medienbezeichnungen F5, F50, F100, V5, V50 und V100). Der Test wurde in drei Wiederholungen angesetzt. Eine Variante (Genotyp  $\times$  Medium) bestand aus zehn Explantaten. Aufgrund dieses relativ geringen Stichprobenumfangs wurde die Kontrollvariante doppelt geführt.

Die Datenerfassung erfolgte nach 6, 12 und 18 Wochen. Gleichzeitig fand zu den ersten beiden Terminen eine Medienerneuerung statt.

##### Experiment 3

Dieses dritte Experiment mit NaF und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  sollte klären, ob die Substanzen auch auf die Regeneration von Kalluskulturen einen fördernden Effekt ausüben. Daher wurden Kallus-

linien der Genotypen 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious', 'Pinova', 'Reka', 'Remo' und 'Retina' acht Wochen lang wie in Kap. 3.2.1, S. 83 beschrieben auf Medium R1 etabliert und anschließend einer 24-wöchigen Beobachtungsphase auf jeweils drei NaF- bzw.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -haltigen Medien sowie dem inhibitorfreien Grund- und Kontrollmedium R1 unterzogen.

Als Inhibitorkonzentrationen wurden 5, 50 und 100  $\mu\text{M}$  gewählt. Der Versuch enthielt zwei Kontrollvarianten um eine relativ sichere Bezugsbasis zu haben. Der Stichprobenumfang pro Variante und Wiederholung betrug in der Regel sechs Kalli. Auf Grund unzureichender Kallusbildung konnten bei einigen Varianten von 'Reka' und 'Remo' jedoch nur vier oder fünf Kalli in die Verrechnung aufgenommen werden. Der Versuch ist insgesamt dreimal durchgeführt worden. Die Erfassung der Regenerationsleistungen erfolgte nach 6, 12, 18 und 24 Wochen. Während der Kultivierung wurden die Kalli nach zwölf Wochen auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung umgesetzt.

#### **3.2.4.2 Endothall**

Zur Untersuchung des Einflusses des Phosphataseinhibitors Endothall auf die Adventivsprossbildung wurden nacheinander zwei Experimente durchgeführt, die sich in dem zu testenden Konzentrationsbereich unterschieden, im übrigen Versuchsaufbau jedoch gleich angelegt waren.

Getestet wurden in drei Wiederholungen je zehn Explantate der Genotypen 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious', 'Pinova', 'Reka', 'Remo' und 'Retina'. Zu Grundmedium R4, welches in beiden Versuchen gleichzeitig als Kontrollmedium diente, wurden in Experiment 1 Endothall in den Konzentrationen 1, 5, 25, 50 und 100  $\mu\text{M}$  zugegeben. In Experiment 2 hingegen lagen die getesteten Konzentrationen bei 0,05, 0,1, 0,5 und 1  $\mu\text{M}$ . Die Kontrollvarianten lagen stets doppelt vor. Die Bonituren erfolgten nach einer sechswöchigen Kulturdauer.

#### **3.2.4.3 L-p-Bromotetramisoloxalat**

Als vierter Phosphataseinhibitor wurde die Substanz L-p-Bromotetramisoloxalat in seiner Wirkung auf die Adventivsprossbildung von Primärexplantaten getestet.

Die Kultivierung der Explantate, die wiederum von den Genotypen 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious', 'Pinova', 'Reka', 'Remo' und 'Retina' stammten, erfolgte in den doppelt angelegten Kontrollvarianten auf dem Grundmedium R4, dem in den Inhibitorbehandlungen 0,1, 0,5, 1, 5, 10 und 25  $\mu\text{M}$  L-p-Bromotetramisoloxalat zugegeben worden waren. Der Versuch wurde

mit je zehn Explantaten je Variante dreimal wiederholt und nach sechs Wochen mit der Bonitur der Sprossbildungen beendet.

### 3.2.5 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren

Zur Untersuchung des Einflusses von Proteinkinaseinhibitoren auf die Adventivsprossbildung wurden die Substanzen Myristoylated Proteinkinase C Peptide Inhibitor (Promega, Katalog-Nr. V5691) und Proteinkinase Inhibitor from rabbit muscle (Sigma, Katalog-Nr. P5015) verwendet, die aus praktischen Gründen in der angegebenen Reihenfolge als PKI 1 bzw. PKI 2 bezeichnet worden sind. Die Konzentrationen betragen 100  $\mu\text{M}$  für PKI 1 und 5  $\mu\text{M}$  für PKI 2. Die Zugabe zum Grund- und Kontrollmedium R4 erfolgte aufgrund der Wärmeempfindlichkeit der Proteinkinaseinhibitoren nach dem Autoklavieren durch Sterilfiltration bei einer Medientemperatur von etwa 40 °C.

In drei Wiederholungen wurden je fünf Explantate der Genotypen 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* aufgesetzt und acht Wochen lang auf dem entsprechenden Medium kultiviert. Die Erfassung der Sprossbildungen erfolgte nach 4, 6 und 8 Wochen.

### 3.2.6 Einfluss der Phosphatkonzentration

Anhand von Explantaten der Genotypen 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* sollte untersucht werden, inwieweit unterschiedliche Phosphatkonzentrationen des Nährmediums einen Einfluss auf die Adventivsprossbildung haben können. Dazu wurden fünf Medien einschließlich das als Bezugs- und Kontrollvariante dienende Medium R4 getestet.

R4 enthält mit Ausnahme der eisenhaltigen Komponente FeNa-EDTA•2H<sub>2</sub>O alle weiteren Makro- und Mikronährsalze nach MURASHIGE und SKOOG (1962) in halber Konzentration. Unter Zugrundelegung der MS-Originalrezeptur, in der das phosphatliefernde Salz Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in einer Konzentration von 1,25 mM vorliegt, betrug demnach die Konzentration an KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> im Medium R4 0,625 mM. Als vergleichsweise zu testende Konzentrationsvarianten wurden 0, 0,313, 2,5 und 6,25 mM gewählt; mit Ausnahme der Nullvariante entsprechen diese einem Viertel, dem Doppelten bzw. dem Fünffachen der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Konzentration des MS-Mediums.

Eine Variante (Genotyp × Konzentration) besaß einen Stichprobenumfang von 20 Explantaten in jeweils drei Wiederholungen. Die Bonitur des Experiments erfolgte nach sechswöchiger Kulturdauer.

### **3.2.7 Datenerfassung und Auswertung**

#### **Erfassung der Regenerationsleistungen**

Bei beiden Regenerationssystemen erfolgte zu festgelegten Boniturzeitpunkten die Zählung der Sprosse mit Hilfe eines Stereomikroskops. Bei Kulturen, die über einen längeren Zeitraum hinweg mehrmals bonitiert werden sollten, wurden bei der Bonitur der jeweiligen Kultivierungsphase alle Sprosse während der Zählung abgetrennt und verworfen. Somit wurden nur die in einer Kultivierungsphase neu gebildeten Sprosse der Datenauswertung zugrunde gelegt. Von dieser Vorgehensweise wurde nur im unter Kap. 3.2.5, S. 89 beschriebenen Versuch zur Untersuchung der Wirkung der Proteinkinaseinhibitoren abgewichen, in dem zu den jeweiligen Boniturzeitpunkten keine Abtrennung der Sprosse erfolgte, sondern die Summe aller bis dahin regenerierten Sprosse angegeben wurde.

Neben der pro Versuchsvariante zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten Summe aller Sprosse diente als weiteres Vergleichskriterium für die Regenerationsfähigkeit die Regenerationsrate, d. h. der prozentuale regenerierende Anteil der Kalli bzw. Primärexplantate an deren Gesamtzahl. Wenn nötig, sind bei der Darstellung der Ergebnisse auch Angaben zur Anzahl der von den regenerierenden Explantaten gebildeten Sprosse gemacht worden.

#### **Isoenzymmarker für die Regenerationsfähigkeit**

Um Isoenzymmarker für die Regenerationsfähigkeit zu finden, wurden die Isoenzymmuster der einzelnen Proben zum jeweiligen Boniturzeitpunkt erfasst, wobei bei Varianten, in denen Regenerationsvorgänge stattfanden, zwischen regenerierenden und nicht regenerierenden Explantaten bzw. Kallusteilen, die vom Gesamtkallus entnommen worden waren, unterschieden wurde. Pro Gesamtkallus wurde jeweils nur eine Gewebeprobe berücksichtigt. Zusätzliche Berücksichtigung fanden außerdem Änderungen des äußeren Erscheinungsbildes der Kalli und Explantate.

#### **ACP-Muster und Regenerationsfähigkeit**

Zur Prüfung des vermuteten Zusammenhanges zwischen der Intensität der ACP-Banden 4 und 5 und der Regenerationsfähigkeit der Explantate wurden in Experiment 1 zunächst die Merkmale Regenerationsrate und Anzahl Sprosse je regenerierendes Explantat der Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Bandenmustertypen variantenbezogen gegenübergestellt. Außerdem wurden in Experiment 2 nochmals zu zwei Zeitpunkten die Regenerationsraten und die Häufigkeiten der Bandenmustertypen betrachtet.

Für den in Experiment 2 durchgeführten statistischen Nachweis des Zusammenhanges zwischen erhöhter Bandenintensität und fehlender Regenerationsbereitschaft bzw. zwischen unauffälliger Bandenintensität und vorhandenem Regenerationsvermögen wurde der G-Test, welcher die Unabhängigkeit zweier diskreter Zufallsgrößen prüft, unter Einbeziehung der Korrektur von YATES (WEBER 1980) genutzt. Dazu sind die einzelnen Explantate zunächst mittels einer Zwei-mal-Zwei-Tafel folgenden Merkmalskombinationen zugeordnet worden:

- Regeneration vorhanden / Intensität unauffällig (Bandenmustertyp 1)
- Regeneration vorhanden / Intensität erhöht (Bandenmustertypen 2 und 3)
- Regeneration nicht vorhanden / Intensität unauffällig (Bandenmustertyp 1)
- Regeneration nicht vorhanden / Intensität erhöht (Bandenmustertypen 2 und 3)

Anschließend wurde anhand der korrigierten Feldhäufigkeiten die Prüfgröße G errechnet und mit Hilfe des  $\chi^2$ -Verfahrens bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % auf Signifikanz getestet.

Der Test auf Unabhängigkeit der Merkmale Regenerationsfähigkeit und Bandenausprägung bei Kalluskulturen (Experiment 3) wurde anhand der oben beschriebenen Verfahrensweise mit Hilfe des G-Tests vollzogen. Dem Test wurde das Regenerationsvermögen der Kallusteilstücke und deren ACP-Muster zugrunde gelegt.

### **Einfluss der Phosphataseinhibitoren**

Wegen der großen Varianz in der Höhe der Sprossbildungen innerhalb der Explantate einer Variante wurde die Summe der pro Wiederholung regenerierten Sprosse als Einheit für die Auswertung betrachtet. Um eine bessere Angleichung an die Normalverteilung zu erreichen, mussten die Originaldaten für die statistische Auswertung einer Transformation unterzogen werden. Lagen Datenmengen vor, in denen höchstens zehn Sprosse gebildet worden waren, so wurde die Transformation  $\sqrt{x}$  gewählt. Kam dabei der Wert 0 vor, kam die Transformation  $\sqrt{0,5+x}$  zum Einsatz. Die Mehrzahl der Datenmengen zeigte jedoch eine größere Variationsbreite. Diese Daten wurden normallogarithmisch transformiert. Trat dabei der Wert 0 auf, so wurde zu jedem Beobachtungswert 1 hinzuaddiert (WEBER 1980). Anschließend sind je nach Fragestellung die entsprechenden Varianzanalysen durchgeführt worden.

Zunächst wurde für die einzelnen Experimente der Einfluss der Faktoren "Konzentration" des jeweiligen Inhibitors und "Genotyp" sowie deren Wechselwirkung untersucht, wobei die Ergebnisse des Genotyps 'Retina' unberücksichtigt blieben, da seine Werte z. T. stark von denen der anderen Genotypen abwichen. In den Versuchen 2 und 3 zur Prüfung des längerfristigen Einflusses der Substanzen NaF und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> auf die Regeneration bei

Primärexplantaten bzw. Kalluskulturen sind die Varianzanalysen für die einzelnen Kultivierungsphasen getrennt durchgeführt worden.

Zur Klärung der Frage, ob bestimmte Konzentrationen der Inhibitoren der bzw. den Kontrollvariante(n) des jeweiligen Genotyps signifikant überlegen sind, wurden für die einzelnen Genotypen die transformierten Sprosszahlen der Behandlungen nochmals in Varianzanalysen verrechnet. Nachfolgend wurde(n) der bzw. die Mittelwerte der Kontrolle(n) mit dem bzw. den Mittelwert(en) der Inhibitorbehandlungen mittels des Dunnet-Tests bei Zugrundelegung der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verglichen. In den längerfristigen Experimenten erfolgten diese Berechnungen getrennt nach Kultivierungsphasen.

### **Einfluss der Proteinkinaseinhibitoren**

Die logarithmisch transformierte Summe der pro Wiederholung gebildeten Sprosse bzw. der regenerierenden Explantate bildete die Versuchseinheit. Zu den einzelnen Boniturzeitpunkten wurden Sprosszahlen bzw. die Anzahlen der regenerierenden Explantate mittels zweifaktoriellen Varianzanalysen (Behandlung, Genotyp) verrechnet. Mit Hilfe des Dunnet-Tests erfolgte anschließend die Klärung der Frage, welche Behandlungen sich bei einer 5%igen Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant von den Kontrollvarianten unterschieden.

### **Einfluss der Phosphatkonzentration**

Nach logarithmischer Transformation der pro Wiederholung erzielten Sprosssummen erfolgte zunächst wiederum eine zweifaktorielle Varianzanalyse, in der der Einfluss der Phosphatkonzentration und des Genotyps auf die Variabilität der Sprossanzahlen untersucht wurde. Anschließend wurde für die einzelnen Genotypen wiederum mittels des Dunnet-Tests festgestellt, welche Konzentrationen sich von der Bezugskonzentration 0,625 mM bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant unterschieden.

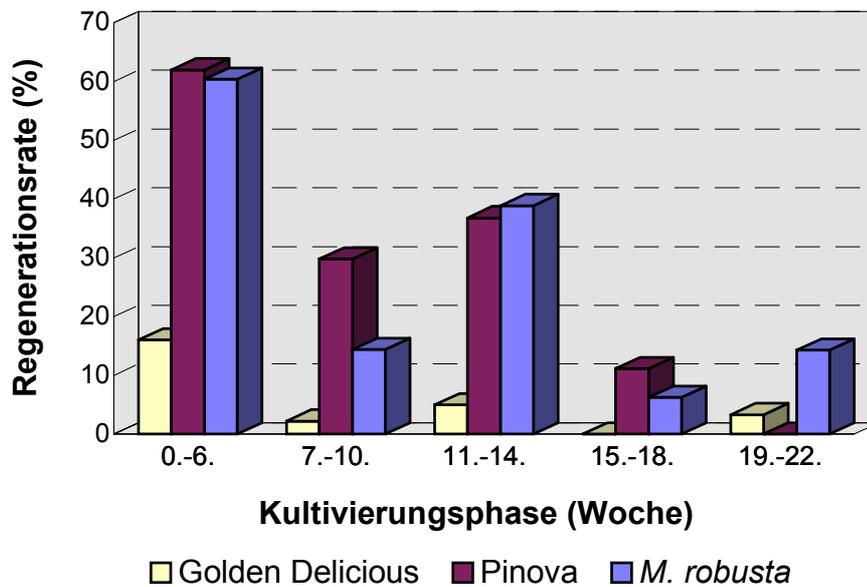
## **3.3 Ergebnisse**

### **3.3.1 Isoenzymmuster in Regenerationssystemen**

#### **Regenerationsfähigkeit der Primärexplantate**

Für die Auslösung regenerativer Prozesse erwies sich Medium R3 als ungeeignet. Nur in einem Fall, bei *M. robusta* in der 22. Woche, konnte eine Sprossbildung registriert werden. Medium R4 hingegen begünstigte die Bildung von Adventivsprossen. Erwartungsgemäß waren bei allen drei Genotypen die höchsten Regenerationsraten zum ersten Boniturzeitpunkt

nach sechs Wochen zu verzeichnen (Abb. 3.1). Tendenziell sank mit fortschreitender Kulturdauer die Anzahl der regenerierenden Explantate, wobei auf Grund der zuvor erfolgten Medienerneuerung zwischen der 11. und 14. bzw. der 19. und 22. Woche bei fast allen Varianten ein leichter Anstieg im Vergleich zur vorherigen Bonitur beobachtet werden konnte. Genotypisch bedingte Unterschiede im Regenerationsvermögen zeigten sich am deutlichsten während der ersten drei Bonituren. 'Pinova' und *M. robusta* lagen hier auf beträchtlich höherem Niveau als 'Golden Delicious'.



**Abb. 3.1:** Regenerationsraten von Primärexplantaten der Genotypen 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* auf Medium R4 in Abhängigkeit von der Kulturdauer.

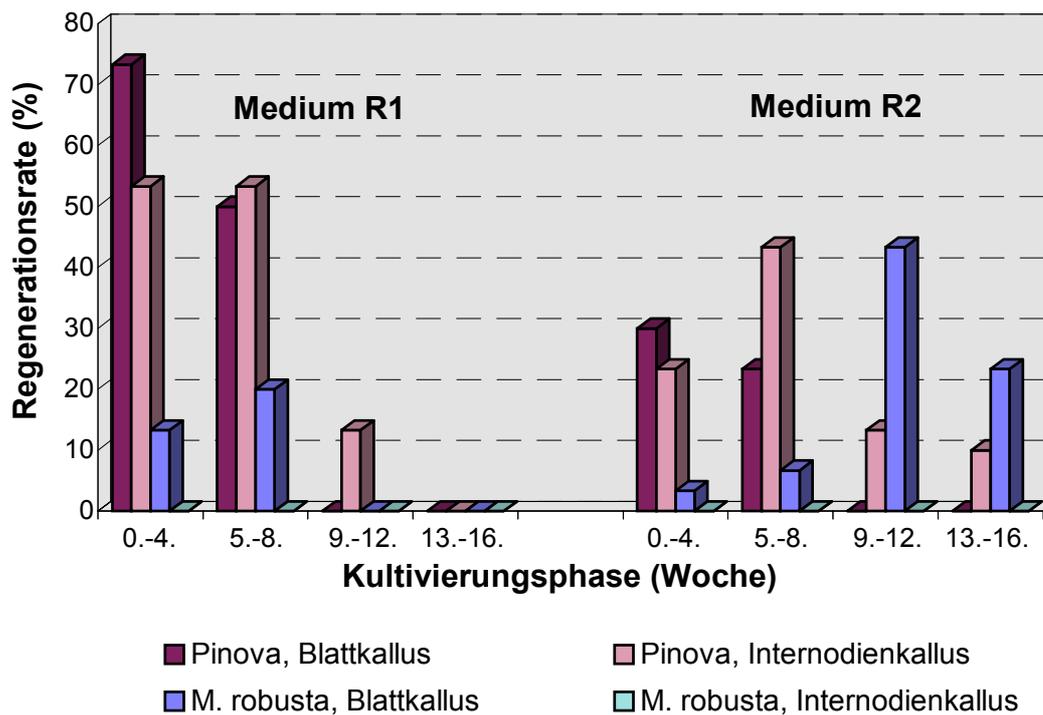
Hinsichtlich der Anzahl der pro regenerierendes Explantat gebildeten Sprosse waren keine so großen Unterschiede wie bei Zugrundelegung der Regenerationsraten zwischen den Genotypen und den Kultivierungsphasen zu verzeichnen. Regenerierende Explantate der drei Genotypen bildeten mehrheitlich ein bis zwei, seltener drei Sprosse aus. Lediglich zwischen der siebenten und zehnten Woche entwickelten sich an regenerierenden Explantaten als Folge des verbrauchten Mediums weniger Sprosse.

Der unterschiedliche Einfluss, den die Medien auf die Sprossregeneration ausübten, spiegelte sich auch im äußeren Erscheinungsbild der Explantate wider. Nach der anfänglichen flächenmäßigen Vergrößerung auf beiden Medien zeigten die Explantate unter Berücksichtigung einiger genotypischer Unterschiede auf R4 ein deutlich vitaleres Aussehen als auf R3. Die Explantate von 'Pinova' und *M. robusta* blieben bis einschließlich der dritten Kul-

tivierungsphase vollständig grün. Erst ab der vierten Kultivierungsphase konnten Verbräunungen der Adern, Ränder sowie einzelner Sektoren im Explantat sowie eine zunehmende Austrocknung und Brüchigkeit der Gewebe beobachtet werden, wobei *M. robusta* stärker betroffen war als 'Pinova'. 'Golden Delicious' zeigte schon in der ersten Kultivierungsphase vereinzelt braune Adern und Ränder, die Zunahme dieser Alterungsprozesse verlief mit steigender Kulturdauer jedoch langsam und auf niedrigem Niveau. Auf R3 hingegen traten die Veränderungen am Explantat vergleichsweise früher ein. Auch waren sie häufiger und in wesentlich stärkerem Maße – bis zum vollständigen Absterben – zu beobachten. Der Medieneinfluss zeigte sich außerdem in der Bereitschaft der Explantate, am Rand (Schnittstelle) Kallus zu bilden. Auf R4 setzte die Kallusinduktion häufiger und in längeren Randabschnitten ein als auf R3. Die Kallusgewebe proliferierten jedoch auf beiden Medien kaum, sie verhärteten zunehmend zu kompakten, teilweise behaarten Gebilden.

### **Regenerationsfähigkeit der Kalluskulturen**

Grundsätzlich fanden Sprossbildungen nur auf den Medien R1 und R2, aber nicht auf R3 statt. Auf beiden die Regeneration ermöglichenden Medien waren jedoch sowohl Unterschiede zwischen den Genotypen und Kallusarten als auch im zeitlichen Verlauf der Regenerationsfähigkeit zu beobachten. In Abb. 3.2 sind die Regenerationsraten dargestellt. Während der Internodienkallus von *M. robusta* auf keinem Medium Sprosse bildete, lag der Anteil sprossbildender Internodienkalli sowie die Anzahl der pro regenerierender Kallus gebildeten Sprosse bei 'Pinova' zwischen der fünften und achten Woche sogar über dem der Blattkalli. Bezüglich der zeitlichen Dauer des Erhalts der Regenerationsfähigkeit war das Medium R2 unter Berücksichtigung der jeweils geeigneteren Kallusart günstiger zu bewerten als R1. Bei *M. robusta* erhöhte sich auf R2 mit fortschreitender Kultivierungsdauer neben der Regenerationsrate auch die Anzahl der pro regenerierender Kallus gebildeten Sprosse. War nach vier Wochen im Mittel nur ein Spross pro regenerierender Kallus gezählt worden, so wurden zwischen der fünften und achten, der neunten und zwölften sowie der 13. und 16. Woche je vier bis fünf Sprosse gebildet. Im Vergleich dazu konnten auf R1 in den ersten drei Kultivierungsphasen nur je ein bis zwei Sprosse pro regenerierender Kallus registriert werden.



**Abb. 3.2:** Anteile regenerierender Kalli auf den Medien R1 und R2 in Abhängigkeit von Genotyp, Kallusart und Kultivierungsphase.

Der Medieneinfluss auf das äußere Erscheinungsbild der Kalli war relativ gering. Das stärkste Kalluswachstum zeigte sich auf R2, wobei sich die Kalli zwischen zwei Bonituren etwa um das Dreifache vergrößerten. Auf R1 und R3 wurden nur maximale Größenzunahmen bis auf das Doppelte erreicht. 'Pinova' zeigte auf allen Medien eine stärkere Kallusproliferation als *M. robusta*, wobei die Internodienkalli stärker wuchsen als die Blattkalli. In Farbe, Oberflächenbeschaffenheit und Festigkeit konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsvarianten festgestellt werden. Die Kalli zeigten eine unebene, mitunter körnige oder behaarte Oberfläche mit verschiedenen Zellkomplexen. Die Zellkomplexe innerhalb eines Kallus wiesen oftmals verschiedene Färbungen auf; in der Regel waren sie gelbgrün sowie grün und zeigten oftmals eine rote Pigmentierung. Mit fortschreitender Kulturdauer konnten zusätzlich hell- bis dunkelbraune Zellkomplexe beobachtet werden. Trotz dieser sichtbaren Heterogenität waren die Kalli schon zu Beginn der gesamten Kulturdauer durch eine hohe Festigkeit gekennzeichnet und wirkten dadurch sehr kompakt. Die Sprossbildungen erschienen aus grünen Zellkomplexen mit oftmals körniger Oberfläche. Eine Korrelation zur roten Pigmentierung bestand dabei nicht.

### **Isoenzymanalysen**

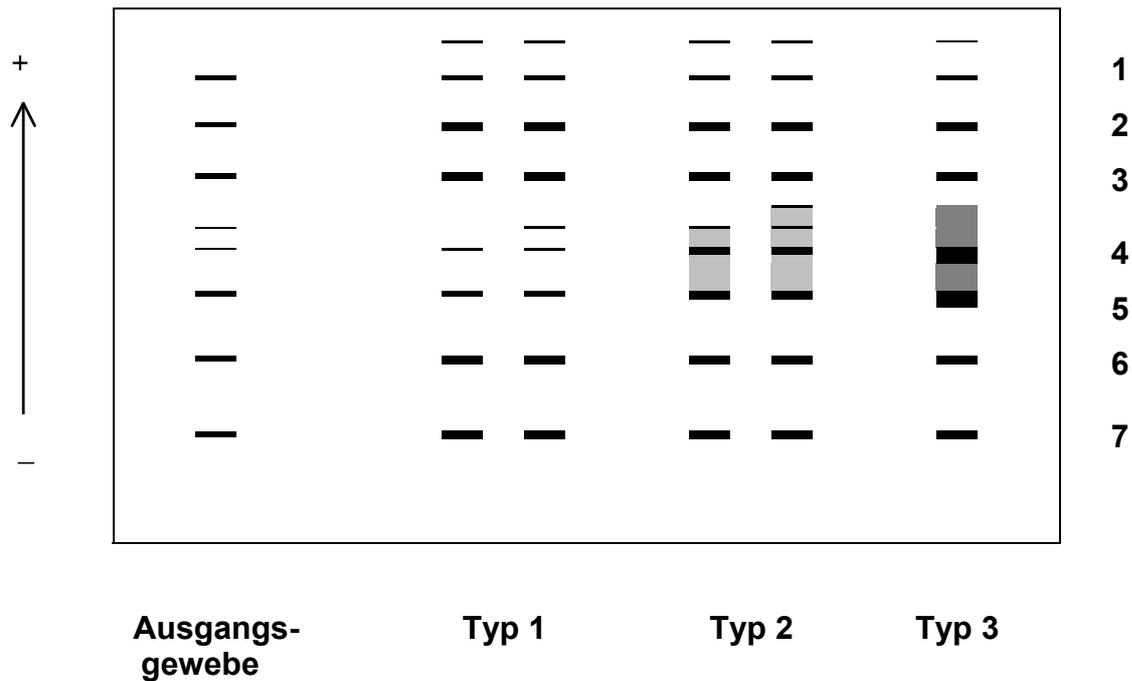
Zwischen den Isoenzymmustern beider Regenerationssysteme traten kaum Differenzen auf, so dass sie im folgenden gemeinsam beschrieben werden.

#### Saure Phosphatase (ACP)

Sowohl in den Ausgangsgeweben als auch in den Explantat- und Kalluskulturen konnten sieben Bandenhauptpositionen beobachtet werden, die durch Variationen in der Intensität gekennzeichnet waren. Die Intensität der Banden im Ausgangsgewebe war an einigen Positionen schwächer ausgeprägt. Im Gegensatz zu *M. robusta* zeigte die an Position 1 gelegene Bande bei 'Golden Delicious' und 'Pinova' sowohl im Ausgangsgewebe als auch in den Geweben der Regenerationssysteme eine geringere Intensität. Die Anzahl der Hauptbanden blieb sowohl bei Explantaten als auch bei Kalluskulturen über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg konstant.

Darüber hinaus wurden gelegentlich an mehreren Positionen im Gel zusätzliche, schwächer gefärbte Banden in unterschiedlicher Anzahl exprimiert. Ein gehäuftes Auftreten war bei den Explantatkulturen in den ersten beiden Kultivierungsphasen bis zur zehnten Woche in dem an Position 1 in Richtung Anode gelegenen Gelbereich zu verzeichnen.

In den kultivierten Geweben traten die bedeutendsten Unterschiede, die hauptsächlich durch differierende Intensitäten bestimmt waren, an den Positionen 4 und 5 auf. Die Variationen konnten drei Mustertypen zugeordnet werden, die im Vergleich zum Ausgangsgewebe in Abb. 3.3 dargestellt worden sind. Typ 1 war gekennzeichnet durch scharfe Banden, deren Intensität nie die der übrigen Hauptbanden übertraf. Dieser Typ war mit dem Muster des Ausgangsgewebes, in dem Position 4 eine geringere Intensität als Position 5 aufwies, vergleichbar. Dabei konnten an Position 4 eine oder zwei schmale Banden auftreten, die oftmals sogar eine noch geringere Aktivität als im Ausgangsgewebe besaßen. In Typ 2 waren an Position 4 zwei bis drei mitunter diffuse Banden mit erhöhter Intensität zu beobachten. Die Intensität dieser zweiten bzw. dritten Bande erreichte dabei teilweise die Intensität der Bande 5, die entweder unverändert oder im Vergleich zum Ausgangsgewebe mit ebenfalls erhöhter Intensität vorlag. Typ 3 schließlich zeichnete sich an beiden Positionen durch je eine sehr breite diffuse Bande von auffällig hoher Intensität aus, die oftmals nahezu ineinander übergingen.



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung der ACP-Mustertypen in Primärexplantaten und Kalluskulturen im Vergleich zum Ausgangsgewebe.

Die Mustertypen standen offenbar in engem Zusammenhang mit der Regenerationsfähigkeit. Auf Medium R3 zeigten alle Proben der Primärexplantate und Kalluskulturen mit Ausnahme des einzigen regenerierenden Explantats (*M. robusta*) das Muster von Typ 3. Das Zymogramm dieses regenerierenden Explantats hingegen entsprach Typ 1. Auf R1 und R2 konnten die Typen 1 und 3 sowie auf R4 alle drei Typen beobachtet werden. Typ 1 trat auffällig häufig bei regenerierenden Explantaten und Kalli, jedoch niemals bei nicht regenerierenden Geweben auf.

#### Alkohol-Dehydrogenase (ADH)

Blätter und Internodien von 'Golden Delicious' und 'Pinova' zeigten zwei schwach gefärbte Banden mit einer sekundären Bande; bei *M. robusta* waren keinerlei Aktivitäten zu verzeichnen.

Demgegenüber waren die Extrakte der Gewebe beider Regenerationssysteme durch eine Erhöhung der Bandenanzahl und -intensität gekennzeichnet. In Abhängigkeit vom Genotyp variierte die Anzahl intensiver bzw. schwächerer Banden zwischen drei und fünf.

Bei den Primärexplantaten verringerte sich die Bandenanzahl auf R3 ab der zweiten Kultivierungsphase (7.-10. Woche) bis zum Ende der gesamten Kultivierungsdauer bis auf eine Bande bei 'Golden Delicious' und 'Pinova' sowie bis auf fünf Banden unterschiedlicher

Intensität bei *M. robusta*. Auf R4 setzte der Rückgang der Bandenanzahl erst vier Wochen später ein.

Die Kalluskulturen von 'Pinova' zeigten unabhängig vom Medium und der Kallusart drei intensive Banden und bis zu fünf schwache, meist in Richtung Anode gelegene Banden. *M. robusta* exprimierte fünf intensive und bis zu acht schwächere Banden. Diese Bandenmuster blieben fast über die gesamte Kulturdauer bestehen; erst am Ende, in der 16. Woche, war ein Rückgang in Anzahl und Intensität zu beobachten.

Weder bei Primärexplantaten noch bei den Kalluskulturen konnten Zusammenhänge zwischen sichtbarer Regeneration und Isoenzymmuster festgestellt werden.

#### Diaphorase (DIA)

Differenziertes Ausgangsmaterial, Primärexplantate und Kalli aller Genotypen bildeten auf allen Medien zwölf intensive Hauptbanden mit mehreren schwächeren sekundären Banden aus. Die Zymogramme der Kalluskulturen blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg konstant. Die Explantate zeigten zur letzten Bonitur in der 22. Woche einen deutlichen Rückgang der Bandenanzahl und -intensität. Unterschiede zwischen regenerierenden und nicht regenerierenden Geweben waren nicht vorhanden.

#### Esterase (EST)

Die Zymogramme der Primärexplantate und der Kalluskulturen wiesen über 20 Banden unterschiedlicher Intensität auf und waren anfangs auf allen Medien und bei allen Genotypen nahezu identisch. Sie unterschieden sich kaum vom Ausgangsgewebe.

Die Primärexplantate von 'Golden Delicious' und 'Pinova' exprimierten ab der dritten Kultivierungsphase (11.-14. Woche) medienunabhängig weniger Banden; bei *M. robusta* setzte die Verringerung der Bandenanzahl bereits in der zweiten Kultivierungsphase (7.-10. Woche) ein. Bei den Kalluskulturen der beiden getesteten Genotypen 'Pinova' und *M. robusta* hingegen lag bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes in der 16. Woche eine größere Konstanz der Zymogramme vor. Nur geringfügig traten Intensitätsunterschiede unter Beibehaltung der Bandenanzahl auf.

Es zeigten sich keine Differenzen zwischen regenerierenden und nicht regenerierenden Explantaten bzw. Kalli.

#### Malat-Dehydrogenase (MDH)

Ausgangsgewebe sowie Explantate und jüngere Kalli wiesen genotyp- und medienunabhängig auf der anodischen Gelseite elf bis zwölf eng aneinanderliegende Banden unterschiedlicher

Intensität auf. Innerhalb der Primärexplantate blieb dieses Muster über die gesamte Beobachtungsperiode hinweg erhalten. Bei den Kalluskulturen hingegen setzte ab der dritten Kultivierungsphase (9.-12. Woche) ein deutlicher Rückgang der Bandenanzahl und -intensität ein.

Auf der kathodischen Gelseite zeigten die Isoenzyme der Kalluskulturen im Gegensatz zu den Explantaten ebenfalls einige Veränderungen. Das Ausgangsgewebe war hier durch die für den jeweiligen Genotyp charakteristischen Banden der im Kap. 2.3.1.1, S. 31 beschriebenen Zone MDH-3 gekennzeichnet. Demnach wiesen 'Pinova' und *M. robusta* den dreibandigen Phänotyp [ab] auf; 'Golden Delicious' trug die beiden Banden des Phänotyps [b]. Kalli von 'Pinova' exprimierten bis einschließlich der zwölften Woche auf allen Medien nur das *b*-Allel. Das *a*-Allel hingegen wurde erst wieder zur letzten Bonitur in der 16. Woche sichtbar. Bei *M. robusta* waren die Variationen medienabhängig. Auf R1 wurde die *a*-Bande zwar über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg ausgepägt, zeigte jedoch eine erheblich schwächere Intensität als die *b*-Doppelbande. Auf R2 und R3 konnte in den ersten beiden Kultivierungsphasen bis zur achten Woche entweder gar keine Bande oder nur die erste *b*-Bande in geringer Intensität beobachtet werden, die *a*-Bande und die zweite *b*-Bande wurden erst wieder zwischen der neunten und zwölften Woche gebildet. Explantate behielten stets ihr genotypspezifisches Muster des Locus *Mdh-(3)* bei. Außerdem trat bei allen Kalluskulturen und einem Teil der Explantate auf der kathodischen Gelseite eine vierte, zwischen den beiden Banden des *b*-Allels positionierte Bande auf.

Die beschriebenen Variationen gestatten keinen Rückschluss auf das Regenerationsvermögen.

#### Peroxidase (PRX)

PRX-Zymogramme beider Regenerationssysteme wiesen im Gegensatz zum Ausgangsgewebe sowohl auf der anodischen als auch auf der kathodischen Gelseite zwei bis vier zusätzliche Bandenpositionen auf, sodass genotypabhängig bis zu 18 Bandenpositionen beobachtet werden konnten.

Bei den Kalluskulturen blieben die Bandenmuster mehrheitlich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes bei allen Varianten mit gleicher Intensität erhalten. Eine Ausnahme zeigte sich jedoch beim Vergleich der regenerierenden und der nicht regenerierenden Blattkalli von *M. robusta*. Die regenerierenden Kallusteile zeigten auf R1 und in noch stärkerem Maße auf R2, wo die Regeneration auf die gesamte Beobachtungszeit bezogen höher lag als auf R1, an Position 16 eine deutlich höhere Intensität als nicht regenerierendes Kallusgewebe.

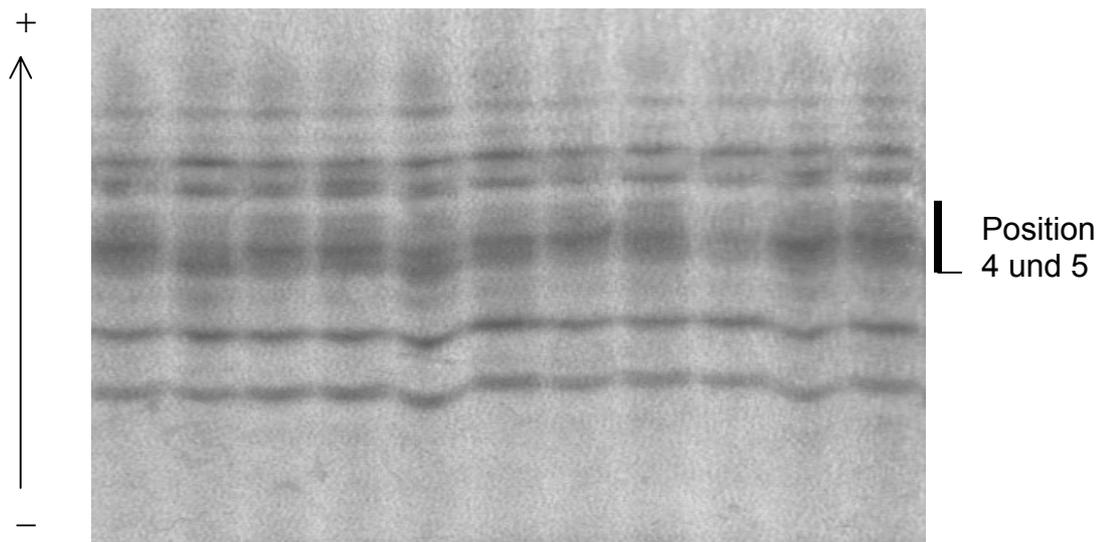
Bei den Explantaten auf Medium R3 sowie bei nicht regenerierenden Explantaten auf R4 waren mit fortschreitender Kultivierungszeit immer stärker werdende Bandenverluste und

Intensitätsminderungen zu erkennen. Dabei waren die Veränderungen bei 'Golden Delicious' im Vergleich zu 'Pinova' und *M. robusta*, die eine höhere Regenerationsbereitschaft besaßen, geringer ausgeprägt. Das einzige auf R3 regenerierende Explantat (*M. robusta*) zeigte ebenfalls wie alle anderen auf R4 regenerierenden Explantate keine qualitativen und quantitativen Bandenverluste.

### 3.3.2 ACP-Muster und Regenerationsfähigkeit

#### Experiment 1

Die Explantate der beiden geprüften Genotypen 'Golden Delicious' und 'Pinova' zeigten in keiner der Bonitierungsvarianten auf Medium R3 sichtbare Regenerationen. Jedes Explantat exprimierte das ACP-Muster des Typs 3, das durch sehr hohe Intensitäten an den Positionen 4 und 5 gekennzeichnet ist (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** ACP-Bandenmuster des Typs 3 bei Primärexplantaten ohne Regeneration auf Medium R3.

Sprossbildungen wurden nur auf R4 ausgelöst. Die Regenerationsleistungen wiesen deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp und der Untersuchungsvariante auf (Tab. 3.1). Die höchsten Regenerationsleistungen wurden bei 'Pinova' nach sechs Wochen erzielt, bei 'Golden Delicious' hingegen regenerierten die meisten Explantate erst zwischen der siebenten und zehnten Woche nach vorherigem Umsetzen am Ende der sechsten Woche. Ohne Medienerneuerung traten bei beiden Genotypen zwischen der siebenten und zehnten Woche die wenigsten Regenerationsereignisse ein. In der Summe der Untersuchungsvarianten

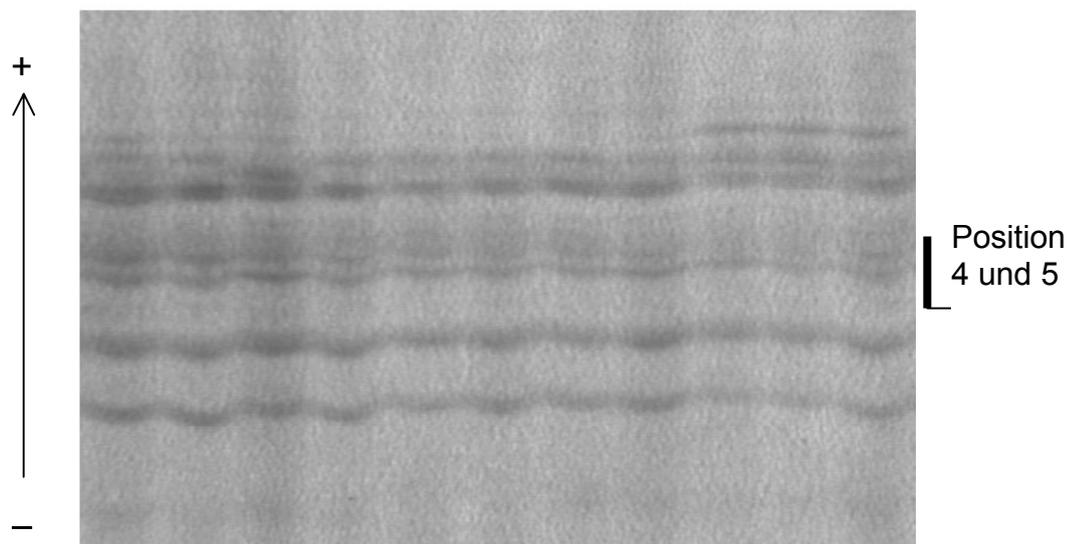
betrachtet, lag das Regenerationspotential von 'Pinova' deutlich über dem von 'Golden Delicious'.

**Tab. 3.1:** Regenerationsleistungen und relative Häufigkeiten der ACP-Bandenmustertypen von Primärexplantaten der Genotypen 'Golden Delicious' und 'Pinova' auf Medium R4 in Abhängigkeit von der Untersuchungsvariante (n = 20 Explantate).

Untersuchungs- variante	Genotyp	Regenera- tionsrate (%)	Sprosse/ regenerie- rendes Explantat	Relative Häufigkeit der Bandenmustertypen (%)		
				Typ 1	Typ 2	Typ 3
0.-6. Woche	'Golden Del.'	25,0	1,3	0	25,0	75,0
	'Pinova'*	78,9	1,8	54,9	36,8	5,3
7.-10. Woche mit Subkultur	'Golden Del.'	50,0	1,9	25,0	25,0	50,0
	'Pinova'	55,0	1,4	40,0	25,0	35,0
7.-10. Woche ohne Subkultur	'Golden Del.'	5,0	1,0	0	25,0	75,0
	'Pinova'	25,0	1,2	25,0	40,0	35,0

\* n = 19 Explantate

Bei der Untersuchung der Bandenmustertypen der auf R4 kultivierten Explantate konnten neben dem Typ 3 auch die Typen 1 und 2, welche in Abb. 3.5 dargestellt sind, beobachtet werden.



**Abb. 3.5:** ACP-Muster der Typen 1 und 2 bei Primärexplantaten auf Medium R4.

Es bestanden deutliche Unterschiede in den relativen Häufigkeiten, die ebenfalls in Tab. 3.1 dargestellt sind. Hohe Regenerationsraten korrelierten mit einem geringen Anteil von Regeneraten des Typs 3 sowie mit dem gehäuften Auftreten von Typ 1. Unter Berücksichtigung der Untersuchungsvariante und des Genotyps zeigten sich im Vergleich der Häufigkeiten des Typs 1 tendenzielle Ähnlichkeiten zu den jeweiligen Regenerationsraten. Typ 2 zeigte weniger große Unterschiede in den Häufigkeiten. Bei 'Golden Delicious' war der Zusammenhang zwischen den Häufigkeiten des Typs 1 und den Regenerationsleistungen besonders offensichtlich.

### Experiment 2

Auf Medium R3, auf dem wiederum keine Regenerationen stattfanden, wurde ausnahmslos nur der Bandentyp 3 festgestellt. Dagegen waren auf R4 Unterschiede sowohl in der Höhe der Regenerationsraten als auch in der Häufigkeitsverteilung der Bandentypen zu verzeichnen, die durch den Genotyp und den Boniturzeitpunkt bedingt waren (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2:** Regenerationsraten und relative Häufigkeiten der ACP-Bandenmustertypen von Primärexplantaten der Genotypen 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* auf Medium R4 in Abhängigkeit vom Boniturzeitpunkt.

Genotyp	Wiederholung	Boniturzeitpunkt (nach ... Wochen)	Regenerationsrate (%)	Relative Häufigkeiten der Bandenmustertypen (%)		
				Typ 1	Typ 2	Typ 3
'Golden Del.'	1	2	0	0	16,0	84,0
		4	12,0	8,0	20,0	72,0
	2	2	0	3,8	7,7	88,5
		4	3,8	3,9	26,9	69,2
'Pinova'	1	2	0	12,0	32,0	56,0
		4	48,0	52,0	36,0	12,0
	2	2	0	12,0	32,0	56,0
		4	38,5	38,5	42,3	19,2
<i>M. robusta</i>	1	2	0	0	0	100
		4	38,5	32,0	32,0	36,0
	2	2	0	0	0	100
		4	44,0	38,5	30,8	30,7

Zwei Wochen nach dem Aufsetzen waren in der Gesamtheit der Explantate noch keine Sprossbildungen sichtbar. Die klaren genotypabhängigen Niveauunterschiede in der Höhe der Regenerationsrate zeigten sich nach vier Wochen. Die Regenerationsrate von 'Golden Deli-

cious' lag in beiden Wiederholungen auf deutlich niedrigerem Niveau als die von 'Pinova' und *M. robusta*, die sich durch ein ähnliches Regenerationspotential auszeichneten.

In den gleichfalls in Tab. 3.2 ersichtlichen relativen Häufigkeiten der Bandenmustertypen zeigten sich tendenzielle Beziehungen zu den Regenerationsraten. Der durch unauffällige Intensitäten gekennzeichnete Typ 1 war nach zwei Wochen noch nicht bzw. zu einem im Vergleich mit den anderen Mustern der jeweiligen Bonitierungsvariante in geringem Umfang vertreten. Nach vier Wochen hingegen stiegen die Häufigkeiten von Typ 1 in der gleichen genotypabhängigen Weise an wie die Regenerationsraten, wobei die Häufigkeit des Auftretens der Höhe der Regenerationsraten sehr ähnlich war.

Demgegenüber traten durch Typ 3 charakterisierte Explantate in entgegengesetzter Tendenz weniger häufig auf je mehr die Regenerationsrate anstieg. Sie waren nach zwei Wochen unter Beachtung der genotypischen Unterschiede häufiger als nach vier Wochen vertreten. Den geringsten Anteil hatte 'Pinova' zu verzeichnen, den höchsten dagegen 'Golden Delicious'. Die Häufigkeiten von Typ 2 nahmen bei beiden Kultivierungszeiten eine Mittelstellung ein. Ihr Anteil war jedoch nach vier Wochen mehr oder weniger deutlich höher als nach zwei Wochen.

Die Werte des G-Tests, bei dem als Nullhypothese die Unabhängigkeit der qualitativen Merkmale Regeneration und Bandenintensität in ihren beiden Stufen *vorhanden* und *nicht vorhanden* bzw. *unauffällig* (Bandenmustertyp 1) und *erhöht* (Bandenmustertypen 2 und 3) zugrunde gelegt wurde, sind in Tab. 3.3 angegeben. Bei einem Freiheitsgrad beträgt der  $\chi^2$ -Wert für eine 5 %ige Irrtumswahrscheinlichkeit 3,84. In allen Varianten bzw. bei Zusammenfassung mehrerer Varianten, in denen alle Werte von null verschieden waren, ergab sich Signifikanz und damit die Ablehnung der Nullhypothese. Es besteht somit ein Zusammenhang zwischen erhöhter Bandenintensität und ausbleibender Regeneration bzw. zwischen unauffälliger Intensität und vorhandener Regenerationsbereitschaft.

### **Experiment 3**

Die beiden Varianten der Untersuchungsmethodik ergaben unterschiedliche Ergebnisse in der Häufigkeit der gefundenen ACP-Muster.

#### Kalli mit ACP-Untersuchung des Gesamtgewebes

Die Regenerationsleistungen waren abhängig vom Medium, dem Genotyp und der Kallusart. Auf Medium R3, auf dem nur Blattkalli kultiviert wurden, fand keine Regeneration statt.

**Tab 3.3:** G-Werte für den Test auf Unabhängigkeit zwischen Regeneration und Bandenintensität bei Primärexplantaten.

Medium	Kultur- dauer (Wochen)	Genotyp	Merkmalskombination				G-Wert
			Regeneration vorhanden		Regeneration nicht vorhanden		
			Intensität unauffällig	Intensität erhöht	Intensität unauffällig	Intensität erhöht	
R3	2	'Golden Delicious'	0	0	0	51	-
		'Pinova'	0	0	0	51	-
		<i>M. robusta</i>	0	0	0	51	-
R3	4	'Golden Delicious'	0	0	0	51	-
		'Pinova'	0	0	0	51	-
		<i>M. robusta</i>	0	0	0	51	-
R4	2	'Golden Delicious'	0	0	2	49	-
		'Pinova'	0	0	14	31	-
		<i>M. robusta</i>	0	0	0	47	-
R4	4	'Golden Delicious'	3	1	2	45	7,89 **
		'Pinova'	16	6	7	22	10,35 **
		<i>M. robusta</i>	16	4	2	29	27,52 ***
R4	2 + 4	'Golden Delicious'	3	1	4	94	9,20 **
		'Pinova'	16	6	21	53	12,10 ***
		<i>M. robusta</i>	16	4	2	76	50,03 ***
R3 + R4	2 + 4	'Golden Delicious'	3	1	4	196	12,63 ***
		'Pinova'	16	6	21	155	33,36 ***
		<i>M. robusta</i>	16	4	2	178	73,34 ***

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

Auf R1 zeigte der Blatt- bzw. der Internodienkallus von 'Pinova' eine Regenerationsrate von 60,0 % bzw. 46,7 %. Die Blattkalli von *M. robusta* regenerierten auf R1 zu 6,7 %, während die Regeneration bei Internodienkallus vollständig ausblieb.

Die ACP-Muster waren gekennzeichnet durch das alleinige Auftreten von Typ 3.

#### Kalli mit ACP- Untersuchung von drei ausgewählten Gewebeproben

Die Regenerationsleistungen entsprachen weitgehend denen der Kalli, deren gesamtes Gewebe extrahiert worden war, d. h. auf R3 waren keine Regenerationen zu verzeichnen, auf R1 variierten die Regenerationsraten in Abhängigkeit von Genotyp und Kallusart (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4:** Regenerationsleistungen und relative Häufigkeiten des ACP-Bandenmustertyps 1 in Kalluskulturen bei Untersuchung von drei ausgewählten Gewebeproben je Kallus auf Medium R1 (n = 15).

Genotyp	Kallusart	Regenerationsrate (%)	Sprosse/ regenerierender Kallus	Relative Häufigkeit des Typs 1 (%)
'Pinova'	Blattkallus	77,3	2,0	53,3
	Internodienkallus	53,3	3,6	73,3
<i>M. robusta</i>	Blattkallus	13,3	1,0	26,7
	Internodienkallus	0	0	0

Die Untersuchung der ACP-Muster ergab, dass in regenerierenden Varianten in unterschiedlichem Umfang Kalli vorhanden waren, bei denen mindestens eine der Gewebeproben den Bandentyp 1 exprimierte (Tab. 3.4). Die auf R1 im Vergleich zu *M. robusta* höhere Regenerationsfähigkeit beider Kallusarten von 'Pinova' war verbunden mit dem häufigeren Vorkommen von Proben mit unauffälliger Aktivität (Typ 1). Die Höhe der Regenerationsraten der Blatt- und Internodienkalli von 'Pinova' waren jedoch umgekehrt proportional zur Häufigkeit von Typ 1. Die in geringerem Umfang regenerierenden Internodienkalli wiesen aber die höheren Sprossanzahlen pro regenerierenden Kallus auf. In keinem Kallus der nicht regenerierenden Varianten konnte Typ 1 beobachtet werden; diese Kalli waren in allen drei Gewebeproben durch Typ 3 charakterisiert.

Der G-Test bestätigte sowohl für Blatt- und Internodienkallus von 'Pinova' als auch für die Summe der Blattkalli beider Genotypen auf R1 den vermuteten Zusammenhang von Regenerationsverhalten und Bandenintensität. Lediglich bei alleiniger Betrachtung des auf gleichem Medium kultivierten Blattkallus von *M. robusta* konnte die Abhängigkeit beider Merkmale nicht statistisch gesichert werden (Tab. 3.5).

**Tab 3.5:** G-Werte für den Test auf Unabhängigkeit zwischen Regeneration und Bandenintensität. Die Daten wurden aus jeweils drei Teilstücken von insgesamt 15 untersuchten Kalli pro Variante gewonnen.

Genotyp	Medium	Kallusart	Merkmalskombination				G-Wert
			Regeneration vorhanden		Regeneration nicht vorhanden		
			Intensität unauffällig	Intensität erhöht	Intensität unauffällig	Intensität erhöht	
'Pinova'	R1	Blattkallus	9	4	2	30	10,95 ***
		Internodienkallus	7	3	6	29	7,45 **
	R3	Blattkallus	0	0	0	45	-
<i>M. robusta</i>	R1	Blattkallus	1	2	3	39	0,89
		Internodienkallus	0	0	0	45	-
	R3	Blattkallus	0	0	0	45	-
'Pinova' + <i>M. robusta</i>	R1	Blattkallus	10	6	5	69	20,31 ***

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

### 3.3.3 Einfluss von Phosphataseinhibitoren

#### 3.3.3.1 Natriumfluorid und Natriumvanadat

##### Experiment 1<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Die Ergebnisse dieses Experiments sind in gestraffter Form in *Plant Breeding* **117**, 563-566 (1998) veröffentlicht worden.

Unabhängig von der Konzentration konnten auf den meisten der NaF und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> beinhaltenden Medien die ersten Adventivknospen bereits reichlich zwei Wochen nach Kultivierungsbeginn beobachtet werden. Demgegenüber zeigten sich auf dem Kontrollmedium die ersten Adventivknospen erst nach vier Wochen. Darüber hinaus waren die Explantate unter dem Einfluss der beiden Inhibitoren im Vergleich zur Kontrolle einem verlangsamten Alterungsprozess unterworfen.

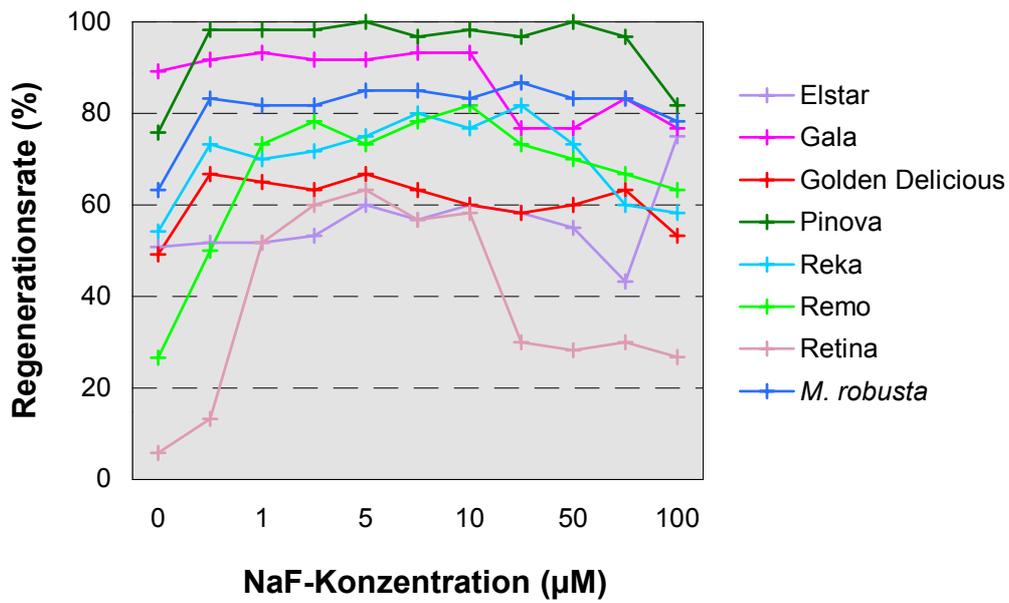
Im Allgemeinen übten beide Inhibitoren einen positiven Einfluss auf die Adventivsprossbildung aus. Die Gesamtanzahlen der Sprosse sind im Vergleich zur Kontrolle in Tab. 3.6 ersichtlich. Mit Ausnahme von 'Elstar' und 'Gala' regenerierten die anderen Genotypen in einigen ('Reka') bis in allen Inhibitorbehandlungen ('Pinova', *M. robusta*) signifikant mehr Sprosse als in der Kontrolle. Aber auch bei 'Elstar' und 'Gala' konnten erhöhte Sprossanzahlen in den meisten Behandlungen erzielt werden.

Die Erhöhung der Sprosserträge wurde dadurch erreicht, dass einerseits mehr Explantate regenerierten (Abb. 3.6 und 3.7) und andererseits diese mehr Sprosse bildeten. So wurde z. B. für 'Pinova' bei beiden Inhibitoren in über der Hälfte der Behandlungen eine Regenerationsrate von 100 % festgestellt, während bei der Kontrolle nur 75 bis 80 % der Explantate regenerierten. Genotypen mit einer mittleren Regenerationskapazität (40 bis 60 %) wie *M. robusta*, 'Golden Delicious' und 'Reka' konnten ihre Regenerationsraten in einigen Behandlungen bis um die Hälfte erhöhen. Außerordentlich gute Ergebnisse wurden auch bei 'Retina' und 'Remo' erzielt, die in der Kontrolle mit 5 bzw. 25 % regenerierenden Explantaten durch eine niedrige Regenerationskapazität charakterisiert waren. Mit Ausnahme von 'Elstar' und 'Gala' erhöhten sich im Durchschnitt der anderen Genotypen bei vielen Konzentrationen die Sprossanzahlen pro regenerierendes Explantat bis auf das Dreifache der Kontrolle. Beim Vergleich der Ergebnisse über die Varianzanalyse wurde ersichtlich, dass die größten Unterschiede in der Sprossregeneration genotypbedingt waren (Tab. A.2 und A.3 im Anhang).

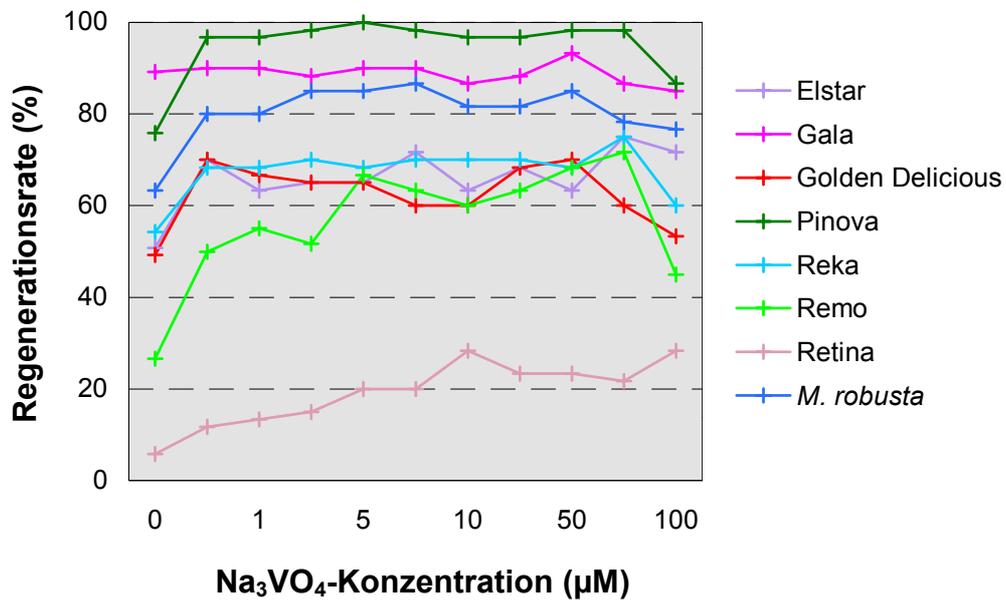
**Tab. 3.6:** Anzahl regenerierter Sprosse unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von NaF und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Die Werte repräsentieren den Gesamtertrag aus drei Wiederholungen.

Behandlung und Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Anzahl regenerierter Sprosse pro Genotyp								
	Elstar	Gala	Golden Delicious	Reka	Remo	Retina	Pinova	<i>Malus robusta</i>	
Kontrolle 0	86	229	44	66	25	5	133	91	
NaF 0,5	121	228	126 *	108	58 *	12	413 *	252 *	
1	80	274	110 *	90	132 *	55 *	377 *	248 *	
2,5	70	224	113 *	95	152 *	70 *	407 *	312 *	
5	111	243	115 *	94	135 *	80 *	394 *	394 *	
7,5	104	217	99 *	131 *	168 *	82 *	340 *	397 *	
10	105	258	98 *	119 *	163 *	82 *	340 *	385 *	
25	105	151	103 *	127 *	153 *	29 *	316 *	368 *	
50	111	134	92 *	78	170 *	25	309 *	296 *	
75	77	171	76 *	90	100 *	34 *	253 *	280 *	
100	132	194	67	63	100 *	32 *	201 *	252 *	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,5	126	241	98 *	93	86 *	9	372 *	338 *	
1	100	254	89 *	90	75 *	13	394 *	356 *	
2,5	85	225	108 *	95	74 *	16	362 *	290 *	
5	123	273	98 *	88	98 *	32 *	554 *	379 *	
7,5	151	254	130 *	90	83 *	20	472 *	379 *	
10	152	231	103 *	98	92 *	25	475 *	303 *	
25	145	251	107 *	89	100 *	20	514 *	345 *	
50	118	175	105 *	91	132 *	19	586 *	301 *	
75	169	200	88 *	97	104 *	16	496 *	276 *	
100	158	254	55	65	45	23	320 *	270 *	

\* signifikant besser als Kontrolle bei  $p \leq 0,05$



**Abb. 3.6:** Regenerationsraten von Primärexplantaten verschiedener Genotypen in Abhängigkeit von der NaF-Konzentration nach sechswöchiger Kulturdauer.



**Abb. 3.7:** Regenerationsraten von Primärexplantaten verschiedener Genotypen in Abhängigkeit von der Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Konzentration nach sechswöchiger Kulturdauer.

Darüber hinaus konnte ein signifikanter Einfluss der Inhibitorkonzentration sowie dessen Wechselwirkung mit dem Genotyp nachgewiesen werden.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  schien dabei einen größeren genotypspezifischen Effekt zu haben als NaF. Während bei 'Reka', 'Remo' und 'Retina' weniger Sprosse mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  gebildet wurden, war die Regeneration bei 'Gala', 'Elstar' und 'Pinova' höher bei Anwendung von NaF.

Ungeachtet der Unterschiede waren alle Konzentrationen in der Lage, die Adventivsprossbildung in den meisten Genotypen positiv zu beeinflussen. In Abhängigkeit vom Genotyp, dem Inhibitor und der Konzentration konnten bestimmte Maxima in der Sprossregeneration beobachtet werden. In den meisten Fällen lagen diese Maxima zwischen 5 und 10  $\mu\text{M}$ . Der steigende Effekt verringerte sich im allgemeinen jedoch bei Konzentrationen über 50  $\mu\text{M}$ .

## **Experiment 2**

Bei der überwiegenden Mehrheit der Versuchsvarianten (Genotyp  $\times$  Kultivierungsphase) konnte durch den Zusatz von NaF oder  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  eine signifikante Steigerung der Sprosserträge im Vergleich zu beiden oder mindestens einer der Kontrollen nachgewiesen werden (Tab. 3.7). Lediglich bei den zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung stark mit endogenen Bakterien infizierten Explantaten von 'Retina' blieben die Inhibitoren wirkungslos.

Die Erhöhung der Gesamtzahlen der pro Inhibitorvariante gebildeten Sprosse ergab sich wiederum aus der Erhöhung der Anzahl regenerierender Explantate (Tab. A.11) und aus der vermehrten Sprossbildung an den regenerierenden Explantaten selbst.

Der regenerationssteigernde Effekt war in Abhängigkeit vom Genotyp, der Kultivierungsphase und dem Inhibitor bzw. dessen Konzentration verschieden ausgeprägt. Bei den Genotypen 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious' und 'Pinova' zeigten alle Konzentrationen beider Inhibitoren die höchste Wirksamkeit während der ersten sechs Wochen der insgesamt 18-wöchigen Kultivierungszeit. Die Steigerungsraten nahmen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen mit zunehmender Kulturdauer kontinuierlich ab. Während der dritten Kultivierungsphase wurden nur noch bei der Hälfte der inhibitorbeinhaltenden Medien signifikant höhere Sprosserträge beobachtet. Demgegenüber zeigten die Kontrollen über die drei Beobachtungsphasen hinweg keinen ('Elstar', 'Golden Delicious') bzw. nur einen leichten Rückgang ('Gala') der Regenerationsleistung.

**Tab. 3.7:** Anzahl der an Primärexplantaten regenerierten Sprosse in Abhängigkeit von der Kultivierungsphase und verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Konzentrationen.

Genotyp	Kultivierungsphase (Woche)	Behandlung und Konzentration (µM)							
		Kontrolle 1	Kontrolle 2	NaF			Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		
				0	0	5	50	100	5
Elstar	0.-6.	28	25	67 <sup>AB</sup>	60 <sup>AB</sup>	47 <sup>AB</sup>	64 <sup>AB</sup>	92 <sup>AB</sup>	54 <sup>AB</sup>
	7.-12.	26	15	36 <sup>B</sup>	42 <sup>AB</sup>	42 <sup>B</sup>	41 <sup>B</sup>	41 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>
	13.-18.	29	21	29	36	42 <sup>B</sup>	48 <sup>B</sup>	46 <sup>B</sup>	34
	0.-18.	83	61	132 <sup>AB</sup>	138 <sup>AB</sup>	131 <sup>AB</sup>	153 <sup>AB</sup>	179 <sup>AB</sup>	118 <sup>B</sup>
Gala	0.-6.	65	63	96 <sup>AB</sup>	89 <sup>AB</sup>	77	117 <sup>AB</sup>	103 <sup>AB</sup>	110 <sup>AB</sup>
	7.-12.	62	68	65	77	78	104 <sup>AB</sup>	113 <sup>AB</sup>	82 <sup>A</sup>
	13.-18.	56	57	79	74	68	91 <sup>AB</sup>	95 <sup>AB</sup>	74
	0.-18.	183	188	240 <sup>AB</sup>	240 <sup>AB</sup>	223 <sup>AB</sup>	312 <sup>AB</sup>	311 <sup>AB</sup>	266 <sup>AB</sup>
Golden Delicious	0.-6.	22	22	46 <sup>AB</sup>	72 <sup>AB</sup>	85 <sup>AB</sup>	61 <sup>AB</sup>	75 <sup>AB</sup>	61 <sup>AB</sup>
	7.-12.	20	20	38 <sup>AB</sup>	42 <sup>AB</sup>	67 <sup>AB</sup>	51 <sup>AB</sup>	82 <sup>AB</sup>	65 <sup>A</sup>
	13.-18.	31	28	35	37	41	54 <sup>AB</sup>	44 <sup>B</sup>	53 <sup>AB</sup>
	0.-18.	73	70	119 <sup>AB</sup>	151 <sup>AB</sup>	193 <sup>AB</sup>	166 <sup>AB</sup>	201 <sup>AB</sup>	179 <sup>AB</sup>
Pinova	0.-6.	85	87	119 <sup>AB</sup>	163 <sup>AB</sup>	169 <sup>AB</sup>	147 <sup>AB</sup>	262 <sup>AB</sup>	196 <sup>AB</sup>
	7.-12.	67	72	101 <sup>AB</sup>	98 <sup>A</sup>	123 <sup>AB</sup>	116 <sup>AB</sup>	133 <sup>AB</sup>	127 <sup>AB</sup>
	13.-18.	65	66	86 <sup>A</sup>	95 <sup>AB</sup>	89 <sup>AB</sup>	78	77	91 <sup>AB</sup>
	0.-18.	217	225	306 <sup>AB</sup>	356 <sup>AB</sup>	381 <sup>AB</sup>	341 <sup>AB</sup>	472 <sup>AB</sup>	414 <sup>AB</sup>

Tab. 3.7: Fortsetzung.

Genotyp	Kultivierungsphase (Woche)	Behandlung und Konzentration ( $\mu\text{M}$ )								
		Kontrolle 1	Kontrolle 2	NaF			Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>			
				0	0	5	50	100	5	50
Reka	0.-6.	21	21	58 <sup>AB</sup>	59 <sup>AB</sup>	37 <sup>AB</sup>	36 <sup>AB</sup>	58 <sup>AB</sup>	42 <sup>AB</sup>	
	7.-12.	46	38	95 <sup>AB</sup>	95 <sup>AB</sup>	56 <sup>B</sup>	74 <sup>AB</sup>	104 <sup>AB</sup>	47	
	13.-18.	77	71	109 <sup>B</sup>	92	62	110 <sup>B</sup>	146 <sup>AB</sup>	58	
	0.-18.	144	130	262 <sup>AB</sup>	246 <sup>AB</sup>	155	220 <sup>AB</sup>	308 <sup>AB</sup>	147	
Remo	0.-6.	15	15	35 <sup>AB</sup>	39 <sup>AB</sup>	38 <sup>AB</sup>	32 <sup>AB</sup>	34 <sup>AB</sup>	31 <sup>AB</sup>	
	7.-12.	17	16	79 <sup>AB</sup>	56 <sup>AB</sup>	44 <sup>AB</sup>	40 <sup>AB</sup>	46 <sup>AB</sup>	37 <sup>AB</sup>	
	13.-18.	18	14	87 <sup>AB</sup>	62 <sup>AB</sup>	50 <sup>AB</sup>	44 <sup>AB</sup>	44 <sup>AB</sup>	37 <sup>B</sup>	
	0.-18.	50	45	201 <sup>AB</sup>	157 <sup>AB</sup>	132 <sup>AB</sup>	116 <sup>AB</sup>	124 <sup>AB</sup>	105 <sup>AB</sup>	
Retina	0.-6.	5	8	3	0	5	1	6	20	
	7.-12.	9	1	0	1	8	1	3	7	
	13.-18.	2	0	0	0	4	0	0	3	
	0.-18.	16	9	3	1	17	2	9	30	

<sup>A</sup> signifikant besser als Kontrolle 1 bei  $p \leq 0,05$

<sup>B</sup> signifikant besser als Kontrolle 2 bei  $p \leq 0,05$

Am deutlichsten war der Rückgang der Regeneration bei 'Pinova' ausgeprägt. Hier trat bei den Kontrollen zwischen der 13. und 18. Woche ein Rückgang der Sprosszahlen im Vergleich zu den ersten sechs Wochen um etwa 25 % auf, während bei den meisten Inhibitorvarianten wesentlich höhere Rückgangsraten (bis zu 70 % bei 50  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) zu verzeichnen waren.

Völlig anders reagierten die Genotypen 'Reka' und 'Remo' mit zunehmender Kultivierungszeit auf die Inhibitorbehandlung. In Abhängigkeit von Inhibitorart und -konzentration trat eine mehr oder weniger deutliche Steigerung der Regenerationsleistung im Vergleich zu den ersten sechs Wochen ein. Beide Genotypen unterschieden sich jedoch im zeitlichen Regenerationsverhalten ihrer Kontrollen. Während bei 'Reka' in der dritten Beobachtungsphase mehr als das Dreifache der Sprosse als in der ersten Phase gebildet wurden, d. h. mit fortschreitender Kulturdauer die Regenerationsfähigkeit deutlich zunahm, blieb sie bei 'Remo' während der drei Beobachtungsphasen gleich. Die Steigerungsraten im Vergleich zur dazugehörigen Kontrolle waren auch bei 'Reka' in der ersten Phase am höchsten. Nur bei 'Remo' erzielten die Inhibitoren im Gegensatz zu den anderen Genotypen die höchste Effektivität erst in der dritten Beobachtungsphase.

Beide Inhibitoren besaßen eine genotypabhängige unterschiedliche Wirksamkeit. Varianzanalysen, die für jede Kultivierungsphase über alle Genotypen und die drei Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors durchgeführt worden waren, zeigten, dass  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  in den ersten zwölf Wochen genotypspezifischer wirkte als NaF (Tab. A.12 und A.13). Insbesondere 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious' und 'Pinova' sprachen besser auf  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  an. Demgegenüber ermöglichte NaF bei 'Remo' höhere Sprosserträge. Im allgemeinen wurde die Varianz zwischen den Versuchsergebnissen der Inhibitorbehandlungen zu jedem Boniturzeitpunkt jedoch stärker vom Genotyp als vom jeweiligen Inhibitor und dessen Konzentration beeinflusst.

Obwohl die drei Konzentrationen beider Inhibitoren bei nahezu allen Genotypen eine Zunahme der Regenerationsleistung bewirkten, waren insbesondere bei  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen zu verzeichnen, die am deutlichsten nach der sechsten Woche hervortraten und mit steigender Kultivierungsdauer abnahmen (Tab. A.13). Bei der Mehrzahl der Genotypen erwiesen sich zu allen drei Boniturzeitpunkten 50  $\mu\text{M}$  als optimal, während 100  $\mu\text{M}$  die ungünstigste Konzentration darstellte. Bei NaF hingegen konnten bei Betrachtung der Gesamtheit der Genotypen nur in der sechsten Woche signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen beobachtet werden (Tab. A.12). Aber auch bei diesem Inhibitor zeigten sich in der Mehrzahl der Varianten Genotyp  $\times$  Kultivierungsphase die Konzentrationen 5 und 50  $\mu\text{M}$  überlegen.

### Experiment 3

Die Zugabe von NaF bzw.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zum Nährmedium wirkte sich bei der überwiegenden Mehrzahl der Kalluslinien positiv auf die Sprossbildung aus. Die detaillierte Zusammenstellung der Ergebnisse bezüglich der pro Variante erzielten Sprosszahlen ist in Tab. 3.8 zu finden.

Wenigstens an einem der Boniturzeitpunkte zeigten 71,4 % der Kalluslinien einen signifikant höheren Sprossertrag als die dazugehörige Kontrolle. 'Elstar' und 'Remo', deren Kontrollkalli keinen bzw. nur einen Spross regenerierten, konnten erst durch die Inhibitorbehandlungen zur Sprossregeneration angeregt werden. Bei den ebenfalls kaum regenerationsfähigen Kalli von 'Retina' konnte zumindest mit  $50 \mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$  eine verbesserte Regenerationsfähigkeit erzielt werden. Auch das vergleichsweise niedrige Regenerationsvermögen der Kontrollkalli von 'Golden Delicious' konnte durch die Inhibitorwirkung entscheidend verbessert werden und erreichte somit Werte, die teilweise sogar über denen von 'Pinova' lagen.

Die Hauptursache der oftmals signifikanten Erhöhung des Sprossertrages liegt in der Erhöhung der Anzahl der sprossbildenden Kalli, deren prozentualen Anteile als Regenerationsraten in Tab. A.21 dargestellt sind. Eine gleichzeitige Erhöhung der Anzahl der pro regenerierenden Kallus gebildeten Sprosse fand nicht in jedem Fall statt.

Die insgesamt positive Wirkungsweise beider Inhibitoren war gekennzeichnet durch Unterschiede, die durch den Genotyp, die Kultivierungsphase und die Art des Inhibitors bzw. dessen Konzentration hervorgerufen worden sind. Am häufigsten setzte eine signifikante Erhöhung der Sprossregeneration bis zur ersten Bonitur in der sechsten Woche ein. Auch die dritte Kultivierungsphase zeigte nach unmittelbar vorausgegangener Medienerneuerung zu Beginn der 13. Woche besonders bei 'Golden Delicious', aber auch bei 'Gala' und 'Pinova' in einigen Behandlungen einen signifikanten Regenerationsanstieg. Bezüglich der optimalen Inhibitorbehandlung waren deutliche genotypische Unterschiede vorhanden. Während beispielsweise 'Reka' mit  $5 \mu\text{M}$  NaF die meisten Sprosse bildete, war diese Behandlung für die anderen Genotypen weniger effektiv. 'Gala' und 'Pinova' reagierten sogar mit z. T. signifikant niedrigerer Sprosszahl im Vergleich zur Kontrolle; die Kallusproliferation war jedoch stark erhöht. Der gleiche Effekt trat bei 'Gala' nochmals bei der Behandlung mit  $5 \mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$  auf, die bei anderen Genotypen signifikant bessere Ergebnisse bewirkte. Für 'Elstar', 'Gala' und 'Remo' erwies sich die Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  NaF als die günstigste.

**Tab. 3.8:** Anzahl der an Kalluskulturen regenerierten Sprosse in Abhängigkeit von der Kultivierungsphase und verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Konzentrationen.

Genotyp	Kultivierungsphase (Woche)	Behandlung und Konzentration (µM)							
		Kontrolle	NaF				Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		
			0	5	50	100	5	50	100
Elstar	0.-6.	0	5	7 <sup>A</sup>	18 <sup>A</sup>	20 <sup>A</sup>	28 <sup>A</sup>	42 <sup>A</sup>	
	7.-12.	0	11	2	20 <sup>A</sup>	11	4	7	
	13.-18.	0	5	9	30 <sup>A</sup>	14 <sup>A</sup>	13 <sup>A</sup>	10	
	19.-24.	0	3	0	15 <sup>A</sup>	6	2	5	
	0.-24.	0	24 <sup>A</sup>	18 <sup>A</sup>	83 <sup>A</sup>	51 <sup>A</sup>	47 <sup>A</sup>	64 <sup>A</sup>	
Gala	0.-6.	140	52 <sup>B</sup>	123	157	91 <sup>B</sup>	212 <sup>A</sup>	175	
	7.-12.	20	25	93 <sup>A</sup>	101 <sup>A</sup>	32 <sup>A</sup>	57 <sup>A</sup>	35 <sup>A</sup>	
	13.-18.	67	32 <sup>B</sup>	89	124 <sup>A</sup>	88	128 <sup>A</sup>	85	
	19.-24.	17	12	35	38	25	5	3	
	0.-24.	244	121 <sup>B</sup>	340	420 <sup>A</sup>	236	402 <sup>A</sup>	298	
Golden Delicious	0.-6.	11	22	30	37 <sup>A</sup>	40 <sup>A</sup>	77 <sup>A</sup>	45 <sup>A</sup>	
	7.-12.	7	10	7	15	15	16	4	
	13.-18.	2	6	14 <sup>A</sup>	19 <sup>A</sup>	21 <sup>A</sup>	19 <sup>A</sup>	8	
	19.-24.	1	0	3	10	3	10	5	
	0.-24.	21	38	54	81 <sup>A</sup>	79 <sup>A</sup>	122 <sup>A</sup>	62	
Pinova	0.-6.	26	16 <sup>B</sup>	38 <sup>A</sup>	26	50 <sup>A</sup>	62 <sup>A</sup>	40 <sup>A</sup>	
	7.-12.	15	9	26	9	21	16	15	
	13.-18.	4	2	10	8	14 <sup>A</sup>	12 <sup>A</sup>	5	
	19.-24.	0	1	5	1	0	10	0	
	0.-24.	45	28 <sup>B</sup>	79 <sup>A</sup>	44	85 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	60	

Tab. 3.8: Fortsetzung.

Genotyp	Kultivierungsphase (Woche)	Behandlung und Konzentration ( $\mu\text{M}$ )							
		Kontrolle	NaF				Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		
			0	5	50	100	5	50	100
Reka	0.-6.	20	85 <sup>A</sup>	36 <sup>A</sup>	35 <sup>A</sup>	44 <sup>A</sup>	51 <sup>A</sup>	25	
	7.-12.	39	31	32	43	52	28	31	
	13.-18.	59	72	30	54	71	35	48	
	19.-24.	4	14	8	1	5	2	7	
	0.-24.	122	202 <sup>A</sup>	106	133	172	116	111	
Remo	0.-6.	1	10 <sup>A</sup>	19 <sup>A</sup>	43 <sup>A</sup>	8 <sup>A</sup>	10 <sup>A</sup>	2	
	7.-12.	0	4	15	16	0	2	0	
	13.-18.	0	0	2	26	0	4	0	
	19.-24.	0	0	0	8 <sup>A</sup>	0	0	0	
	0.-24.	1	14 <sup>A</sup>	36 <sup>A</sup>	93 <sup>A</sup>	8 <sup>A</sup>	16 <sup>A</sup>	2	
Retina	0.-6.	1	1	2	0	0	9 <sup>A</sup>	0	
	7.-12.	0	0	0	0	0	3	0	
	13.-18.	0	0	0	0	0	5	0	
	19.-24.	0	0	0	0	0	0	0	
	0.-24.	1	1	2	0	0	17 <sup>A</sup>	0	

<sup>A</sup> signifikant besser als Kontrolle bei  $p \leq 0,05$

<sup>B</sup> signifikant schlechter als Kontrolle bei  $p \leq 0,05$

Von den  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Behandlungen war im Mittel aller Genotypen die Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  die effektivste. Bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$  wurden zwar in einigen Fällen noch höhere Sprosszahlen als in der Kontrolle erzielt; im Vergleich zu anderen Behandlungen zeichnete sich jedoch eine gewisse hemmende Wirkung ab.

Varianzanalytische Untersuchungen zur Abschätzung des Einflusses der drei Konzentrationsstufen des jeweiligen Inhibitors, des Genotyps und der Wechselwirkung beider Faktoren zeigten, dass auch innerhalb der Kalluskulturen die Variabilität der Sprosserträge zu jedem Boniturzeitpunkt zu einem wesentlich größeren Teil durch den Genotyp als durch die Konzentration des Inhibitors bestimmt wurde (Tab. A.22 und A.23).  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  wirkte bis zur 18. Woche wiederum wesentlich genotypspezifischer als NaF. Bis zu diesem Zeitpunkt lag der Anteil der genotypbedingten Variation an der Gesamtvariation in Abhängigkeit von der Kultivierungsphase für NaF zwischen 53,8 und 64,2 %, für  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  dagegen zwischen 82,3 und 88,1 %. Während der letzten Kultivierungsphase (19.-24. Woche) sank dieser genotypbedingte Anteil bei NaF auf 32,6 % und bei  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  sogar auf nur 25,6 %. Beide Werte lagen damit jedoch auch zu diesem Zeitpunkt noch deutlich über den konzentrationsbedingten Anteilen, die zu den vier Boniturzeiten Größenordnungen zwischen 7,9 und 13,2 % (NaF) und 1,4 und 4,0 % ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) aufwiesen.

### 3.3.3.2 Endothall

#### Experiment 1

Im ersten Versuch mit dem Phosphataseinhibitor Endothall, in Konzentrationen von 1 bis 100  $\mu\text{M}$  dem Medium zugesetzt, zeigte sich zwischen den Inhibitorvarianten eine sehr hohe Variabilität der Sprosserträge. Die Hauptursache lag im gewählten Konzentrationsbereich begründet, dessen Einfluss um ein Mehrfaches größer war als der des Genotyps bzw. der Wechselwirkung beider Faktoren (Tab. A.24).

Bereits zwei Wochen nach dem Aufsetzen zeigten die Explantate konzentrationsbedingte Unterschiede im äußeren Erscheinungsbild. Während sie auf den Kontrollmedien und unter dem Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  Endothall eine deutliche Flächenzunahme im Vergleich zur ursprünglichen Größe und eine geschlossene Kallusbildung am Rand aufwiesen, verringerten sich bei 5  $\mu\text{M}$  beide Effekte. Ab 25  $\mu\text{M}$  traten keine Explantatvergrößerungen und Kallusbildungen mehr auf. Demgegenüber waren ab dieser Konzentration in zunehmendem Maße starke Verbräunungen am gesamten Rand sowie auf der Explantatfläche sichtbar. Mit Ausnahme von 'Elstar' und 'Golden Delicious' starb bei den anderen Genotypen maximal ein Drittel der Explantate bei 50 bzw. 100  $\mu\text{M}$  ab.

**Tab 3.9:** Anzahl regenerierter Sprosse unter dem Einfluss von Endothall in Konzentrationen von 0 bis 100  $\mu\text{M}$ . Die Werte repräsentieren den Gesamtertrag aus drei Wiederholungen mit je zehn Explantaten.

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Anzahl regenerierter Sprosse pro Genotyp						
	Elstar	Gala	Golden Delicious	Pinova	Reka	Remo	Retina
0 (Kontrolle 1)	29	89	33	117	31	7	2
0 (Kontrolle 2)	26	88	30	113	30	6	3
1	70 <sup>AB</sup>	109	130 <sup>AB</sup>	280 <sup>AB</sup>	50	47 <sup>AB</sup>	11 <sup>AB</sup>
5	20	22 <sup>CD</sup>	33	37 <sup>CD</sup>	5 <sup>CD</sup>	2 <sup>CD</sup>	1
25	2 <sup>CD</sup>	3 <sup>CD</sup>	3 <sup>CD</sup>	5 <sup>CD</sup>	1 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	2
50	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	0
100	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	0 <sup>CD</sup>	1 <sup>CD</sup>	0

- A signifikant besser als Kontrolle 1 bei  $p \leq 0,05$   
 B signifikant besser als Kontrolle 2 bei  $p \leq 0,05$   
 C signifikant schlechter als Kontrolle 1 bei  $p \leq 0,05$   
 D signifikant schlechter als Kontrolle 2 bei  $p \leq 0,05$

Wie durch das äußere Erscheinungsbild der Explantate schon erkennbar, hatte die Anwendung von Endothall in der Konzentrationsspannweite von 0 bis 100  $\mu\text{M}$  auch sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Regeneration. Die Ergebnisse bezüglich der Sprossanzahlen sind in Tab. 3.9 ersichtlich, während die Regenerationsraten der Versuchsvarianten in Tab. A.28 zusammengefasst sind.

Durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Endothall konnte die Sprossregeneration im Vergleich zur Kontrolle bei fünf der sieben Genotypen signifikant erhöht werden; zudem wiesen die übrigen beiden Genotypen ebenfalls höhere Werte als die Kontrollen auf.

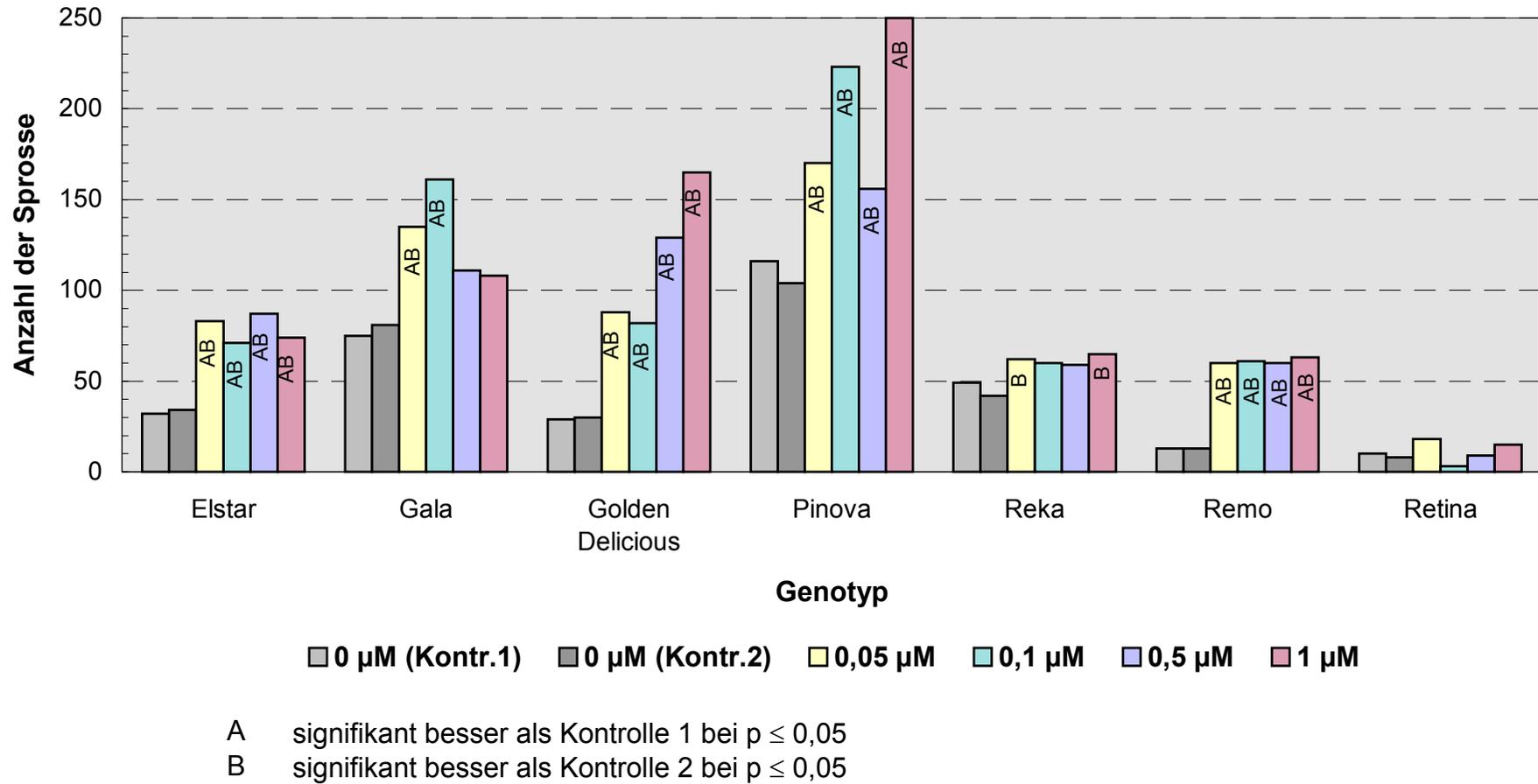
Die Steigerungsraten waren stark genotypabhängig ausgeprägt. Die geringste mit rund 10 % wiesen 'Gala' und 'Reka' auf. Das Maximum hingegen erreichte 'Remo'. Dieser Genotyp regenerierte unter dem Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  Endothall die sieben- bis achtfache Sprossmenge gegenüber der Kontrolle. Der positive Effekt dieser Konzentration auf den Sprossertrag war größtenteils wiederum das Ergebnis vermehrter Sprossbildungen an einer gleichzeitig größeren Anzahl regenerierender Explantate.

### **Experiment 2**

Endothall-Konzentrationen im Bereich von 0,05 bis 1  $\mu\text{M}$  führten zu weitaus homogeneren Sprosserträgen als die im vorangegangenen Experiment gewählten höheren Konzentrationen. Die Variabilität der Sprosserträge wurde signifikant durch den Genotyp allein sowie durch dessen Wechselwirkung mit der Konzentration hervorgerufen. Der Höhe der Konzentration hatte in diesem Bereich keinen signifikanten Einfluss auf die Sproßregeneration (Tab. A.27).

Im Vergleich zu den Kontrollvarianten führten einige bzw. alle Endothallbehandlungen bei den Genotypen 'Elstar', 'Gala', 'Golden Delicious', 'Pinova' und 'Remo' zu einer signifikanten Erhöhung der Regenerationsleistung (Abb. 3.8). 'Reka' regenerierte im Vergleich zu den Kontrollen in allen vier Endothallbehandlungen zwar ebenfalls mehr Sprosse; Signifikanz ließ sich jedoch nur in zwei Fällen gegenüber nur einer Kontrolle nachweisen. Keinen signifikanten Einfluss hatte die Anwendung des Inhibitors hingegen auf 'Retina'.

Ein allgemeines Optimum für den geprüften Konzentrationsbereich konnte aufgrund der Unterschiede zwischen den Genotypen nicht ermittelt werden. Während bei 'Elstar' und 'Remo' sowie – mit der Einschränkung der überwiegenden Nichtsignifikanz der Ergebnisse – bei 'Reka' über alle Konzentrationen hinweg sehr einheitliche Sprossanzahlen erzielt wurden, erhöhten sich tendenziell die Werte bei 'Golden Delicious' und 'Pinova' mit steigendem Endothallgehalt des Mediums. Demgegenüber schienen die beiden niedrigeren Konzentrationen 0,05 und 0,1  $\mu\text{M}$  bei 'Gala' einen deutlich günstigeren Effekt zu haben als die beiden höheren.



**Abb. 3.8:** Sprossregeneration ausgewählter Genotypen unter dem Einfluss von Endothall in Konzentrationen von 0 bis 1  $\mu\text{M}$ . Die Werte repräsentieren den Gesamtertrag aus drei Wiederholungen mit je zehn Explantaten.

In Bezug auf die Kontrollwerte erwiesen sich die Endothallbehandlungen am effektivsten bei 'Remo' und 'Golden Delicious'. Beide Genotypen waren in der Lage, in den günstigsten Konzentrationen ihre Sprossregenerationen auf etwa das Fünffache zu steigern.

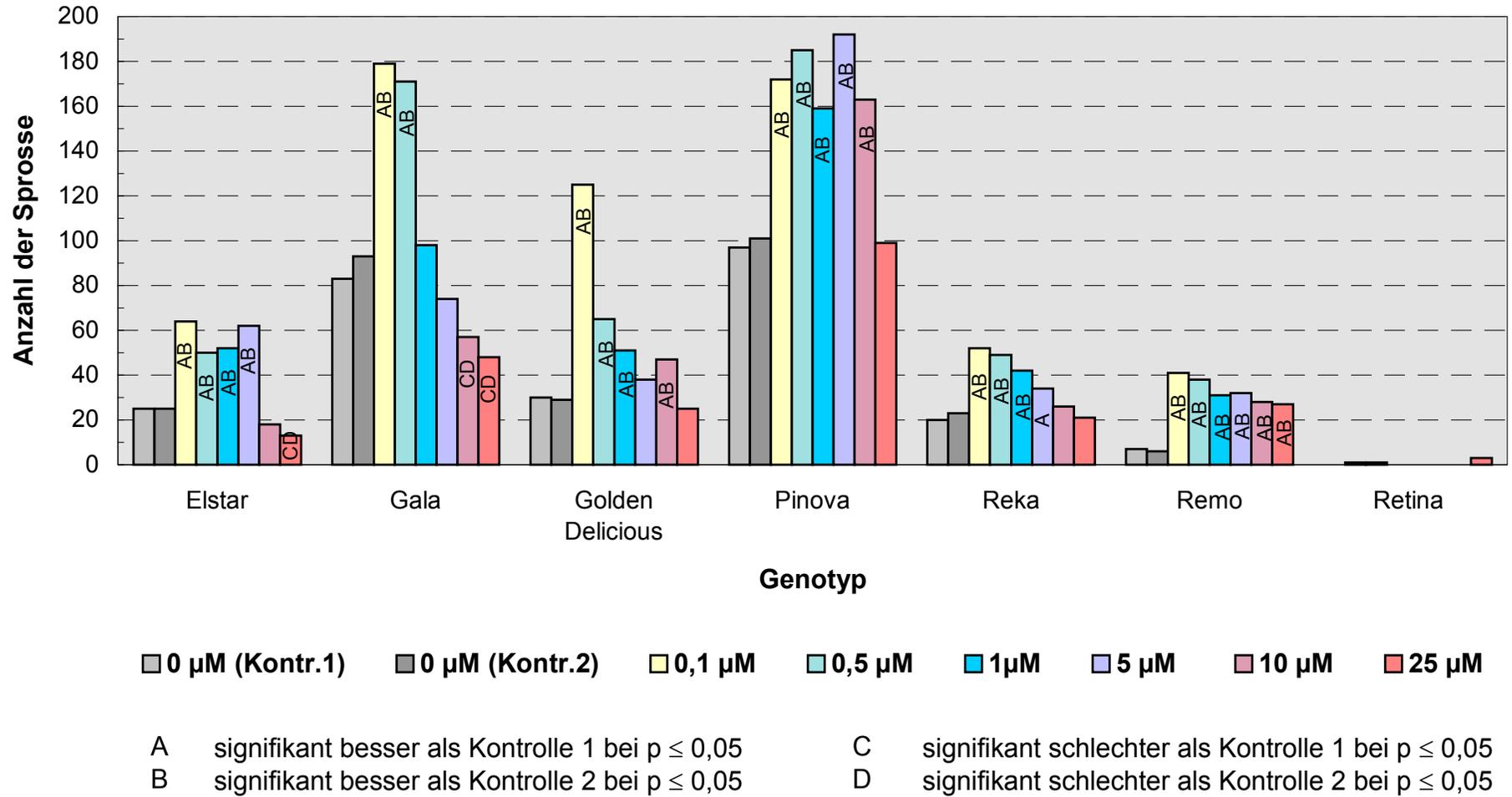
Die insgesamt erhöhten Gesamtsprosserträge waren wiederum bedingt durch die in Tab. A.29 dargestellten verbesserten Regenerationsraten sowie der Steigerung der Sprossanzahlen der regenerierenden Explantate, wobei 'Pinova' mit einer nahezu gleichbleibenden sehr hohen Regenerationsrate und durchschnittlich über neun Sprossen pro regenerierendes Explantat bei 0,5 und 1  $\mu\text{M}$  das Maximum erreichte.

### 3.3.3.3 L-p-Bromotetramisoxalat

Die Zugabe von L-p-Bromotetramisoxalat in Konzentrationen von 0,1 bis 25  $\mu\text{M}$  führte zu Sprosserträgen, deren Variabilität zum überwiegenden Teil durch den Genotyp sowie in deutlich geringerem Maße durch die Konzentration und die Wechselwirkung beider Faktoren signifikant bestimmt wurde (Tab. A.30).

Im Vergleich zu den beiden Kontrollen bewirkte die Zugabe bestimmter Konzentrationen des Inhibitors bei allen getesteten Genotypen mit Ausnahme von 'Retina' eine gesteigerte Regenerationsleistung. Im Allgemeinen erwies sich die mit 0,1  $\mu\text{M}$  niedrigste Konzentration sowohl bezüglich der Anzahlen der regenerierten Sprosse, die in Abb. 3.9 dargestellt sind, als auch hinsichtlich der Regenerationsraten (Tab. A.32) als optimal. Mit zunehmender Konzentration sanken beide Parameter ab. Eine Ausnahme bildete der Genotyp 'Pinova', bei dem bei den Konzentrationen bis einschließlich 10  $\mu\text{M}$  kein tendenzieller Rückgang der Regenerationsleistung zu verzeichnen war.

Die Spannweite der Konzentrationen, die eine signifikante Erhöhung der Regeneration erlaubten, war stark vom Genotyp abhängig. Während bei 'Gala' nur 0,1 und 0,5  $\mu\text{M}$  einen signifikanten Anstieg der Sprossanzahlen bewirkten und ab 10  $\mu\text{M}$  bereits eine signifikante Verschlechterung der Regenerationsfähigkeit auftrat, zeigte sich bei 'Remo' trotz der mit steigender Konzentration sinkenden Effektivität noch bei 25  $\mu\text{M}$  eine signifikante Überlegenheit. Im Allgemeinen deutete sich ab 10 bis 25  $\mu\text{M}$  eine hemmende Wirkung an. Wie schon bei Zugabe von NaF,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und Endothall zeigte sich auch bei L-p-Bromotetramisoxalat eine genotypabhängige unterschiedliche Effektivität hinsichtlich des Steigerungsvermögens der Regenerationsleistung. Die höchste Steigerungsrate hatte wieder-



**Abb. 3.9:** Sprossregeneration ausgewählter Genotypen unter dem Einfluss verschiedener L-p-Bromtetramisoloxalat-Konzentrationen. Die Werte repräsentieren den Gesamtertrag aus drei Wiederholungen mit je zehn Explantaten.

um 'Remo' zu verzeichnen, bei dem sich die Sprossbildungen auf das Sechs- bis Siebenfache erhöhten.

### 3.3.4 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren

Unabhängig vom Genotyp zeigten die Explantate, die unter dem Einfluss der beiden Proteinkinaseinhibitoren standen, im Gegensatz zu den Kontrollexplantaten bereits nach drei Wochen erste Alterungserscheinungen. Die meisten waren gekennzeichnet durch eine blassgrüne Farbe und eine furchige Oberfläche mit verdickten Blattadern. Außerdem trat ab der vierten Woche eine im Vergleich zu den Kontrollvarianten stärkere und im Verlauf der achtwöchigen Beobachtungszeit kontinuierlich anhaltende Kallusneubildung vom Rand her auf.

Zum ersten Boniturzeitpunkt vier Wochen nach der Inkulturnahme wiesen je nach Genotyp ein bis zwei Drittel der Kontrollexplantate sichtbare Sprossregenerationen auf. Im Gegensatz dazu zeigte keines der Explantate auf den inhibitorhaltigen Medien Sprossbildungen (Tab. 3.10). Erst zur zweiten Bonitur, d. h. sechs Wochen nach der Inkulturnahme, konnten die ersten Sprossregenerationen auf diesen Medien nachgewiesen werden. Die Anzahl der zu diesem Zeitpunkt unter dem Einfluss der Proteinkinaseinhibitoren regenerierenden Explantate sowie die Anzahl der insgesamt gebildeten Sprosse lag jedoch stets unter den Kontrollwerten; fünf der sechs Inhibitorvarianten waren in beiden Parametern signifikant schlechter.

Das Regenerationsverhalten zwischen der sechsten und achten Woche war in Abhängigkeit von der Behandlung und vom Genotyp unterschiedlich ausgeprägt. Während in diesem Zeitraum die Kontrollvarianten von 'Golden Delicious' und 'Pinova' nur noch einen bzw. zwei neue Sprosse an den Explantaten bildeten, die schon zuvor Regenerationen gezeigt hatten, war bei *M. robusta* nochmals eine deutliche Sprosszunahme zu verzeichnen. Einige dieser Sprossneubildungen konnten an Explantaten beobachtet werden, die vorher noch nicht regeneriert hatten. Ungeachtet der genotypbedingten Unterschiede wurden in beiden Inhibitorbehandlungen zwischen der sechsten und achten Woche mehr Sprosse gebildet als in den Kontrollvarianten, wobei einige Explantate erstmals zur Regeneration kamen.

In der achten Woche lag die Mehrzahl der Inhibitor  $\times$  Genotyp-Kombinationen in beiden geprüften Merkmalen zwar noch mehr oder weniger deutlich unter den Kontrollwerten, die Unterschiede waren jedoch bis auf eine Ausnahme nicht mehr signifikant. *M. robusta* hatte unter dem Einfluss von Proteinkinaseinhibitor 2 sogar das Niveau der Kontrolle erreicht.

**Tab. 3.10:** Kumulative Regenerationsleistungen von Primärexplantaten unter dem Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren im Vergleich zur inhibitorfreien Kontrolle in Abhängigkeit vom Boniturzeitpunkt. Die Werte repräsentieren die Summe aus drei Wiederholungen mit je fünf Explantaten.

Genotyp	Proteinkinase-inhibitor	Anzahl regenerierter Sprosse nach			Anzahl regenerierender Explantate nach		
		4 Wochen	6 Wochen	8 Wochen	4 Wochen	6 Wochen	8 Wochen
Golden Delicious	ohne (Kontrolle)	6	11	12	5	8	8
	PKI 1	0 *	0 *	3	0 *	0 *	3
	PKI 2	0 *	4 *	9	0 *	4 *	6
Pinova	ohne (Kontrolle)	20	31	33	10	13	13
	PKI 1	0 *	4 *	14	0 *	4 *	6
	PKI 2	0 *	2 *	10 *	0 *	1 *	6
<i>M. robusta</i>	ohne	11	21	31	8	9	11
	PKI 1	0 *	4 *	16	0 *	3 *	4
	PKI 2	0 *	11	33	0 *	8	11

\* signifikant schlechter als Kontrolle bei  $p \leq 0,05$

Kontroll- und Inhibitorvarianten unterschieden sich bei der Bonitur mit dem Stereomikroskop hinsichtlich des Ursprungs der Sprossregeneration. Auf dem Kontrollmedium schienen sich die Sprosse etwa zu gleichen Teilen direkt am Explantat sowie aus dem am Explantatrand gebildeten Kallus zu entwickeln, während die Sprosse unter Inhibitoreinfluss offensichtlich ausschließlich aus dem stark proliferierenden Kallus wuchsen.

### 3.3.5 Einfluss der Phosphatkonzentration

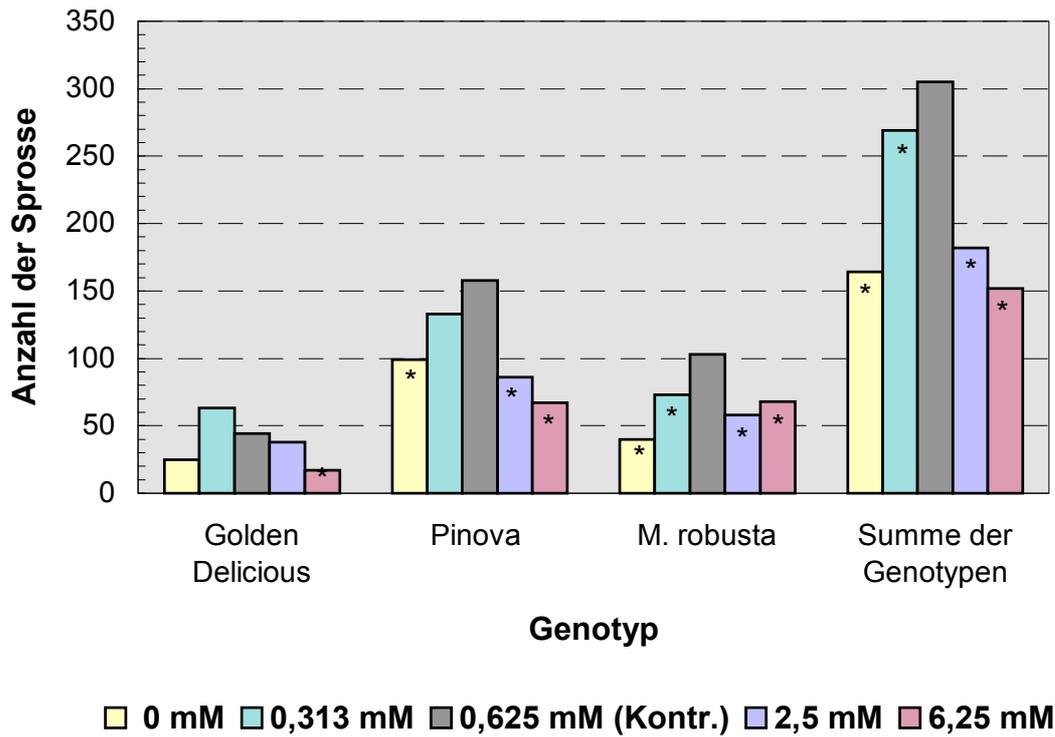
Unterschiedliche  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentrationen im Nährmedium, die bei den Genotypen 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* im Bereich von 0 bis 6,25 mM getestet wurden, beeinflussten signifikant die Höhe der Adventivsprossbildung. Die genotypbedingte Varianz der Sprosserträge war allerdings noch größer als die durch die  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentrationen hervorgerufene (Tab. A.35).

Bezüglich der Gesamtzahlen der regenerierten Sprosse lagen die optimalen Konzentrationen in Abhängigkeit vom Genotyp bei 0,313 und 0,625 mM (Abb. 3.10). Phosphatfreies Medium und Konzentrationen ab 2,5 mM hemmten größtenteils signifikant die Sprossbildung.

Ein ähnliches Bild zeigte sich hinsichtlich der Regenerationsraten. Wie in Abb. 3.11 ersichtlich, wurden die höchsten Werte bei 'Golden Delicious' und 'Pinova' bereits bei einem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Gehalt von 0,313 mM erzielt, für *M. robusta* lag das Optimum bei der Kontrollkonzentration 0,625 mM. Bei darüber liegenden Konzentrationen sank die Regenerationsrate in Abhängigkeit vom Genotyp mehr oder weniger deutlich ab.

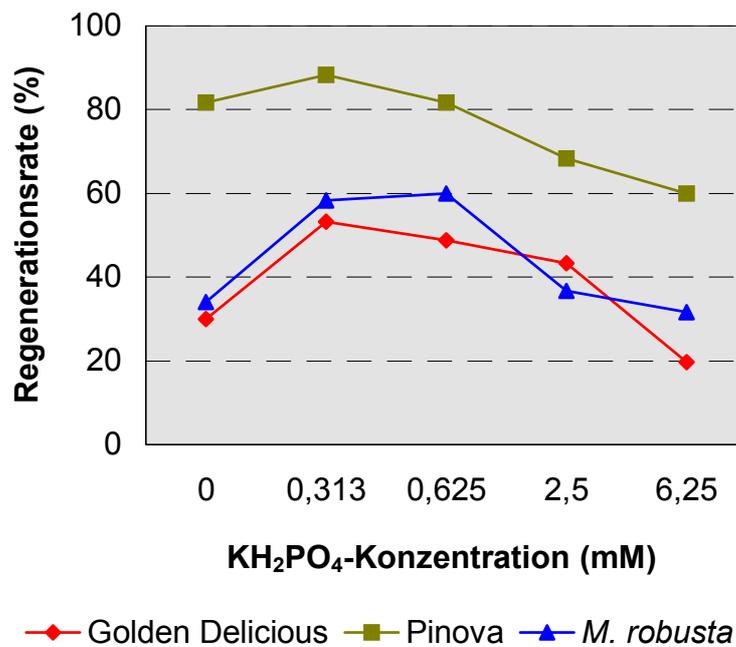
In der Anzahl der pro regenerierendes Explantat gebildeten Sprosse zeigten sich größere genotypabhängige Unterschiede. Während 'Pinova' das Optimum bei 0,625 mM erreichte sowie höhere bzw. niedrigere Konzentrationen ein entsprechendes Absinken der Werte bewirkten, wies 'Golden Delicious' innerhalb der getesteten Konzentrationen die geringsten Schwankungen mit einem Optimum bei 0,313 mM auf. Die regenerierenden Explantate von *M. robusta* hingegen zeigten mit zunehmender Konzentration tendenziell mehr Sprossbildungen, was den leichten Anstieg der Gesamtsprossanzahl bei 6,25 mM im Vergleich zu 2,5 mM zur Folge hatte.

Hinsichtlich des äußeren Erscheinungsbildes der Explantate waren im getesteten Konzentrationsbereich keine Unterschiede festzustellen, wohl aber im Aussehen der Sprosse. Im Vergleich zu den normal entwickelten Sprossen der Bezugskonzentration 0,625 mM zeigten die Sprosse der übrigen Medien mehr oder weniger starke Auffälligkeiten.



\* signifikant schlechter als Kontrollvariante 0,625 mM bei  $p \leq 0,05$

**Abb. 3.10:** Sprossregeneration verschiedener Genotypen in Abhängigkeit von der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration. Die Werte repräsentieren den Gesamtertrag aus drei Wiederholungen mit je 20 Explantaten.



**Abb. 3.11:** Regenerationsraten von Primärexplantaten der Genotypen 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* in Abhängigkeit von der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration.

Während sie bei 0,313 mM nach anfänglich gehemmtem Wachstum keinen Unterschied mehr zu den Sprossen der Bezugsvariante aufwiesen, blieben Sprosse, die gänzlich ohne  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  regeneriert worden waren, klein und zeigten oft fadenförmige Blätter. Sprosse, die sich unter dem Einfluss von 2,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gebildet hatten, waren ebenfalls schwächer und wuchsen meist nicht weiter. Am negativsten wirkte sich die höchste  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration aus, unter deren Einfluss nur noch winzige, z. T. albinotische Sprosse beobachtet werden konnten.

## 3.4 Diskussion

### 3.4.1 Isoenzymmuster in Regenerationssystemen

#### Regenerationsleistungen

Um Veränderungen im Isoenzymmuster der Regenerationssysteme "Primärexplantat" und "subkultivierte Kalluskultur", die mit der Fähigkeit zur Regeneration im Zusammenhang stehen könnten, zu finden, sollten zunächst in den Versuchsvarianten in unterschiedlichem Umfang Regenerationsvorgänge ausgelöst werden. Entscheidend dafür war die Wahl der verwendeten Nährmedien und Genotypen. Die Nährmedien mussten einerseits Regenerationen ermöglichen und andererseits Regenerationen verhindern; die Genotypen sollten über ein unterschiedliches genetisches Regenerationspotential verfügen. Hinsichtlich der Regeneration an Primärexplantaten liegen vielfältige Erfahrungswerte vor. So beruhte das Medium R4, auf welchem Regenerationen stattfinden sollten, in leicht modifizierter Form auf einer Rezeptur, die am Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz für eine Reihe von Genotypen, darunter 'Golden Delicious' und 'Pinova', erfolgreich getestet worden war (HANKE et al. 1991). 'Golden Delicious' hatte sich dabei durch eine mittlere und 'Pinova' durch eine hohe Regenerationsbereitschaft ausgezeichnet. Von Medium R3 hingegen konnte aufgrund des engen NAA/BAP-Verhältnisses kein regenerationsfördernder Einfluss angenommen werden, denn als regenerationsauslösend hatten sich bei Verwendung dieser beiden Hormone Konzentrationsverhältnisse erwiesen, die zu Gunsten von BAP weiter auseinander lagen (JAMES et al. 1988, WELANDER 1988, PREDIERI und FASOLO FABRI MALAVASI 1989). Außerdem enthielt R3 die MS-Nährsalze in voller Konzentration. Frühere Untersuchungen hatten jedoch gezeigt, dass Varianten des MS-Mediums in halber Stärke sowie der Einsatz der cytokinin-ähnlichen Substanz TDZ anstelle von BAP wesentlich effektiver sind (ELOBEIDY und KORBAN 1988, HANKE et al. 1991).

Berichte über Sprossregenerationen aus Kalluskulturen sind mehrheitlich durch geringe Regenerationsraten gekennzeichnet (LIU et al. 1983, JAMES et al. 1984, DUFOUR 1990). Eine vergleichsweise hohe Regenerationsrate (30 %) konnten nur JAMES et al. (1984) unter Verwendung eines auxinfreien Mediums bei Internodienkalli der Unterlage M25 erzielen. Aufgrund der geringeren positiven Erfahrungen mit diesem Kultursystem wurden drei Medien – R1 und R2 als regenerationsfördernde und R3 als regenerationshemmendes Medium – sowie nur die bei Primärexplantaten gut regenerierenden Genotypen 'Pinova' und *M. robusta* eingesetzt.

Die in beiden Kultursystemen erzielten Ergebnisse entsprachen sowohl bezüglich der gewählten Medien als auch der Unterschiede in der Regenerationsfähigkeit der Genotypen den Erwartungen. Die Regenerationsleistungen der Primärexplantate von 'Pinova' und 'Golden Delicious' stimmen gut mit den Ergebnissen von HANKE et al. (1991) überein. Für den sehr gut regenerierenden *M. robusta* hingegen, der im Hinblick auf die Erweiterung des Genotypenspektrums in die Untersuchungen einbezogen worden war, ist kein Vergleich möglich, da dieser erstmals getestet wurde.

Die im System der Kalluskulturen erzielten Ergebnisse haben gezeigt, dass für die Höhe der Regeneration neben dem Medium und dem Genotyp das Ursprungsgewebe der Kalli eine entscheidende Rolle spielt. Dabei scheint auch dieser Einflussfaktor stark vom Genotyp abhängig zu sein.

### **Isoenzymanalysen**

Enzyme unterliegen im Verlauf von Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen in pflanzlichen Geweben gewissen Veränderungen, die sich in der Aktivität und/oder im Isoenzymmuster zeigen und somit die unterschiedliche Expression genetischer Information, durch die Differenzierung und Entwicklung hervorgerufen werden, widerspiegeln (SCANDALIOS 1969, 1974).

In diesem Sinn konnten in Abhängigkeit vom Enzym in unterschiedlichem Maße Variationen zwischen den Isoenzymmustern festgestellt werden. Sie ergaben sich aus der Kultivierungsdauer, den Unterschieden zwischen Ausgangsgewebe und kultivierten Geweben sowie der medien- und genotypabhängigen Fähigkeit zur Regeneration, aber auch aus dem Regenerationssystem.

Die oftmals beobachteten Unterschiede in der Bandenzahl zwischen differenzierten und nicht differenzierten Geweben zeigten sich nur bei den Enzymen ADH und PRX. In beiden Fällen ging die Dedifferenzierung mit einer Erhöhung der Bandenzahl einher. Untersuchungen von DEL GROSSO und ALICCHIO (1981) und BASSIRI und CARLSON (1978),

die verschiedene Sämlingsgewebe von *Solanum melongena* bzw. der Gartenbohne mit den dazugehörigen Kallusgeweben verglichen, zeigten in den jeweiligen Kalluskulturen eine erhöhte Bandenanzahl bei verschiedenen Peroxidasen, Polyphenoloxidasen, der ACP und der MDH. Bei Tabak konnten in Abhängigkeit von der Kallusart sowohl mehr als auch weniger MDH-Banden als im Ausgangsgewebe festgestellt werden, in jedem Fall waren jedoch Unterschiede zwischen Kallus- und Ausgangsgewebe vorhanden (BASSIRI und CARLSON 1979).

Neben den relativ geringen Unterschieden, die sich zwischen differenzierten und undifferenzierten Geweben ergeben hatten, waren auch die Unterschiede zwischen beiden Regenerationssystemen nur gering. Als nahezu identisch erwiesen sich beide Kallusarten. In der Literatur liegen hinsichtlich eines Vergleichs verschiedener Kallusarten unterschiedliche Ergebnisse vor. Während ARNISSON und BOLL (1974) sowie BASSIRI und CARLSON (1978) bei der Gartenbohne nur wenige Unterschiede fanden, zeigten sich bei Tabak neben einigen Übereinstimmungen in der Position der Banden größere Unterschiede in deren Anzahl (BASSIRI und CARLSON 1979). Von sehr großen Unterschieden bei der Kichererbse berichteten IQBAL et al. (1989). Hier waren die Kalli in Position und Anzahl der Banden absolut verschieden.

Eine Ursache für die beobachteten geringen Unterschiede bzw. die Übereinstimmungen könnte in der Nutzung von juvenilen In-vitro-Geweben als Donormaterial, das in Blättern und Internodien qualitativ identische Zymogramme aufwies, zu suchen sein. Als anderer Grund könnten die Stoffwechselfunktionen der einzelnen untersuchten Enzyme genannt werden, die offensichtlich nicht alle an Dedifferenzierungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt zu sein scheinen.

Einer der wenigen Unterschiede zwischen beiden Regenerationssystemen bestand im früheren Einsetzen des Abbaus enzymatischer Aktivität für ADH, DIA, EST und PRX bei den Explantaten, der sich in Banden- und Intensitätsverlusten äußerte. Bei Berücksichtigung des äußeren Erscheinungsbildes der Explantate und Kalli ergab sich diese Beobachtung als Folge eines unterschiedlich verlaufenden Alterungsprozesses. Die Explantate wiesen bereits zum frühesten Zeitpunkt des Aktivitätsrückgangs in der zehnten Woche erste sichtbare Alterserscheinungen auf, während die Kalli noch eine deutliche Proliferation zeigten. Ein Zusammenhang zwischen Aktivitätsverlust und Regenerationsvermögen war jedoch nur bei PRX insofern vorhanden, als dass regenerierende Explantate im Vergleich zu nicht regenerierenden einem langsameren Abbau ihrer enzymatischen Aktivität ausgesetzt waren. Als Marker für die Vorhersage von Regenerationsereignissen ist diese Beobachtung jedoch

nicht geeignet, da sie erst dann sichtbar hervortritt, wenn der überwiegende Teil der Regenerationsvorgänge bereits stattgefunden hat. Eine vergleichsweise höhere Bandenanzahl und -intensität könnte höchstens darauf hindeuten, dass das betreffende Regenerat seine Regenerationsfähigkeit noch nicht endgültig verloren hat.

Ein ähnlicher indirekter Hinweis über noch zu erwartende Regenerationsleistungen bei Kalluskulturen könnte möglicherweise aus den Zymogrammen der MDH abgeleitet werden. Allerdings müssen sie sich dazu jedoch bereits in der Regeneration befinden, da dieselben Zymogrammveränderungen auch bei nicht regenerierenden Kalli auftraten. Die Verringerung der Enzymaktivität auf der anodischen Gelseite und die gleichzeitige Intensitätssteigerung bzw. Wiederaktivierung der zu Locus *Mdh-(3)* gehörenden Banden korrelierte mit abnehmender Kallusproliferation bei gleichzeitig zunehmender Verhärtung des Gewebes einerseits und abnehmenden Regenerationsraten andererseits.

Berichte über direkte Zusammenhänge zwischen bestimmten Isoenzymmustern und morphogenetischen Reaktionen in Gewebekulturen, die sowohl die Entstehung somatischer Embryonen als auch Spross- und Wurzelbildungen über Organogenese umfassen, liegen von verschiedenen Pflanzenarten vor. Am häufigsten wurden Veränderungen im PRX-Muster beschrieben (u. a. KEVERS et al. 1981, SWARNAKAR et al. 1986, KAY und BASILE 1987, ABE und FUTSUHARA 1989, RAO et al. 1989), aber auch Variationen bei ACP (SWARNAKAR et al. 1986), EST (CHIBBAR et al. 1988) oder LAP (SRIVASTAVA und STEINHAEUER 1981) korrelierten mit Differenzierungsvorgängen. In den eigenen Untersuchungen zeigten sich Hinweise auf mögliche Korrelationen zwischen der Expression einer zusätzlichen kathodischen PRX-Bande und vorhandener Regenerationsfähigkeit der Kalli von *M. robusta* sowie zwischen erhöhter Intensität der ACP-Banden 4 und 5 und nicht vorhandener Regenerationsfähigkeit in Explantat- und Kalluskulturen bei allen getesteten Genotypen. Da die Intensitätserhöhung im ACP-Muster im Vergleich zur beschriebenen PRX-Bande nicht genotypspezifisch in nur einem Regenerationssystem aufgetreten war, sondern eine gewisse Allgemeingültigkeit zu besitzen schien, wurde sie zum Gegenstand weiterer Untersuchungen, die den vermuteten Zusammenhang bestätigen sollten.

### **3.4.2 ACP-Muster und Regenerationsfähigkeit**

Saure Phosphatasen sind in Zellen allgemein präsent und wurden bei Pflanzen in Verbindung mit der Zellwand (ARNISON und BOLL 1978), Dictyosomen und Plastiden (BORNMAN 1974, zit. in DE und ROY 1984) beschrieben. Ihre Funktion besteht in der Hydrolyse von

Phosphormonoesterbindungen von Alkyl- und Arylphosphatestern unter Abspaltung von Phosphorsäure, das pH-Optimum liegt zwischen 4 und 6 (VAN ETTEN et al. 1974). Sauren Phosphatasen wurden eine spezifische Rolle während der Stratifizierung und Keimung von Samen (RYCHTER et al. 1972, JOHNSON et al. 1973, MANGANARIS und ALSTON 1988b) sowie während der Autolyse von Zellen, der Xylemdifferenzierung und der Ligninsynthese (DE und ROY 1984) zugeschrieben. Das Enzym wurde auch mit unterschiedlichen Ergebnissen in Verbindung mit organogenetischen Prozessen in Kallusgeweben untersucht. SWARNAKAR et al. (1986) beobachteten in Kalluskulturen von *Solanum surattense* eine zusätzliche Isoenzymbande bzw. eine Erhöhung der Enzymaktivität kurz vor dem Erscheinen von Sprossen bzw. Wurzeln. In sprossbildenden Kalluskulturen der Birke hingegen konnte keine Veränderung im ACP-Isoenzymmuster nachgewiesen werden (SRIVASTAVA und STEINHAEUER 1981). Bei Apfel führte der Vergleich der ACP-Zymogramme regenerierender und nicht regenerierender Explantate und Kallusgewebe zu der in Kap. 3.3.1 dargelegten Vermutung zwischen ACP-Muster und Regenerationsvermögen.

Die Ergebnisse der möglicherweise erstmals in dieser Form durchgeführten Experimente, in denen die Regenerationsraten mit den Häufigkeiten der verschiedenen Bandenmustertypen verglichen sowie die Unabhängigkeit von Regenerationsfähigkeit und Bandenausprägung statistisch geprüft wurde, bestätigten den vermuteten Zusammenhang. Regenerierende Explantate und Kallusgewebe weisen normale und damit unauffällige Intensitäten der Bande 4 und 5 auf (Typ 1), starke Intensitäten an beiden Positionen (Typ 3) deuten auf nicht vorhandene Regenerationsfähigkeit. Der Bandenmustertyp 2, der jedoch nur bei Explantaten beobachtet wurde, stellt eine Zwischenstufe mit unterschiedlichen Entwicklungsrichtungen zwischen beiden Extremen dar. Bei Explantaten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung – wie beispielsweise kurz nach der Inkulturnahme – noch keine sichtbare Regeneration zeigen, weist dieser Typ auf die ablaufende Reduzierung der ACP-Aktivitäten und eine bevorstehende Regeneration hin. Deutlich wird dies bei Vergleich der in Experiment 2 für die Genotypen 'Golden Delicious' und 'Pinova' ermittelten Häufigkeiten der Bandenmustertypen und der Regenerationsraten, die in Tab. 3.2, S. 102 dargestellt worden sind. Die Summen der in der zweiten Woche vorhandenen Typen 1 und 2 stimmten sehr gut mit den Regenerationsraten der vierten Woche überein. Vergleicht man weiterhin die Summen beider Typen in der vierten Woche mit den in Experiment 1 für die sechste Woche gefundenen Regenerationsraten, so kann ähnliches festgestellt werden. Die ACP-Muster können somit sehr gut als Marker für das zu erwartende Regenerationsverhalten eingesetzt werden. Die für *M. robusta* in Experiment 2 ermittelten Werte – trotz hoher Regenerationsrate in der vierten

Woche waren in der zweiten Woche nur Explantate des Typs 3 vorhanden – zeigen jedoch auch, dass im Prozess der Erlangung der Regenerationsfähigkeit zeitliche Unterschiede bestehen, die auf den Genotyp zurückzuführen sind. Bei einem Einsatz dieses Markers, beispielsweise zur Testung der Regenerationseignung verschiedener Kultivierungsbedingungen im Vorfeld sichtbarer Regenerationen, müsste dieses unterschiedliche genotypische Verhalten in der Wahl des jeweils geeigneten Untersuchungszeitpunktes berücksichtigt werden.

Die andere Entwicklungsrichtung, die Typ 2 verkörpern kann, kam bei Explantaten, die schon Sprosse regeneriert hatten, zum Ausdruck. Hier wies das Vorhandensein des Typs 2 auf den Rückgang der Regenerationsfähigkeit hin. Dies wird anhand des Vergleiches der in Tab. 3.1, S. 101 angegebenen Häufigkeitswerte der zehnten Woche mit den Regenerationsraten der sechsten Woche unter Berücksichtigung des zwischen beiden Bonituren verzeichneten Rückganges der Regenerationsfähigkeit deutlich.

Im Regenerationssystem der Kalluskulturen sind in Abhängigkeit von der Versuchsdurchführung unterschiedliche Ergebnisse erzielt worden. Die Untersuchung der kompletten Kalli ergab auch bei vorhandener Regeneration nur den Bandentyp 3, während bei partiellen Gewebeuntersuchungen auch Typ 1 gefunden werden konnte. Die Ursache ist in der Inhomogenität der Kalli zu suchen, die sich nicht nur optisch (vgl. Kap. 3.3.1, S. 95), sondern auch in der unterschiedlichen Regenerationsfähigkeit der Teilkomplexe äußerte. Regenerierende Kalli bildeten die Sprosse nur in abgegrenzten Regionen aus, die sich in der Regel optisch vom übrigen Kallusgewebe unterschieden. Das möglicherweise in den regenerierenden Regionen vorhandene ACP-Muster normaler Intensität wurde somit bei der Extraktion des gesamten Kallus von der starken Intensität der nicht regenerierenden Regionen überlagert. Bei einer Nutzung der ACP-Muster als Marker in Kalluskulturen sollten somit nicht die Gesamtkalli sondern nur einzelne Gewebeproben pro Kallus untersucht werden.

Im Gegensatz zu den Explantaten wurde der Bandenmustertyp 2 nicht in den Kallusgeweben gefunden. Der Grund hierfür könnte in der subjektiven Selektion der untersuchten Gewebeteile liegen, bei der entweder nur unmittelbar regenerierende Regionen mit oftmals mehreren jungen Sprossen bzw. Sprossknospen oder nicht regenerierende Regionen, die sich im Aussehen deutlich von den regenerierenden unterschieden, berücksichtigt wurden.

Mit den Tests auf Unabhängigkeit der Merkmalskombinationen, in denen die Nullhypothese in nahezu allen zugrundegelegten Versuchsvarianten abgelehnt worden war, konnten die beobachteten Zusammenhänge zwischen Regenerationsraten und Häufigkeiten der einzelnen

Bandenmustertypen statistisch bekräftigt werden. Der Anteil der Explantate und Kallusteile, die zum Untersuchungszeitpunkt trotz sichtbarer Regeneration hohe ACP-Intensitäten bzw. bei unauffälligen Intensitäten keine Regeneration zeigten, war sehr gering. Die Abweichungen sind wahrscheinlich bedingt durch die zeitlich verschobene Abfolge des Intensitätswechsels und des Sichtbarwerdens der Regenerate.

Die deutlichen Unterschiede, die sich zwischen den Medien in der Förderung bzw. Hemmung der Regeneration der Primärexplantate ergeben haben, spiegelten sich auch im äußeren Erscheinungsbild der kultivierten Gewebe wider (vgl. Kap. 3.3.1, S. 93). Besonders gut sichtbar waren die Unterschiede in der Alterung der Explantate, die auf R3 wesentlich früher und stärker in Erscheinung traten als auf R4. Alterndes Gewebe verliert die Fähigkeit zur Zellteilung, die jedoch für die Bildung von Sprossmeristemen benötigt wird. Auf R3 traten keine Regenerationen auf, das ACP-Muster war ausschließlich durch hohe Intensitäten der Banden 4 und 5 geprägt. Diese Zusammenhänge weisen Parallelen zu den von DE und ROY (1984) in subkultivierten Kalluskulturen von *Vigna unguiculata* beobachteten ACP-Mustern auf. Mit der Bildung von teilungsunfähigen gestreckten, durch dichtes Cytoplasma und verdickte Zellwände charakterisierte Zellen sowie dem Beginn der Xylemdifferenzierung sowie der Autolyse der Zellen trat eine neue intensive ACP-Bande gekoppelt mit der Erhöhung der ACP-Gesamtaktivität in Erscheinung. Unter Berücksichtigung dieser und der eigenen Beobachtungen könnte die Korrelation zwischen Regenerationsunfähigkeit und erhöhter Intensität der Banden 4 und 5 als Folge zu schwacher oder nicht vorhandener Zellteilungsaktivität gesehen werden.

### **3.4.3 Einfluss von Phosphataseinhibitoren**

Der aufgezeigte Zusammenhang zwischen der Aktivität zweier ACP-Banden und der Regenerationsfähigkeit führte zu der Überlegung, die Wirkung von Phosphataseinhibitoren in Bezug auf die Regenerationsfähigkeit der Explantat- und Kalluskulturen zu testen. In der Grundlagenforschung werden Inhibitoren von Phosphatasen und ihren Gegenspielern, den Kinasen, zur Untersuchung von Signalketten genutzt. Phosphorylierungen von Proteinen und Enzymen durch Kinasen sowie deren Dephosphorylierung durch Phosphatasen stellen wichtige Regulationsmechanismen für die Aktivierung bzw. Deaktivierung dieser Verbindungen dar. Reversible Phosphorylierungen kontrollieren somit fundamentale zelluläre Prozesse wie Stoffwechsel, Kontraktionsfähigkeit, Membrantransport, Sekretion, Transkription und Translation von Genen, Zellteilung oder Befruchtung (COHEN 1989). Sehr weit

fortgeschritten sind die Untersuchungen des koordinierten Zusammenspiels von Phosphatasen und Kinasen im Bereich der Humangenetik. Proteinphosphatasen und -kinasen werden z. B. in Verbindung mit der Signaltransduktion bei der Krebsentstehung und der Wachstumskontrolle von Tumoren diskutiert (DAUM et al. 1994, BÖHMER 1997, WITTINGHOFFER 1998). Dementsprechend spielen Inhibitoren dieser Enzyme eine Rolle bei der Förderung bzw. Hemmung von Krebsgeschwülsten (SUGANUMA et al. 1990, KOVACH et al. 1992). Es ist daher denkbar, dass Phosphataseinhibitoren ebenso wie Proteinkinaseinhibitoren eine Wirkung auf die Teilung und Differenzierung von Pflanzenzellen ausüben können.

Wie die Versuche gezeigt haben, war es möglich, die Regenerationsfähigkeit sowohl der Primärexplantate als auch der Kalluskulturen durch die Behandlung mit den Phosphataseinhibitoren innerhalb bestimmter Konzentrationsbereiche positiv zu beeinflussen. In vielen Genotyp  $\times$  Inhibitor  $\times$  Konzentrations-Kombinationen konnten die Sprosserträge auf signifikantem Niveau gegenüber der Kontrolle gesteigert werden. Innerhalb der Kalluskulturen wurde der Genotyp 'Elstar' überhaupt erst durch die Zugabe von NaF bzw.  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zur Regeneration angeregt. Wie mit NaF und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  in beiden Regenerationsystemen veranschaulicht worden ist, kann die Wirkung der Inhibitoren auch über einen längeren Zeitraum hinweg zur Erhöhung der Sprosserträge ausgenutzt werden. Eine wesentliche Rolle hinsichtlich der langanhaltenden positiven Wirkung spielt dabei sicherlich auch die sichtbare deutliche Verzögerung des Alterungsprozesses der Gewebe im Vergleich zu den Kontrollvarianten. Diese Beobachtung stellt gewissermaßen die entgegengesetzte Tendenz zur beobachteten schnelleren Alterung von Geweben auf regenerationshemmenden Medien im Vergleich zu regenerationsfördernden Medien dar (vgl. Kap. 3.3.1, S. 93) und bekräftigt demzufolge den in Kap. 3.4.1, S. 133 diskutierten Zusammenhang zwischen Regenerationsunfähigkeit und möglichen Verlust der Teilungsfähigkeit infolge Alterung.

Nur in vergleichsweise wenigen Inhibitorvarianten wurden signifikant schlechtere Regenerationsergebnisse als in den Kontrollen erzielt. Im ersten Endothallversuch waren diese zurückzuführen auf eine zu hoch gewählte Konzentration, die bei deutlicher Überschreitung von  $1 \mu\text{M}$  toxische Wirkungen auf die Explantate entfaltete. Demgegenüber kann die geringere Regenerationsfähigkeit einiger Kalluslinien, die ausschließlich nur bei der niedrigsten der geprüften NaF- und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Konzentrationen ( $5 \mu\text{M}$ ) zu verzeichnen war, die Folge der möglicherweise zu starken Kallusproliferation und damit der Hemmung von Differenzierungsvorgängen sein. Dieses Ergebnis deutet auf eine konzentrationsabhängige unterschiedliche Wirkungsweise der Inhibitoren in den Kalluskulturen hin. Ähnliche

Beobachtungen wurden von KOVACH et al. (1992) beschrieben. Die Autoren stellten bei höheren Konzentrationen verschiedener Phosphataseinhibitoren, u. a. auch bei  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , eine mit der Hemmung der Tyrosin-Dephosphorylierung einhergehende Hemmung der Proliferation von Krebszellen fest, während mit niedrigeren Dosen eine leichte, aber konstante Stimulierung der Koloniebildung und -größe stattfand.

Trotz der insgesamt positiven Wirkung auf die Regenerationsfähigkeit blieben genotypbedingte Unterschiede erhalten. Sie äußerten sich einerseits in der Höhe der Maximalsprosserträge, andererseits aber auch in der Effektivität der Inhibitorarten sowie in den optimalen Konzentrationen der einzelnen Inhibitoren. 'Pinova', *M. robusta* und 'Gala' erzielten sowohl ohne als auch mit Inhibitoren die höchsten Sprossanzahlen, während die anderen Genotypen ein z. T. deutlich niedrigeres Regenerationspotential besaßen.

Bei Vergleich der Regenerationsleistungen, die unter dem Einfluss positiv wirkender Inhibitorkonzentrationen erzielt worden sind, mit den Ergebnissen anderer Publikationen zu Regenerationsexperimenten wird der fördernde Effekt der Phosphataseinhibitoren bestätigt. Explantate von 'Golden Delicious' erreichten ohne Phosphataseinhibitoren stets Regenerationsraten zwischen 25 und 60 % (DUFOUR 1990, HANKE et al. 1991, KORBAN et al. 1992, DURHAM und KORBAN 1994). Bei Anwendung der Phosphataseinhibitoren lagen die Regenerationsraten z. T. sehr deutlich über 60 %. Beim Genotyp 'Pinova', der in den Untersuchungen von HANKE et al. (1991) bis zu 85 % regenerierende Explantate in den besten Versuchsvarianten gezeigt hatte, bildeten oft alle Explantate Sprosse, wenn dem Grundmedium NaF oder  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zugegeben worden war. Für die mehrfach resistenten Genotypen 'Remo' und 'Reka' erzielten die vorstehend genannten Autoren nur niedrige Regenerationsleistungen. In den hier beschriebenen Experimenten zeigte 'Reka' ein höheres Regenerationsniveau auf dem Kontrollmedium, obwohl dieses nur geringfügig von der von HANKE et al. (1991) verwendeten Zusammensetzung abwich. Durch die Zugabe der Phosphataseinhibitoren erhöhten sich die Sprosserträge dieser Explantate oftmals beträchtlich (vgl. Tab. 3.6, S. 108, Tab. 3.7, S. 111/112, Abb. 3.8, S. 120, Abb. 3.9, S. 122). Eine weitere drastische Verbesserung der Sprossbildung konnte für die Explantate des Genotyps 'Retina', der offensichtlich ebenfalls durch ein niedriges Regenerationspotential gekennzeichnet ist, zumindest im ersten Experiment zur Prüfung von NaF und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  beobachtet werden. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass Phosphataseinhibitoren gerade in Genotypen mit einem geringen Regenerationspotential sehr effizient wirken. Unter dem Einfluss der Phosphataseinhibitoren konnten diese Genotypen oft das Niveau der Genotypen

erreichen, die sich ohne Inhibitoren durch ein mittleres Regenerationspotential auszeichnen. Ähnliche Tendenzen zeigten sich auch bei den Kalluskulturen.

Bei Betrachtung aller Experimente wiesen vergleichbare Varianten hinsichtlich des Regenerationspotentials eine gute Reproduzierbarkeit auf. Unterschiedliche Aussagen bezüglich der signifikanten Überlegenheit der Inhibitorvarianten ergaben sich nur bei Vergleich der beiden ersten Experimente mit den Substanzen NaF und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  für die Genotypen 'Elstar', 'Gala' und am deutlichsten für 'Retina' (vgl. Tab. 3.6, S. 108, Tab. 3.7, S. 111/112). Als Ursache hierfür kann eine latente Verunreinigung des Pflanzenmaterials mit bakteriellen Endophyten vermutet werden, die zwar kaum an den Donorsprossen, dafür jedoch an den Explantaten sichtbar war. Während 'Gala' und 'Elstar' nur im ersten NaF/ $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Experiment in geringem Ausmaß betroffen waren, erwies sich 'Retina' im zweiten und dritten NaF/ $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Experiment sowie in den nachfolgenden Experimenten mit Endothall und L-p-Bromotetramisoloxalat als sehr stark kontaminiert. Bakterielle Verunreinigungen können zu einer Verringerung der Multiplikationsrate in der In-vitro-Vermehrung und bei sehr starker Konzentration sogar zum Tod der Kulturen führen (LEIFERT et al. 1991). In den hier beschriebenen Experimenten beeinträchtigten sie offenbar die Regenerationsfähigkeit, sodass auch die Phosphataseinhibitoren keine oder nur eine eingeschränkte Wirksamkeit besaßen. Mit Ausnahme des ersten NaF/ $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Experiments ist der fehlende regenerationsfördernde Einfluss der Inhibitoren bei 'Retina' daher sicherlich eher als eine Folge der starken bakteriellen Kontamination als einer genotypbedingten Unempfindlichkeit gegenüber Phosphataseinhibitoren zu interpretieren.

Für die getesteten Phosphataseinhibitoren sind aus der Literatur spezifische Wirkungsbereiche bekannt. Während  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  eine hemmende Wirkung auf Tyrosin-Proteinphosphatasen ausübt, gilt NaF als Inhibitor von Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (TONKS et al. 1989). Vanadiumionen können jedoch auch Saure Phosphatasen (VAN ETTEN et al. 1974) und Alkalische Phosphatasen (LOPEZ et al. 1976) hemmen. Endothall, ein Herbizid, ist als Inhibitor verschiedener Serin/Threonin-Proteinphosphatasen bekannt (LI und CASIDA 1992, LI et al. 1993). L-p-Bromotetramisol zeigte einen hemmenden Effekt gegenüber der Alkalischen Phosphatase (VAN BELLE et al. 1977, zit. bei KOVACH et al. 1992) sowie gegenüber Tyrosin-Proteinphosphatasen (KOVACH et al. 1992). In den Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden sind, übten alle vier Inhibitoren einen vergleichbaren fördernden Einfluss auf die pflanzliche Regeneration aus. Dieses Ergebnis könnte auf eine generelle Wirkung von Phosphataseinhibitoren hindeuten.

### 3.4.4 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren

Kinasen stellen als phosphorylierende Enzyme die Gegenspieler der dephosphorylierenden Phosphatasen dar, d. h. sie übertragen Phosphatreste des Adenosintriphosphats auf andere Verbindungen, die dadurch aktiviert werden. Da die Hemmung von Dephosphorylierungen zu einer Förderung der Regenerationsfähigkeit in den getesteten Geweben geführt hatte, sollte nun geprüft werden, ob die Hemmung von Kinaseaktivitäten eine gegenteilige Wirkung hervorruft.

Proteinkinaseinhibitor 1 gilt als spezifischer Inhibitor der kalzium- und phospholipidabhängigen Proteinkinase C (PROMEGA 2002), während Proteinkinaseinhibitor 2 die phosphorylierende Aktivität der cAMP-spezifischen Kinase hemmt (BROSTROM und KON 1974). Ungeachtet dieser unterschiedlichen Spezifitäten war ihr Einfluss auf das Erscheinungsbild und die Sprossbildung der Explantate gleich. Wie bei den Phosphataseinhibitoren könnte dies ein Hinweis auf ein breiteres Wirkungsspektrum der Substanzen sein.

Die Inhibitorvarianten unterschieden sich hinsichtlich des optisch sichtbaren Alterungsprozesses sowie der Fähigkeit zur Kallus- und Sprossbildung unter Berücksichtigung der Kultivierungszeit von den Kontrollvarianten. Einerseits schien das kultivierte Blattgewebe schneller zu altern als auf dem Kontrollmedium, andererseits jedoch zeigten die Explantate unter Inhibitoreinfluss eine stärkere Kallusproliferation am Rand der Explantate. Diese offensichtlich widersprüchliche Wirkung auf differenziertes und undifferenziertes Gewebe ist – auch aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten – nur sehr schwer erklärbar. Eine Rolle könnte jedoch die sich möglicherweise verändernden Aktivitäten der Inhibitoren spielen. Beide Inhibitoren sind bei Raumtemperatur instabil. Denkbar wäre es – wenn auch sehr spekulativ –, dass sie nur eine kurze Zeit nach der Inkulturnahme der Explantate ihre volle Wirkung entfalten konnten. Die vorübergehende Hemmung der Kinasen könnte indirekt Regelmechanismen in Gang gesetzt haben, die zu einer Begünstigung der Kallusproliferation führten. Ein Absinken der Aktivität könnte jedoch auch direkt zu einer effektiven Konzentration geführt haben, die eine vermehrte Bildung von undifferenziertem Gewebe begünstigt hat.

Das auf den Inhibitormedien im Vergleich zu den Kontrollvarianten verspätete Einsetzen der Regeneration deutet ebenfalls auf eine zeitlich begrenzte Wirksamkeit der Inhibitoren hin. Unter Inhibitoreinfluss konnten erst nach sechs Wochen die ersten Sprossbildungen bonitiert werden, während auf dem Kontrollmedium bereits nach vier Wochen Regenerationsvorgänge stattgefunden hatten. Die Unterlegenheit der Inhibitormedien während der ersten sechs Wochen der Kultivierung zeigte sich deutlich in den nachgewiesenen signifikanten

Unterschieden hinsichtlich der Anzahl der regenerierenden Explantate sowie der regenerierten Sprosse.

Eine verstärkte Sprossbildung setzte erst zwischen der sechsten und achten Woche ein. Aufgrund fehlender histologischer Untersuchungen ist die Beobachtung, dass die Sprosse nur vom Kallus gebildet wurden, spekulativ. Das Blattgewebe, dessen Erscheinungsbild mit dem der nicht regenerationsfähigen Explantate auf Medium R3 vergleichbar war (vgl. Kap. 3.3.1, S. 93), sowie die Tatsache, dass kein einziger Spross deutlich erkennbar aus diesem Gewebe regeneriert wurde, erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit dieser Vermutung.

Ein gezielter Einsatz von speziellen biochemischen Inhibitoren im Rahmen von pflanzlichen In-vitro-Regenerationsexperimenten kann dazu dienen, beteiligte Stoffwechsel- und Regelmechanismen zu erkennen. Kürzlich konnten MURCH et al. (2001) an Explantaten des Johanniskrautes mittels Inhibitoren des Transports und der Wirkung von Indolaminen zeigen, dass die Verschiebung des Gleichgewichts von Serotonin und Melatonin von großer Bedeutung für das endogene Auxin/Cytokinin-Verhältnis und damit für die morphogenetische Reaktion ist. Im vorliegenden Versuch spiegeln die mit den Proteinkinaseinhibitoren erzielten Ergebnisse deutlich eine Hemmung der Sprossbildung bis zur sechsten Woche der Kultivierung wider. Die Effektivität der Proteinkinaseinhibitoren, die in Zusammenhang mit der entgegengesetzten Effektivität der Phosphataseinhibitoren zu sehen ist, bekräftigt somit die Beteiligung von reversiblen Phosphorylierungen im Prozess der Regulierung von Regenerationsvorgängen zumindest bei Apfel, möglicherweise jedoch auch bei der pflanzlichen Regeneration im Allgemeinen. Die Ergebnisse stellen somit einen Ansatzpunkt für weiterführende, detaillierte Untersuchungen hinsichtlich der Regulation von pflanzlichen Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen dar, die neben ihrer wissenschaftlichen auch eine erhebliche praktische Bedeutung haben können.

### **3.4.5 Einfluss der Phosphatkonzentration**

In Gewebekulturen kann die Aktivität Saurer Phosphatasen unter anderem durch die Konzentration des anorganischen Phosphats im Nährmedium beeinflusst werden. So stellten beispielsweise ZINK und VELIKY (1979) in Zellkulturen einer *Ipomea*-Art die gesteigerte Aktivität von zwei spezifischen Sauren Phosphatasen bei Phosphatmangel im Nährmedium fest. Unter Zugrundelegung des Zusammenhanges zwischen der Aktivität der ACP-Banden 4 und 5 und der Regenerationsfähigkeit somatischer Gewebe bei Apfel erschien es daher denkbar, dass die Änderung der Phosphatkonzentration zu einer Variation des Regenerations-

verhaltens führen könnte. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten diese Vermutung. In Abhängigkeit des betrachteten Kriteriums – Anzahl der gebildeten Sprosse oder Anzahl der regenerierenden Explantate – erwiesen sich entweder die  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentrationen 0,313 oder 0,625 mM, die einem Viertel bzw. der Hälfte des  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Gehaltes des MS-Standardmediums entsprechen, als optimal, wobei sich deutliche genotypische Unterschiede in der jeweiligen optimalen Konzentration zeigten. In der Summe der drei getesteten Genotypen regenerierten die meisten Sprosse auf dem Kontrollmedium (0,625 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sodass dieses als das durchschnittlich günstigste angesehen werden kann.

Der Einfluss von Makroelementen auf die Adventivsprossbildung bei Apfel ist in einer Reihe von Arbeiten Gegenstand der Betrachtungen gewesen (WELANDER 1988, FASOLO et al. 1989, PREDIERI und FASOLO FABRI MALAVASI 1989, HANKE et al. 1991). Die Arbeiten konzentrierten sich dabei fast ausschließlich auf die Testung von Grundmedien mit unterschiedlichem Gehalt an Makronährstoffen sowie auf die Variation in der Gesamtheit der Komponenten. Von den einzelnen Nährelementen ist in der Literatur nur Stickstoff hinsichtlich seines Gesamtgehaltes und im Verhältnis Ammonium- zu Nitrationen bei gleichzeitiger Beibehaltung der anderen Medienkomponenten diskutiert worden. In Abhängigkeit vom Genotyp zeigte die Reduktion des Stickstoffgehaltes entweder keinen oder einen positiven Effekt auf das Regenerationsvermögen (FASOLO et al. 1989, PREDIERI und FASOLO FABRI MALAVASI 1989). In beiden Arbeiten wurde eine Verschiebung des Ammonium/Nitrat-Verhältnisses zugunsten der Nitrationen als günstig bewertet.

Hinsichtlich der Eignung verschiedener Grundmedien weisen die Ergebnisse z. T. Widersprüche auf, wobei jedoch zu beachten ist, dass für die einzelnen Untersuchungen unterschiedliche Genotypen und Hormonkombinationen bzw. -konzentrationen, die zu den grundlegenden Einflussfaktoren zählen, genutzt worden sind. Während WELANDER (1988) und FASOLO et al. (1989) das Grundmedium N6 (CHU et al. 1975) gegenüber dem LS-Medium (LINSMAIER und SKOOG 1965) favorisierten, erzielten HANKE et al. (1991) auf N6 wesentlich schlechtere Ergebnisse als auf MS-Medium und seinen Variationen. Das MS-Medium ist durch die gleichen Makronährstoffkomponenten und -konzentrationen wie das LS-Medium gekennzeichnet, während sich das N6-Medium vom LS- bzw. MS-Medium durch niedrigere Konzentrationen an Stickstoff, Kalzium, Magnesium und Ammoniumionen sowie durch höhere Kalium- und Phosphorgehalte unterscheidet.

Ein Vergleich der Ergebnisse der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Variation mit den Ergebnissen von HANKE et al. (1991) erscheint aufgrund der Ähnlichkeiten bezüglich der untersuchten Genotypen, des modifizierten MS-Grundmediums und der Übereinstimmung im Hormongehalt naheliegend.

In der zitierten Arbeit hatten sich die voll- und halbkonzentrierten MS-Medien in den durchschnittlichen Werten für die Regenerationsrate und die pro Explantat gebildeten Sprosse nicht unterschieden. Auf dem halbkonzentrierten MS-Medium, das nur in leicht veränderter Form als Grund- und Kontrollmedium für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche diente, reagierte jedoch die größere Anzahl der Genotypen. Die in Abb. 3.11, S. 126 veranschaulichten höheren Regenerationsraten von 'Golden Delicious' und 'Pinova' bei noch geringerer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration (0,313 mM) zeigt Parallelen zu der bei HANKE et al. (1991) beschriebenen breiten Eignung des halbkonzentrierten MS-Grundmediums. Andererseits erwiesen sich die beiden höchsten  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentrationen 2,5 mM und 6,25 mM als ungünstig. Auch hier deuten sich Ähnlichkeiten zu den von den vorstehend genannten Autoren beobachteten schlechteren Ergebnissen auf dem N6-Medium an, dessen  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration bei 2,94 mM liegt. Es kann somit vermutet werden, dass eine Ursache für die unterschiedliche Eignung von verschiedenen Grundmedien im  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Gehalt zu suchen ist.

Die aufgezeigten Ergebnisse heben deutlich die Rolle dieses Salzes für den erfolgreichen Ablauf von Regenerationsvorgängen hervor. Obwohl die Substanz neben Phosphor mit Kalium einen zweiten Hauptnährstoff enthält, kann ihre Wirkung dennoch dem Phosphor zugeschrieben werden, da der größte Teil des Kaliumbedarfs – im Kontrollmedium beispielsweise 95,3 % – über die in ihrer Menge unveränderte Komponente  $\text{KNO}_3$  abgedeckt wurde. Mangel an Phosphor führt bei intakten Pflanzen infolge seiner Beteiligung am Aufbau der Nukleoproteide zu Zellteilungsstörungen. Die geringeren Regenerationswerte und die kleinen Sprosse können das Ergebnis derartiger Störungen sein. Andererseits können Pflanzen bei einem Überangebot an Phosphor die Spurenelemente Eisen und Kupfer nicht mehr aufnehmen und entwickeln dadurch chlorotische Verfärbungen. Derartige Verfärbungen zeigte auch ein Teil der Sprosse, die mit der höchsten der getesteten  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentrationen (6,25 mM) regeneriert worden sind.

Im Zusammenhang mit reversiblen Phosphorylierungsprozessen im Rahmen der Krebsforschung beim Menschen berichtete BÖHMER (1997) von einem Membranlipid, einer Phosphatidsäure, die als Aktivator einer Protein-Tyrosinphosphatase fungiert, die dadurch ihre dephosphorylierende Wirkung entfalten und über die Blockierung eines Rezeptorsignals die Zellteilung verhindern kann. Auch in Pflanzen sind Phospholipide am Membranaufbau beteiligt. Phospholipide werden von der Pflanze sehr schnell nach Aufnahme des Phosphors gebildet. Ähnliche Wirkungsmechanismen bei der Regulierung von Zellteilungsprozessen bei Pflanzen im Zusammenhang mit Regenerationsvorgängen wären aufgrund der gezeigten

Beeinflussung der Adventivsprossbildung über die Phosphatkonzentration ebenfalls denkbar. Die anhand der variierten Phosphatkonzentration erzielten Ergebnisse deuten somit ebenso wie die mögliche Beeinflussung der Sprossbildung durch Phosphatase- und Proteinkinaseinhibitoren auf die regulierende Rolle des Phosphatstoffwechsels bei Regenerationsvorgängen in somatischen Geweben bei Apfel hin.

### 3.5 Zusammenfassung

Blattexplantate von 'Golden Delicious', 'Pinova' und *M. robusta* sowie Blatt- und Internodienkalli von 'Pinova' und *M. robusta* wurden zunächst 22 Wochen auf zwei bzw. 16 Wochen auf drei unterschiedlichen Nährmedien kultiviert. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Erfassung der Regenerationsleistungen der Genotyp  $\times$  Medien-Varianten und die Bestimmung der Isoenzymmuster für ACP, ADH, DIA, EST, MDH und PRX für ausgewählte repräsentative regenerierende und nicht regenerierende Explantate und Kallusgewebe. Die nährmedien- und genotypabhängigen Regenerationsleistungen sowie die Aktivitäten der Enzyme verringerten sich in beiden Regenerationssystemen mit fortschreitender Kultivierungsdauer. Unterschiede zwischen regenerierenden und nicht regenerierenden Geweben ergaben sich für regenerierende Blattkalli von *M. robusta* hinsichtlich der Aktivität einer spezifischen PRX-Bande sowie für alle Explantate und Kallusgewebe im Hinblick auf die Intensität der ACP-Banden an den Positionen 4 und 5. An diesen ACP-Positionen konnten drei verschiedene Bandenmustertypen beobachtet werden. Der vermutete Zusammenhang zwischen unauffälliger Intensität beider Bandenpositionen und vorhandener Regenerationsfähigkeit bzw. erhöhter Bandenintensität und ausbleibender Regeneration konnte anhand nachfolgender Vergleiche der Regenerationsraten und der Häufigkeiten der Bandenmustertypen in verschiedenen Medien  $\times$  Genotyp-Kombinationen in Explantat- und Kalluskulturen bestätigt werden. Die Gegenüberstellung der Regenerationsfähigkeit der einzelnen Explantate und Kallusproben und ihrer jeweiligen Intensität mittels des G-Tests erbrachte den statistischen Nachweis der Abhängigkeit der Regenerationsfähigkeit von der Intensität beider ACP-Banden.

Dieses Ergebnis war Anlass zu prüfen, ob die Zugabe von Phosphataseinhibitoren und Proteinkinaseinhibitoren zum Grundmedium sowie eine im Grundmedium variierte Phosphatkonzentration die Regenerationsfähigkeit beeinflussen kann. Zum Einsatz kamen die Phosphataseinhibitoren NaF,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (beide in Konzentrationen von 0,5-100  $\mu\text{M}$ ), Endothall

(0,05-100  $\mu\text{M}$ ) und L-p-Bromotetramisoloxalat (0,1-25  $\mu\text{M}$ ) bzw. die Proteinkinaseinhibitoren Myristoylated Proteinkinase C Peptide Inhibitor (Promega, 100 $\mu\text{M}$ ) und Proteinkinase Inhibitor from rabbit muscle (Sigma, 5  $\mu\text{M}$ ). Zur Änderung des Phosphatangebotes wurde die Phosphatkomponente des MS-Mediums,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , in Konzentrationen zwischen 0 und 6,25  $\mu\text{M}$  zugesetzt.

Alle vier Phosphataseinhibitoren waren in der Lage, die nach sechs Wochen bonitierte Sprossbildung der Primärexplantate bei der Mehrzahl der sieben bzw. acht getesteten Genotypen im Vergleich zur inhibitorfreien Kontrolle signifikant zu erhöhen. Dabei wurden in Abhängigkeit von Genotyp und Inhibitor bestimmte Konzentrationsoptima beobachtet. Nur Endothallkonzentrationen über 1  $\mu\text{M}$  wirkten generell toxisch und hemmten oder verhinderten die Sprossregeneration. Die längerfristige Anwendung von NaF und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , die sowohl bei Explantaten als auch bei Kalluskulturen von sieben Genotypen getestet worden war, zeigte ebenfalls in vielen Genotyp  $\times$  Konzentrations-Kombinationen einen signifikanten Anstieg der Regeneration.

Im Gegensatz zu den Phosphataseinhibitoren hemmten beide Proteinkinaseinhibitoren in den drei getesteten Genotypen die Adventivsprossbildung bis zur sechsten Kultivierungswoche größtenteils auf signifikantem Niveau. Im Vergleich zu den Kontrollvarianten setzte die Sprossbildung unter dem Einfluss der Proteinkinaseinhibitoren verspätet ein.

Auch die  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration beeinflusste die Adventivsprossbildung aller drei Genotypen. Die Optimalkonzentrationen lagen bei 0,313 und 0,625  $\mu\text{M}$ , während sich das Fehlen dieser Komponente sowie höhere Konzentrationen negativ auswirkten.

Die Ergebnisse könnten speziell im Hinblick auf den Einsatz der Phosphataseinhibitoren einen Weg zur Verbesserung des Regenerationspotentials somatischer Gewebe bei Apfel aufzeigen sowie im Allgemeinen zum besseren Verständnis der In-vitro-Regeneration bei Pflanzen beitragen.

# Kapitel 4

## Zusammenfassung

Das Interesse an der Nutzung biotechnologischer Methoden in die Apfelzüchtung hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Die sinnvolle Integration in den Zuchtprozess hängt jedoch von der Beherrschung der Methoden, ihrer Effizienz, der Anwendbarkeit auf ein möglichst breites Spektrum interessierender Genotypen sowie der Kenntnis der Eigenschaften der erzeugten Pflanzen ab. Das Ziel der Arbeit bestand darin, über die Entwicklung geeigneter Marker Möglichkeiten zur Lösung zweier damit verbundener Problemkreise zu untersuchen – der Charakterisierung von Regeneratpflanzen aus der Haploidenkultur und der Verbesserung der Regeneration aus somatischen Geweben.

Anhand der genetischen Analyse verschiedener Kreuzungsnachkommenschaften konnten als potentielle Marker für die Charakterisierung der Regeneratpflanzen zehn frei spaltende Isoenzymloci ermittelt werden. Nachfolgende Untersuchungen zur Stabilität, der gewebespezifischen Expression und zu ihrem Vorliegen in den einzelnen Donorgenotypen ergaben eine genotypabhängige Verfügbarkeit von einem bis zu sechs Markern.

Unter Verwendung dieser Marker wurde für 125 von 136 geprüften Antherenkulturlinien und für alle drei der untersuchten Linien, die über die Mikrosporenkultur regeneriert worden waren, Homozygotie nachgewiesen. Für die Charakterisierung der 21 aus der In-situ-Parthenogenese stammenden Linien erwiesen sich die zur Verfügung stehenden Marker aufgrund der vielfältigen Entstehungsmöglichkeiten der Regenerate als unzureichend. Sechs Linien können jedoch unter dem Vorbehalt der notwendigen Untersuchung mit weiteren Markern als vorläufig homozygot betrachtet werden.

In den Untersuchungen zur Homozygotie der Antherenkulturlinien konnten bei zwei von vier betrachteten Markern signifikante Abweichungen vom erwarteten 1:1-Spaltungsverhältnis festgestellt werden. In 40 von 112 untersuchten Antherenkulturlinien zeigten die Regenerate gametoklonale Variationen. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf den Einsatz der Regenerate im Zuchtprozess diskutiert.

Für die Etablierung von Markern, die Erkenntnisse über die Regenerationsfähigkeit somatischer Gewebe liefern können, wurden regenerierende und nicht regenerierende Blattprimärexplantate und sekundäre Kalli, die von unterschiedlichen Genotypen und Nähr-

medien stammten, hinsichtlich ausgewählter Isoenzymmuster untersucht. Neben einer sehr intensiv gefärbten PRX-Bande, die jedoch nur in regenerierenden Blattkalli von *M. robusta* exprimiert wurde, erwiesen sich die an den Positionen 4 und 5 gelegenen ACP-Banden als Marker, die sowohl im Explantat- als auch im Kallusgewebe der untersuchten Genotypen vorhanden waren. Der vermutete Zusammenhang zwischen unauffälliger Intensität beider ACP-Banden und vorhandenem Regenerationsvermögen bzw. erhöhter Intensität und fehlender Regenerationsbereitschaft konnte statistisch nachgewiesen werden.

Basierend auf diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von Phosphataseinhibitoren, Proteinkinaseinhibitoren und der Phosphatkonzentration auf das Regenerationsvermögen mehrerer Genotypen geprüft. Alle vier Phosphataseinhibitoren waren in bestimmten Konzentrationsbereichen in der Lage, die Regenerationsfähigkeit der Gewebe auf oftmals signifikantem Niveau zu erhöhen. Ihre Gegenspieler, die Proteinkinaseinhibitoren, verzögerten dagegen das Einsetzen der Regeneration und bewirkten, dass die Regenerationsleistungen der geprüften Genotypen bis zur sechsten Kultivierungswoche mehrheitlich signifikant unter denen der inhibitorfreien Kontrollvarianten lagen. Ein signifikanter Einfluss auf die Höhe der Regeneration konnte auch für die Phosphatkonzentration des Nährmediums nachgewiesen werden. Innerhalb der getesteten Konzentrationen zeigte sich ein eindeutiges Optimum zwischen 0,313 und 0,625  $\mu\text{M}$ , während absoluter Phosphatmangel sowie höhere Konzentrationen hemmend wirkten. Es wird auf die Bedeutung der untersuchten Substanzen für die Regeneration bei Apfel hingewiesen sowie ansatzweise ihre mögliche Bedeutung in der Regulierung der pflanzlichen Regeneration diskutiert.

## Literaturverzeichnis

- ABE, T., Y. FUTSUHARA 1989: Selection of higher regenerative callus and change in isozyme pattern in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **78**, 648-652.
- ALSTON, F. H., K. L. PHILLIPS, K. M. EVANS 2000: A *Malus* gene list. *Acta Hort.* **538**, 561-570.
- ALTHERR, S., S. STIRN, H.-J. JACOBSEN 1993: Immunobiochemical analysis of a nuclear protein marker for regeneration in higher plants. *J. Plant Physiol.* **141**, 415-422.
- ARNISON, P. G., W. G. BOLL 1974: Isoenzymes in cell cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender): isoenzymatic changes during the callus culture cycle and differences between stock cultures. *Can. J. Bot.* **52**, 2621-2629.
- ARNISSON, P. G., W. G. BOLL 1978: The effect of 2,4-D and kinetin on the activity and isozyme pattern of various enzymes in cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). *Can. J. Bot.* **56**: 2185-2195.
- BAILLIE, A. M. R., B. G. ROSSNAGEL, K. K. KARTHA 1992: Field evaluation of barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes derived from tissue culture. *Can. J. Plant Sci.* **72**, 725-733.
- BASSIRI, A., P. S. CARLSON 1978: Isozyme patterns and differences in plant parts and their callus cultures in common bean. *Crop Science* **18**, 955-958.
- BASSIRI, A., P. S. CARLSON 1979: Isozyme patterns in tobacco plant parts and their derived calli. *Crop Science* **19**, 909-914.
- BATTLE, I., F. H. ALSTON 1996: Genes determining leucine aminopeptidases and mildew resistance from the ornamental apple White Angel. *Theor. Appl. Genet.* **93**, 179-182.
- BELLMANN, R., W. WERR 1992: ZmHox 1a, the product of a novel maize homeobox gene, interacts with the shrunken 26-bp feedback control element. *EMBO J.* **11**, 3367-3374.
- BENTOLILA, S., T. HARDY, C. GUITTON, G. FREYSSINET 1992: Comparative analyses of F<sub>2</sub> plants and anther culture-derived plants of maize. *Genome* **35**, 575-582.
- BJÖRNSTAD, A., H. SKINNES, A. K. UHLEN, P. MARUM, P. MAROY 1993: Genetic marker segregations in doubled haploids in spring wheat crosses. *Hereditas* **118**, 55-62.
- BÖHMER, F. D. 1997: Zellteilung On/Off. *BioTec* **6**, 32-33.
- BOHANEC, B., M. JAKŠE, A. IHAN, B. JAVORNIK 1995: Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Science* **104**, 215-224.

- BOLAR, J. P., J. L. NORELLI, K.-W. WONG, C. K. HAYES, G. E. HARMAN, H. S. ALDWINCKLE 2000: Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* **90**, 72-77.
- BOREJSZA-WYSOCKA E. E., J. L. NORELLI, H. S. ALDWINCKLE, K. KO 1999: Transformation on authentic M.26 apple rootstock for enhanced resistance to fire blight. *Acta Hort.* **489**, 259-266.
- BORNMAN, C. H. 1974: Cytodifferentiation in tissue culture. In: STREET, H. E. (ed.) *Tissue Culture and Plant Science*, 43. Academic Press, London, New York (zit. in DE und ROY 1984).
- BOURNIVAL, B. L., S. S. KORBAN 1987: Electrophoretic analysis of genetic variability in the apple. *Sci. Hort.* **31**, 233-243.
- BROSTROM, C. O., C. KON 1974: An improved protein binding assay for cyclic AMP. *Anal. Biochem.* **58**, 459-467.
- BROWN, J. S., E. A. WERNSMAN 1982: Nature of reduced productivity of anther-derived lines of flue-cured tobacco. *Crop Science* **21**, 1-5.
- BUI DANG HA, D., J. PERNES 1982: Androgenesis in pearl millet. I. Analysis of plants obtained from microspore culture. *Z. Pflanzenphysiol.*, **108**, 317-327.
- CHALLICE, J. S. 1981: Chemotaxonomic studies in the family *Rosaceae* and the evolutionary origins of the subfamily *Maloideae*. *Preslia* **53**, 289-304.
- CHEN, C. C., C. M. CHEN 1980: Changes in chromosome number in microspore callus of rice during successive subcultures. *Can. J. Genet. Cytol.* **22**, 607-614.
- CHEN, C. C., W. L. CHIU, L. J. YU, S. S. REN, W. J. YU, M. H. LIN 1983: Genetic analysis of anther-derived plants of rice: independent assortment of unlinked genes. *Can. J. Genet. Cytol.* **25**, 324-328.
- CHEN, Y. 1986: Anther and pollen culture of rice. In: HU, H., H. YANG (eds.) *Haploids of Higher Plants In Vitro*, 3-25. Springer-Verlag, Berlin.
- CHEVREAU, E. 1984: Contribution à l'étude de la génétique du Pommier: apport de l'analyse enzymatique. Thèse de Docteur Ingénieur, Orsay.
- CHEVREAU, E., Y. LESPINASSE, M. GALLET 1985: Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Theor. Appl. Genet.* **71**, 268-277.
- CHEVREAU, E., F. LAURENS 1987: The pattern of inheritance in apple (*Malus × domestica* Borkh.): further results from leaf isozyme analysis. *Theor. Appl. Genet.* **75**, 90-95.
- CHEVREAU, E., A. G. MANGANARIS, M. GALLET 1999: Isozyme segregation in five apple progenies and potential use for map construction. *Theor. Appl. Genet.* **98**, 329-336.

- CHIBBAR, R. N., J. SHYLUK, F. GEORGES, C. S. MALLARD, F. CONSTABEL 1988: Esterase isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *J. Plant Physiol.* **133**, 367-370.
- CHLYAH, A., H. TAARJI, H. CHLYAH 1990: Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.): anther culture and induction of androgenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.) *Biotchnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12: Haploids in Crop Improvement I, 442-457. Springer-Verlag, Berlin.
- CHU, C. C., C. C. WANG, C. S. SUN, C. HSU, K. C. YIN, C. Y. CHU, F. Y. PI 1975: Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* **18**, 659-688.
- CHYI, Y. S., N. F. WEEDEN 1984: Relative isozyme band intensities permit the identification of the 2N gamete parent for triploid apple cultivars. *Hortscience* **19**, 818-819.
- COHEN, P. 1989: The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453-508.
- CONNER, P. J., S. K. BROWN, N. F. WEEDEN 1997: Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **122**, 350-359.
- COPPENS, L., E. GILLIS 1987: Isozyme electrofocusing as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis in callus tissues of *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Physiol.* **127**, 153-158.
- DAUM, G., I. EISENMANN-TRAPPE, H.-W. FRIES, J. TROPFMAIR, U. R. RAPP 1994: The ins and outs of Raf kinases. *TIBS* **19**, 474-479.
- DE, K. K., S. C. ROY 1984: Role of an acid phosphatase isoenzyme in callus tissue during cytodifferentiation. *Theor. Appl. Genet.* **68**, 285-287.
- DEL GROSSO, E., R. ALICCHIO 1981: Analysis in isozymatic patterns of *Solanum melongena*: differences between organized and unorganized tissues. *Z. Pflanzen-physiol.* **102**, 467-470.
- DE PAEPE, R., D. BLETON, F. GNANGBE 1981: Basis and extent of genetic variability among doubled haploid plants obtained by pollen culture in *Nicotiana glauca*. *Theor. Appl. Genet.* **59**, 177-184.
- DIEKMANN, M., V. HANKE, E. HUANCARUNA PERALES, O. SCHIEDER 1999: An advanced approach in protoplast technology for *Malus* and *Prunus*. *Acta Hort.* **484**, 571-576.
- DOLGOV, S. V., D. N. MIROSHNICHENKO, K. A. SCHESTIBRATOV 2000: Agrobacterial transformation of apple cultivar and rootstock. *Acta Hort.* **538**, 619-624.
- DUFOUR, M. 1990: Improving yield of adventitious shoots in apple. *Acta Hort.* **280**, 51-60.

- DUFOUR, P., C. JOHANSSON, S. ANTOINE-MICHARD, R. CHENG, A. MURIGNEUX, M. BECKERT 2001: Segregation distortions at marker loci: variation during microspore embryogenesis in maize. *Theor. Appl. Genet.* **102**, 993-1001.
- DURHAM, R. E., S. S. KORBAN 1994: Effects of explant size, pretreatment, and light intensity on shoot regeneration from in vitro-grown apple leaves. In: SCMDT, H. , M. KELLERHALS (eds.) *Progress in Temperate Fruit Breeding*, 355-359. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- ELOBEIDY, A., S. S. KORBAN 1994: The effect of thidiazuron on shoot regeneration from apple leaf discs. *Hortscience* **23**, 755.
- EVANS, D. A., W. R. SHARP, H. P. MEDINA-FIHALO 1984: Somaclonal and gametoclonal variation. *Am. J. Bot.* **71**, 759-774.
- EVANS, D. A., W. R. SHARP 1986: Somaclonal and gametoclonal variation. In: EVANS, D. A., W. R. SHARP, P. V. AMMIRATO (eds.) *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 4, 97-132. Macmillan, New York.
- FASOLO, F., R. H. ZIMMERMAN, I. FORDHAM 1989: Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **16**, 75-87.
- FINNIE, S. J., W. POWELL, A. F. DYER 1989: The effects of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley. *Plant Breeding* **103**, 110-118.
- FINNIE, S. J., B. P. FORSTER, K. J. CHALMERS, A. F. DYER, R. WAUGH, W. POWELL 1991: Genetic stability of microspore-derived doubled haploids of barley: A cytological, biochemical and molecular study. *Genome* **34**, 923-928.
- FISCHER, C. 1999: Ergebnisse der Apfelzüchtung in Dresden-Pillnitz. *Erwerbsobstbau* **41**, 65-74.
- FOISSET, N., R. DELOURME, M. O. LUCAS, M. RENARD 1993: Segregation analysis of isozyme markers on isolated microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. *Plant Breeding* **110**, 315-322.
- FOISSET, N., R. DELOURME 1996: Segregation in androgenic plants. In: JAIN, S. M., S. K. SOPORY, R. E. VEILLEUX (eds.) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Vol. 2, 189-201. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- FOROUGHI-WEHR, B., W. FRIEDT 1984: Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus-resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. *Theor. Appl. Genet.* **67**, 377-382.
- FRANCIS, A., R. N. JONES 1989: Heritable nature of colchizine-induced variation in diploid *Lolium perenne*. *Heredity* **62**, 407-410.
- GERCHEVA, P., R. H. ZIMMERMAN, L. D. OWENS, C. BERRY, F. A. HAMMERSCHLAG 1994: Particle bombardment of apple leaf explants influences adventitious shoot formation. *Hortscience* **29**, 1536-1538.

- GEYSEN, S., M. HOET, S. SCHROEVEN, J. KEULEMANS 2000: Shoot regeneration from androgenic callus of apple cultivars obtained via anther culture. *Acta Hort.* **538**, 655-658.
- GRAFE, C., G. WRICKE 1998: Increase of *in vitro* regeneration in *Malus domestica* by the application of phosphatase inhibitors. *Plant Breeding* **117**, 563-566.
- GRANER, A., A. JAHOR, J. SCHONDELMAIER, H. SIEDLER, K. PILLEN, G. FISCHBECK, G. WENZEL, R.G. HERRMANN 1991: Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 250-256.
- GUIDERONI, E., J. C. GLASZMANN, B. COURTOIS 1989: Segregation of 12 isozyme genes among doubled-haploid lines derived from a *japonica* × *indica* cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* **42**, 45-53.
- GUIDERONI, E. 1991: Gametic selection in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **81**, 406-412.
- HANKE, V., A. ROHDE, C. GRAFE 1991: Untersuchungen zur Regeneration an somatischem Gewebe *in vitro*. I. Zur Adventivsproßbildung an Blattexplantaten bei Apfel (*Malus domestica* Borckh.). *Gartenbauwissenschaft* **56**, 214-220.
- HANKE, V. 1994: Plant regeneration from tissue cultures of *Malus* species: The importance of the genotype. In: SCMIDT, H. , M. KELLERHALS (eds.) *Progress in Temperate Fruit Breeding*, 365-369. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- HANKE, V. 1999: Zur Anwendung gentechnischer Verfahren beim Apfel. *Erwerbsobstbau* **41**, 138-142.
- HANKE, V., K. DÜRING, J. L. NORELLI, H. S. ALDWINCKLE 1999: Transformation of apple cultivars with T4-Lysozyme-gene to increase fire blight resistance. *Acta Hort.* **489**, 253-256.
- HANKE, V., J. L. NORELLI, H. S. ALDWINCKLE, I. HILLER, G. KLOTZSCHE, K. WINKLER, J. EGERER, K. RICHTER 2000: Transformation in apple for increased resistance. *Acta Hort.* **538**, 611-616.
- HAUAGGE, R., D. E. KESTER, R. A. ASAY 1987: Isozyme variation among Californian almond cultivars: I. Inheritance. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **112**, 687-693.
- HAYWARD, M. D., A. OLESEN, I. K. DUE, R. JENKINS, P. MORRIS 1990: Segregation of isozyme marker loci among androgenetic plants of *Lolium perenne* L., *Plant Breeding* **104**, 68-71.
- HEMMAT, M., N. F. WEEDEN, A. G. MANGANARIS, D. M. LAWSON 1994: Molecular marker linkage map for apple. *J. Hered.* **85**, 4-11.
- HENRY, H., S. BERNARD, M. BERNARD, G. GAY, J. L. MARCOTTE, J. DE BUYSER 1993: Nuclear gametophytic genes from chromosome arm IRS improve regeneration of wheat microspore-derived embryos. *Genome* **36**, 808-814.

- HEROUART, D., R. S. SANGWAN, M. A. FLINIAUX, B. SANGWAM-NORREEL 1988: Variations in leaf alkaloid content of androgenic diploid plants of *Datura innoxia*. *Planta Medica* **54**, 14-17.
- HEUN, M., A. E. KENNEDY, J. A. ANDERSON 1991: Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* **34**, 437-447.
- HÖFER, M. 1994: *In vitro* androgenesis in apple: Induction, regeneration and ploidy level. In: SCHMIDT, H., M. KELLERHALS (eds.) *Progress in Temperate Fruit Breeding*, 399-402. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- HÖFER, M. 1995: In-vitro-Androgenese bei Apfel. *Gartenbauwissenschaft* **60**, 12-15.
- HÖFER, M., Y. LESPINASSE 1996: Haploidie in apple. In: JAIN, S. M., S. K. SOPORY, R. E. VEILLEUX (eds.) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Vol. 3, 261-276. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- HÖFER, M. 1997: In vitro androgenesis in apple: Optimization of the anther culture. *Acta Hort.* **447**, 341-343.
- HÖFER, M., A. TOURAEV, E. HEBERLE-BORS 1999a: Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Journal Plant Cell Reports* **18**, 1012-1017.
- HÖFER, M., C. FISCHER, C. GRAFE 1999b: Haploid induction in apple: First homozygous scab and mildew resistant lines of the apple cultivar 'Remo'. *Gartenbauwissenschaft* **64**, 134-137.
- HÖFER, M., C. GRAFE 2000: Preliminary evaluation of doubled haploid material in apple. *Acta Hort.* **538**, 587-592.
- HOFFMANN, F., E. THOMAS, G. WENZEL 1982: Anther culture as a breeding tool in rape. II. Progeny analyses of androgenetic lines and induced mutants from haploid cultures. *Theor. Appl. Genet.* **61**, 225-232.
- HU, H., B. HUANG 1987: Application of pollen-derived plants to crop improvement. *Int. Rev. Cytol.* **107**, 293-313.
- HUANCARUNA PERALES, E., O. SCHIEDER 1993: Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **34**, 71-76.
- IQBAL, J., N. BUTT, F. SAAED, M. S. AHMAD 1989: Changes in nucleic acid content, peroxidase content and its isozymic forms in in vitro propagated calli of chick pea. *Pak. J. Bot.* **21**, 13-23.
- IUB, INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (ed.) 1984: *Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*. Academic Press, Orlando, London.
- JAASKA, V. E. 1981: Genetic polymorphism of aspartate aminotransferase in rye species. *Soviet Genetica* **17**, 372-379.

- JAIN, S. M., B. S. AHLOOWALIA, R. E. VEILLEUX 1998: Somaclonal variation in crop improvement. In: JAIN, S. M., D. S. BRAR, B. S. AHLOOWALIA (eds.) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement, 203-218. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- JAMES, D. J., A. J. PASSEY, S. B. MALHOTRA 1984: Organogenesis in callus derived from stem and leave tissues of apple and cherry rootstocks. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **3**, 333-341.
- JAMES, D. J., A. J. PASSEY, E. RUGINI 1988: Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* **132**, 148-154.
- JOHNSON, C. B., B. R. HOLLOWAY, H. SMITH, D. GRIERSON 1973: Isoenzymes of acid phosphatase in germinating peas. *Planta (Berl.)* **115**, 1-10.
- KARP, A., S. W. J. BRIGHT 1985: On the causes and origins of somaclonal variation. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell. Biol.* **2**: 199-234.
- KARP, A. 1989: Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? *International Association for Plant Tissue Culture (IAPTC) Newsletter* **58**, 2-11.
- KAY, L. E., D. V. BASILE 1987: Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.* **84**, 99-105.
- KENIS, K., J. KEULEMANS 2000: The use of microsatellites to investigate the homozygous status of apple plants obtained by anther culture and parthenogenesis *in situ*. *Acta Hort.* **538**, 581-585.
- KEULEMANS, J., K. DE WITTE 1994: Plant regeneration from cotyledons and embryonic axes in apple: Sites of reaction and effect of pre-culture in the light. In: SCMIDT, H., M. KELLERHALS (eds.) *Progress in Temperate Fruit Breeding*, 371-375. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- KEVERS, C., M. COUMANS, W. DE GREEF, M. JACOBS, T. GASPAR 1981: Organogenesis in habituated sugarbeet callus: Auxin content and protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Z. Pflanzenphysiol.* **101**, 79-87.
- KINZKOFER, A., B. J. RADOLA 1981: Miniature ultrathin-layer isoelectric focusing in 20-50  $\mu\text{m}$  polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **2**, 174-183.
- KINZKOFER, A., B. J. RADOLA 1983: Fast and high enzyme visualization in ultrathin-layer isoelectric focusing. *Electrophoresis* **4**, 408-417.
- KJAER, B., V. HAAHR, J. JENSEN 1991: Associations between 23 quantitative traits and 10 genetic markers in a barley cross. *Plant Breeding* **106**, 261-274.

- KLEINHOF, A., A. KILIAN, M. A. SAGHAI MAROOF, R. M. BIYASHEV, P. HAYES, F. Q. CHEN, N. LAPITAN, A. FENWICK, T. K. BLAKE, V. KANAZIN, E. ANANIEV, L. DAHLEEN, D. KUDRNA, J. BOLLINGER, S. J. KNAPP, B. LIU, M. SORRELLS, M. HEUN, J. D. FRANCKOWIAK, D. HOFFMANN, R. SKADSEN, B. J. STEFFENSON 1993: A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 705-712.
- KO, K., S. K. BROWN, J. L. NORELLI, E. E. BOREJSZA-WYSOCKA, H. S. ALDWINCKLE 1999: Effect of multiple transgenes on resistance to fire blight. *Acta Hort.* **489**, 257.
- KOLOVA, L. G., N. A. STOYANOV 1994: *In vitro* induction of adventitious shoot and embryo formation in somatic tissues of apple (*Malus pumila* Mill.) zygotic embryos and stem segments. In: SCHMIDT, H., M. KELLERHALS (eds.) *Progress in Temperate Fruit Breeding*, 377-379. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- KOONEN, F., H.-J. JACOBSEN 1992: Electrophoretic separation and characterization of pea protoplasts. *Physiol. Plant.* **85**, 284-288.
- KORBAN, S. S., H. CHEN 1992: Apple. In: HAMMERSCHLAG, F. A., R. E. LITZ (eds.) *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*, 203-227. C A B International, Wallingford.
- KORBAN, S. S., P. A. O'CONNOR, A. ELOBEIDY 1992: Effects of thidiazuron, naphthalene-acetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. *J. Hort. Science* **67**, 341-349.
- KOVACH, F. S., P. A. SVINGEN, D. J. SCHAID 1992: Levamisol potentiation of fluorouracil antiproliferative activity mimicked by orthovanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatase. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 515-519.
- KUDIRKA, D. T., G. W. SCHAEFFER, P. S. BAENZIGER 1983: Cytogenetic characteristics of wheat plants regenerated from anther calli of Centurk. *Can. J. Genet. Cytol.* **25**, 513-517.
- LARKIN, P. J., W. R. SCOWCROFT 1981: Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**, 197-214.
- LAURENS, F. 1986: Etude de déterminisme de quelques systèmes enzymatiques chez une espèce d'origine polyploïde: le pommier (*Malus × domestica* Borkh.). DEA, Université de Rennes I.
- LEFEBRVE, V., A. PALLOIX, C. CARANTA, E. POCHARD 1995: Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and double-haploid progenies. *Genome* **38**, 112-121.
- LEIFERT, C., J. Y. RITCHIE, W. M. WAITS 1991: Contaminants of plant tissue and cell cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 452-469.
- LESPINASSE, Y., M. GODICHEAU 1980: Création et description d'une plante de pommier (*Malus pumila* Mill.). *Ann. Amélior. Plant* **30**, 39-44.

- LI, Y.-M., J. E. CASIDA 1992: Cantharidin-binding protein: Identification as protein phosphatase 2A. Proc. Nat. Acad. Sci. **89**, 11867-11870.
- LI, Y.-M., C. MACKINTOSH, J. E. CASIDA 1993: Protein phosphatase 2A and its [<sup>3</sup>H]cantharidin/[<sup>3</sup>H]endothall thioanhydride binding site. Biochemical Pharmacology **46**, 1435-1443.
- LINSMAIER, E. M., F. SKOOG 1965: Organic growth factor requirements for tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. **18**, 100-127.
- LIU, J. R., K. C. SINK, F. G. DENNIS 1983: Plant regeneration from apple seedling explants and callus cultures. Plant Cell Tissue Organ Culture **2**, 293-304.
- LIU, Q., S. SALIH, F. HAMMERSCHLAG 1998: Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus × domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced β-glucuronidase expression from stem internodes. Plant Cell Reports **18**, 32-36.
- LOGUE, S. J., L. C. GILES, D. H. S. SPARROW 1993: Genotype and environment strongly influence barley anther culture response using Australian genotypes. Aust. J. Bot. **41**, 227-236.
- LOGUE, S. J. 1996: Genetic stability in microspore-derived doubled haploids. In: JAIN, S. M., S. K. SOPORY, R. E. VEILLEUX (eds.) *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants, Vol. 3, 261-276. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- LOPEZ, V., T. STEVENS, R. N. LINDQUIST 1976: Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase-catalyzed phosphate ester hydrolysis. Arch. Biochem. Biophys. **175**, 31-37.
- MALIEPAARD, C. 1998: Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using multi-allelic markers. Theor. Appl. Genet. **97**, 60-73.
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1987: Inheritance and linkage relationship of glutamate oxaloacetate transaminase isoenzymes in apple. 1. The gene *GOT-1*, a marker for the *S* incompatibility locus. Theor. Appl. Genet. **74**, 154-161.
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1988a: Inheritance and linkage relationship of glutamate oxaloacetate transaminase isoenzymes in apple. 2. The genes *GOT-2* and *GOT-4*. Theor. Appl. Genet. **76**, 449-454.
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1988b: The acid phosphatase gene *ACP-1* and its linkage with the endopeptidase gene *ENP-1* and the pale green lethal gene *l* in apple. Acta Hort. **224**, 177-184.
- MANGANARIS, A. G. 1989: Isoenzymes as genetic markers in apple breeding. Ph.D. Thesis. London university (zit. in CHEVREAU et al. 1999).
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1989: Glutamate oxaloacetate transaminase isoenzymes in apple cultivars and rootstocks. J. Hort. Science **64**, 9-15.
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1992a: Genetics of leucine aminopeptidase in apple. Theor. Appl. Genet. **83**, 345-352.

- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1992b: Genetics of esterase isoenzymes in *Malus*. Theor. Appl. Genet. **83**, 467-475.
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1992c: Inheritance and linkage relationships of peroxidase isoenzymes in apple. Theor. Appl. Genet. **83**, 392-399.
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1993: Peroxidase isoenzyme genes in the identification of apple cultivars and *Malus* species. J. Hort. Science **68**, 775-781.
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON 1997: Genetics of superoxid dismutase in apple. Theor. Appl. Genet. **95**, 484-489.
- MANGANARIS, A. G., F. H. ALSTON, N. F. WEEDEN, H. S. ALDWINCKLE, H. L. GUSTAFSON, S. K. BROWN 1994: Isozyme locus *Pgm-1* is tightly linked to a gene *V<sub>f</sub>* for scab resistance in apple. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **119**, 1286-1288.
- MENENDEZ, R. A., F. E. LARSEN, R. JR. FRITTS 1986a: Protein and isoenzyme electrophoresis and isoelectric focusing for the characterization of apple clones. Sci. Hort. **29**, 211-220.
- MENENDEZ, R. A., R. JR. FRITTS, F. E. LARSEN 1986b: Identification of apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstock cultivars by isozyme analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **111**, 933-937.
- MEYER, R., F. SALAMINI, H. UHRIG 1993: Isolation and characterization of potato diploid clones generating a higher frequency of monohaploid or homozygous diploid androgenetic plants. Theor. Appl. Genet. **85**, 905-912.
- MIŠIĆ, P. D., D. V. VINTERHALTER, R. TODOROVIĆ 1980a: Polymorphism of apple isoperoxidases. Genetika (Beograd) **12**, 263-269.
- MIŠIĆ, P. D., D. V. VINTERHALTER, R. TODOROVIĆ 1980b: Inheritance of apple isoperoxidases. Jugoslava Vocarstvo **14**, 43-47.
- MOORE, G. A., R. E. DURHAM 1992: Molecular markers. In: HAMMERSCHLAG, F. A., R. E. LITZ (eds.) Biotechnology of Perennial Fruit Crops, 203-227. C A B International, Wallingford.
- MORDEN L. P., B. G. ROSSNAGEL, K. N. KAO 1989: Performance of anther culture-derived breeding lines of barley versus lines developed by pedigree, single seed descent, and the *Hordeum bulbosum* techniques – field comparisons. Can. J. Plant Sci. **69**: 546.
- MORRISON, R. A., D. A. EVANS 1987: Gametoclonal variation. Plant Breed. Rev. **5**, 359-391.
- MORTON, N. E. 1955: Sequential tests for the detection of linkage. Amer. J. Hum. Genet. **7**, 277-318.
- MURASHIGE, T., F. SKOOG 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. **15**, 473-497.

- MURCH, S. J., S. S. B. CAMPBELL, P. K. SAXENA 2001: The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: Regulation of auxin-induced root organogenesis in *in vitro*-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **37**, 786-793.
- MURIGNEUX, A., S. BAUD, M. BECKERT 1993a: Molecular and morphological evaluation of doubled-haploid lines in maize. 2. Comparison with single-seed-descent lines. *Theor. Appl. Genet.* **87**, 278-287.
- MURIGNEUX, A., D. BARLOY, P. LEROY, M. BECKERT 1993b: Molecular and morphological evaluation of doubled haploid lines in maize. 1. Homogeneity within DH lines. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 837-842.
- NORELLI, J. L., H. S. ALDWINCKLE, L. DESTEFANO-BELTRAN, J. M. JAYNES 1994: Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* **77**, 123-128.
- NORELLI, J. L., J. P. BOLAR, G. E. HARMAN, H. S. ALDWINCKLE 2000a: Transgenic apple plants expressing chitinases from *Trichoderma* have increased resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Acta Hort.* **538**, 617-618.
- NORELLI, J. L., E. BOREJSZA-WYSOCKA, J. P. REYNOIRD, H. S. ALDWINCKLE 2000b: Transgenic 'Royal Gala' apple expressing attacin E has increased field resistance to *Erwinia amylovora* (fire blight). *Acta Hort.* **538**, 631-634.
- OLHOFT, P. M., R. L. PHILLIPS 1999: Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies. In: LERNER, H. R. (ed.) *Plant Responses to Environmental Stresses: from Phytohormones to Genom Reorganization*, 111-148. Dekker, New York.
- ORTON, T. J., M. A. BROWERS 1985: Segregation of genetic markers among plants regenerated from cultured anthers of broccoli (*Brassica oleracea* var. 'italica'). *Theor. Appl. Genet.* **69**, 637-643.
- PELLETIER, G. 1998: Use of Haplo-Diploidisation for Plant Breeding. In: CHUPEAU, Y., M. CABOCHE, Y. HENRY (eds.) *Androgenesis and Haploid Plants*, 104-111. Springer-Verlag, Berlin.
- PICARD, E., A. RODE, G. DOUSSINAULT, M. ROUSSET, M. RIVES 1990: Wheat (*Triticum aestivum*): *in vitro* production and utilisation of doubled haploids. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 12: Haploids in Crop Improvement I*, 101-124. Springer-Verlag, Berlin.
- POWELL, W., E. M. BORRINO, M. J. ALLISON, D. W. GRIFFITHS, M. J. C. ASHER, J. M. DUNWELL 1986: Genetical analysis of microspore derived plants of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* **72**, 619-626.
- POWELL, W., R. P. ELLIS, M. MACAULAY, J. MCNICOL, B. P. FORSTER 1990: The effect of selection for protein and isozyme loci on quantitative traits in a doubled haploid population of barley. *Heredity* **65**, 115-122.

- PREDIERI, S., F. FASOLO FABRI MALAVASI 1989: High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* **17**, 133-142.
- PROMEGA 2002: Internet-Adresse: <http://www.promega.com/CatalogProducts.asp?catalog%5Fname=Promega%5Fproducts&category%5Fname=&d03.05.2002>
- QUARTA, R., S. ARONE 1987: Peroxidase polymorphism in apple cultivars. *Adv. Hort. Sci.* **1**, 83-86.
- RADOLA, B. J. 1980: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 µm polyacrylamid gels on silanized glass plates or polyester films. *Electrophoresis* **1**, 43-56.
- RAO, V. P., P. SUPRASANNA, G. M. REDDY 1989: Studies on enzyme and isozyme pattern in embryogenic glume calli of maize. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.* **55**, 277-280.
- RAQUIN, C. 1985: Induction of haploid plants by *in vitro* culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen. *Z. Pflanzenzüchtg.* **94**, 166-169.
- REINERT, J., Y. P. S. BAJAJ 1977. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag, New York.
- RIVARD, S. R., M. K. SABA-EL-LEIL 1994: RFLP analyses and segregation of molecular markers in plants produced by anther *in vitro* culture, selfing, and reciprocal crosses of two lines of self-incompatible *Solanum chacoense*. *Genome* **37**, 775-783.
- ROTINO, G. L., M. SCHIAVI, E. VICINI, A. FALAVIGNA 1991: Variation among androgenetic and embryogenetic lines of eggplant (*Solanum melongena* L.). *J. Genet. Breed.* **45**, 141-146.
- ROUX, L., Y. ROUX 1983: Identification biochimique de clones et de lignées d' asperge. II. Caractères particuliers liés à l'état homozygote ou hétérozygote. *Agronomie* **3**, 57-66.
- RYCHTER, A., K. SKUDNICKA, S. LEWAK 1972: Acid phosphatase and the low temperature requirement of apple seed stratification. *Physiologie Vegetale* **10**, 671-676.
- SAN NOEUM, L. H., N. AHMADI 1982: Variability of doubled haploids from *in vitro* androgenesis and gynogenesis in *Hordeum vulgare* L. In: EARLE, L. , Y. DEMARLY (eds.) *Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture*, 273-283. Praeger Press, New York.
- SAX, K. 1933: The origin of the *Pomoideae*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **30**, 147-150.
- SCANDALIOS, J. G. 1969: Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochem. Genet.* **3**, 37-39.
- SCANDALIOS, J. G. 1974: Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**, 225-258.
- SCHÖN, C., M. SANCHEZ, T. BLAKE, P. M. HAYES 1990: Segregation of Mendelian markers in doubled haploid and F<sub>2</sub> progeny of a barley cross. *Hereditas* **113**, 69-72.

- SCHUM, A., A. WILLERS, H. SCHMIDT 1999: In-vitro-Mutagenese bei *Malus × domestica* – Induktion von Mehltaresistenz. Erwerbsobstbau **41**, 131-137.
- SNAPE, J. W., L. A. SITICH, E. SIMPSON, B. B. PARKER 1988: Tests for the presence of gametoclonal variation in barley and wheat doubled haploids using the *Hordeum bulbosum* system. Theor. Appl. Genet. **75**, 509-513.
- SREE RAMUMU, K. 1982: Genetic instability at the *S*-locus of *Lycopersicon peruvianum* plants regenerated from *in vitro* culture of anthers: generation of new *S*-specificities and *S*-allele reversions. Heredity **49**, 319-330.
- SRIVASTAVA, P. S., A. STEINHAEUER 1981: Isozymes in differentiating shoot bud cultures of *Betula pendula* Roth. Z. Pflanzenphysiol. **103**, 341-346.
- STAM, P. 1993: Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. Plant Journal **3**, 739-744.
- STAM, P., J. W. VAN OOIJEN 1995: JoinMap (tm) version 2.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen.
- ŠTAMPAR, F., J. SMOLE, B. JAVORNIK, A. SOLAR, M. VIRŠČEK-MARN 1994: Inheritance of leaf isozymes in apple (*Malus domestica* Borkh. and *Malus floribunda* Van Houtte. In: SCHMIDT, H., M. KELLERHALS (eds.) Progress in Temperate Fruit Breeding, 301-303. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- STEBBINS, G. 1950: Polyploidy and the origin of higher categories. In: Variation and Evolution in Plants, 359-362. Columbia University Press, New York.
- STEGEMANN, H., W. BURGERMEISTER, H. FRANCKSEN, E. KRÖGERECKLENFORT 1983: Gel-Elektrophorese und Isoelektische Fokussierung. PAGE-Manual. Inst. Biochemie, BBA, Braunschweig.
- STIRN, S., H.-J. JACOBSEN 1990: Production and characterization of monoclonal antibodies against marker proteins for somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.) In: NIJKAMP, H. J. J., L. W. H. VAN DER PLAS, J. VAN AARTRIJK (eds.) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, 460-465. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- STOEHR, M., L. SZUFFA 1990: Genetic evaluation of haploid clonal lines of a single donor plant of *Populus maximowiczii*. Theor. Appl. Genet. **80**, 470-474.
- SUGANUMA, M., H. FUJIKI, H. FURUYA-SUGURI, S. YOSHIZAWA, S. YASUMOTO, Y. KATO, N. FUSEYANI, T. SUGIMURA 1990: Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumour promoter on CD-1 mouse skin. Cancer Research **50**, 3521-3525.
- SWARNAKAR, P. L., S. P. BOHRA, N. CHANDRA 1986: Biochemical changes during growth and differentiation of the callus of *Solanum surattense*. J. Plant Physiol. **126**, 75-81.
- SWARTZ, H. J., R. BORS, F. MOHAMED, S. K. NAESS 1990: The effect of *in vitro* pre-treatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. Plant Cell Tissue Organ Culture **21**, 179-184.

- TANKSLEY, S. D., C. M. RICK 1980: Isozymic gene linkage map of the tomato: Applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* **57**, 161-170.
- THOMPSON, D. M., K. CHALMERS, R. WAUGH, B. P. FORSTER, W. T. B. THOMAS, P. D. S. CALIGARI, W. POWELL 1991: The inheritance of genetic markers in microspore-derived plants of barley *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.* **81**, 487-492.
- TING, Y. C., M. G. GU 1990: Genetic stability of anther callus lines and progeny plants of maize. *Am. J. Bot.* **77**, 867-873.
- TONKS, N. K., H. CHABONNEAU, C. D. DILTZ, S. KUMAR, M. F. CICIRELLI, E. G. KREBS, K. A. WALSH, E. H. FISCHER 1989: Protein tyrosine phosphatases: Structure, properties and role in signal transduction. *Adv. Prot. Phosphatases* **5**, 149-180.
- ULLRICH, S. E., J. M. EDMISTON, A. KLEINHOF, D. A. KUDRNA, M. E. H. MAATOUGUI 1991: Evaluation of somaclonal variation in barley. *Cereal Res. Comm.* **19**, 245-260.
- VAN BELLE, H., M. E. DE BROE, R. J. WIEME 1977: L-p-bromotetramisole, a new reagent for use in measuring placental or intestinal isoenzymes of alkaline phosphatases in human serum. *Clin. Chem.* **23**, 454-459 (zit. in KOVACH et al. 1992).
- VAN ETEN, R. L., P. P. WAYMACK, D. M. REHKOPP 1974: Transition metal ion inhibition of enzyme catalyzed phosphate ester displacement reactions. *J. Amer. Chem. Soc.* **96**, 6782-6785.
- VASIL, I. K. 1988: Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Technology* **6**, 397-402.
- VERDOODT, L., A. VAN HAUTE, I. J. GODERIS, K. DE WITTE, J. KEULEMANS, W. BROOHAERTS 1998: Use of multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 294-300.
- VINTERHALTER, D. V., D. J. JAMES 1983: The use of peroxidase polymorphism in the identification of apple scion cultivars. *Sci. Hort.* **18**, 253-261.
- VINTERHALTER, D. V., D. J. JAMES 1986: The use of peroxidase polymorphism in the identification of Malling and Malling Merton apple rootstocks. *J. Hort. Science.* **61**, 147-152.
- WALBOT, V., C. A. CULLIS 1983: The plasticity of the plant genome – is it a requirement for success? *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 3-11.
- WALBOT, V., C. A. CULLIS 1985: Rapid genomic changes in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 367-396.
- WEBER, E. 1980: *Grundriss der biologischen Statistik*. Gustav-Fischer-Verlag, Jena.
- WEEDEN, N. F., R. C. LAMB 1985: Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **110**, 509-515.

- WEEDEN, N. F., R. C. LAMB 1987: Genetics and linkage analysis of 19 isozyme loci in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **112**, 865-872.
- WEEDEN, N. F., G. A. MARX 1987: Further genetic analysis and linkage relationship of isoenzyme loci in the pea. *J. Hered.* **78**, 153-159.
- WELANDER, M. 1988: Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. *J. Plant Physiol.* **132**, 738-744.
- WELANDER, M., G. MAHESWARAN 1992: Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. *J. Plant Physiol.* **140**, 223-228.
- WENZEL, G., F. HOFFMANN, E. THOMAS 1976: Heterozygous microspore-derived plants in rye. *Theor. Appl. Genet.* **48**, 205-208.
- WITTINGHOFER, A. 1998: Signal transduction via Ras. *Biol. Chem.* **379**, 933-937.
- XU, Z. H. 1990: Barley (*Hordeum vulgare* L.): Anther culture and the production of haploids. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12: Haploids in Crop Improvement I, 125-175, Springer-Verlag, Berlin.
- YAMASHIGI, M., M. YANO, Y. FUKUTA, K. FUKUI, M. OTANI, T. SHIMADA 1996: Distorted segregation of RFLP markers in regenerated plants derived from anther culture of an F<sub>1</sub> hybrid of rice. *Genes Genet. Syst.* **71**, 37-41.
- YEPES, L., H. S. ALDWINCKLE 1994: Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **37**, 257-269.
- ZHANG, Y. X., Y. LESPINASSE 1991: Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. *Euphytica* **54**, 101-109.
- ZHANG, Y. X., Y. LESPINASSE 1992: Haploidy. In: HAMMERSCHLAG, F. A., R. E. LITZ (eds.) *Biotchnology of Perennial Fruit Crops*, 57-75. C A B International, Wallingford.
- ZHONG, D., N. MICHAUX-FERRIÈRE, M. P. COUMANS 1995: Assay of double haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis: fact or artifact? I. In vitro anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **41**, 91-95.
- ZINK, M. W., I. A. VELIKY 1979: Acid phosphatases of *Ipomea* sp. cultured in vitro. 1. Influence of pH and inorganic phosphate on the formation of phosphatases. *Can. J. Bot.* **57**, 739-753.
- ZIVY, M., P. DEVEAUX, J. BLAISONNEAU, R. JEAN, H. THIELLEMENT 1992: Segregation distortion and linkage studies on microspore-derived double-haploid lines of *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 919-924.

## Anhang

**Tab. A.1:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

Genotyp	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
Elstar	Behandlung	20	4,11	0,21	1,56
	Wiederholung	2	0,23	0,11	0,86
	Fehler	40	5,26	0,13	
	Gesamt	62	9,59		
Gala	Behandlung	20	2,26	0,11	2,80 **
	Wiederholung	2	1,24	0,62	15,34 ***
	Fehler	40	1,61	0,04	
	Gesamt	62	5,10		
Golden Delicious	Behandlung	20	4,46	0,22	6,32 ***
	Wiederholung	2	0,38	0,19	5,45 **
	Fehler	40	1,41	0,04	
	Gesamt	62	6,25		
Pinova	Behandlung	20	7,20	0,35	22,49 ***
	Wiederholung	2	0,15	0,01	0,71
	Fehler	40	0,64	0,02	
	Gesamt	62	7,86		
Reka	Behandlung	20	2,37	0,12	2,22 *
	Wiederholung	2	2,22	1,11	20,84 ***
	Fehler	40	2,13	0,05	
	Gesamt	62	6,72		
Remo	Behandlung	20	13,48	0,67	4,43 ***
	Wiederholung	2	0,81	0,40	2,65
	Fehler	40	6,08	0,15	
	Gesamt	62	20,37		
Retina	Behandlung	20	79,24	3,96	8,68 ***
	Wiederholung	2	0,16	0,08	0,17
	Fehler	40	18,26	0,46	
	Gesamt	62	97,66		
<i>M. robusta</i>	Behandlung	20	7,03	0,35	21,08 ***
	Wiederholung	2	0,15	0,07	4,50 *
	Fehler	40	0,67	0,02	
	Gesamt	62	7,85		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.2:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der NaF-Konzentration (ohne 'Retina' und Kontrollvariante) auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
Genotyp	6	56,46	9,41	186,54 ***
Konzentration	9	3,63	0,40	8,00 ***
Wechselwirkung	54	6,91	0,13	2,54 ***
Wiederholung	2	6,04	3,02	59,84 ***
Fehler	138	6,96	0,05	
Gesamt	209	80,00		

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.3:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Konzentration (ohne 'Retina' und Kontrollvariante) auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
Genotyp	6	87,16	14,53	420,86 ***
Konzentration	9	2,49	0,28	8,01 ***
Wechselwirkung	54	4,51	0,08	2,42 ***
Wiederholung	2	3,75	1,87	54,26 ***
Fehler	138	4,76	0,03	
Gesamt	209	102,67		

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.4:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten des Genotyps 'Elstar' gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	7	4,13	0,59	17,88 ***
	Wiederholung	2	0,14	0,07	
	Fehler	14	0,46	0,03	
	Gesamt	23	4,73		
7.-12.	Behandlung	7	2,82	0,40	7,72 ***
	Wiederholung	2	0,29	0,15	
	Fehler	14	0,73	0,05	
	Gesamt	23	3,84		
13.-18.	Behandlung	7	1,75	0,25	3,22 *
	Wiederholung	2	0,14	0,07	
	Fehler	14	1,09	0,08	
	Gesamt	23	2,98		
0.-18.	Behandlung	7	2,66	0,38	12,01 ***
	Wiederholung	2	0,16	0,08	
	Fehler	14	0,44	0,03	
	Gesamt	23	3,26		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.5:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten des Genotyps 'Gala' gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	7	1,15	0,16	14,58 *** 0,55
	Wiederholung	2	0,01	0,01	
	Fehler	14	0,16	0,01	
	Gesamt	23	1,33		
7.-12.	Behandlung	7	0,97	0,14	13,13 *** 0,03
	Wiederholung	2	< 0,01	< 0,01	
	Fehler	14	0,15	0,01	
	Gesamt	23	1,12		
13.-18.	Behandlung	7	0,76	0,11	3,50 * 0,37
	Wiederholung	2	0,02	0,01	
	Fehler	14	0,44	0,03	
	Gesamt	23	1,22		
0.-18.	Behandlung	7	0,86	0,12	25,52 *** 0,34
	Wiederholung	2	< 0,01	< 0,01	
	Fehler	14	0,07	< 0,01	
	Gesamt	23	0,93		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.6:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten des Genotyps 'Golden Delicious' gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	7	6,16	0,88	27,36 *** 1,79
	Wiederholung	2	0,12	0,06	
	Fehler	14	0,45	0,03	
	Gesamt	23	6,73		
7.-12.	Behandlung	7	6,11	0,87	12,52 *** 0,26
	Wiederholung	2	0,04	0,02	
	Fehler	14	0,98	0,07	
	Gesamt	23	7,12		
13.-18.	Behandlung	7	1,34	0,19	4,66 ** 1,22
	Wiederholung	2	0,10	0,05	
	Fehler	14	0,58	0,04	
	Gesamt	23			
0.-18.	Behandlung	7	3,80	0,54	13,35 *** 0,43
	Wiederholung	2	0,03	0,02	
	Fehler	14	0,57	0,04	
	Gesamt	23	4,40		

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.7:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten des Genotyps 'Pinova' gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	7	3,11	0,44	17,33 *** 0,44
	Wiederholung	2	0,02	0,01	
	Fehler	14	0,36	0,03	
	Gesamt	23	3,49		
7.-12.	Behandlung	7	1,40	0,20	10,68 *** 0,36
	Wiederholung	2	0,01	0,01	
	Fehler	14	0,26	0,02	
	Gesamt	23	1,67		
13.-18.	Behandlung	7	0,44	0,06	4,89 ** 0,57
	Wiederholung	2	0,01	0,01	
	Fehler	14	0,18	0,01	
	Gesamt	23	0,63		
0.-18.	Behandlung	7	1,58	0,23	17,86 *** 0,57
	Wiederholung	2	0,01	0,01	
	Fehler	14	0,18	0,01	
	Gesamt	23	1,77		

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.8:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten des Genotyps 'Reka' gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	7	3,83	0,55	44,83 *** 0,53
	Wiederholung	2	0,01	0,01	
	Fehler	14	0,17	0,01	
	Gesamt	23	4,01		
7.-12.	Behandlung	7	3,22	0,46	36,19 *** 0,61
	Wiederholung	2	0,01	0,01	
	Fehler	14	0,18	0,01	
	Gesamt	23	3,41		
13.-18.	Behandlung	7	2,15	0,31	25,51 *** 0,15
	Wiederholung	2	< 0,01	< 0,01	
	Fehler	14	0,17	0,01	
	Gesamt	23	3,32		
0.-18.	Behandlung	7	2,27	0,32	48,13 *** 0,38
	Wiederholung	2	0,01	< 0,01	
	Fehler	14	0,09	0,01	
	Gesamt	23	2,37		

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.9:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten des Genotyps 'Remo' gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	7	3,30	0,47	26,77 ***
	Wiederholung	2	0,11	0,05	
	Fehler	14	0,25	0,02	
	Gesamt	23	3,65		
7.-12.	Behandlung	7	6,89	0,98	10,99 ***
	Wiederholung	2	0,28	0,14	
	Fehler	14	1,25	0,09	
	Gesamt	23	8,42		
13.-18.	Behandlung	7	8,62	1,23	10,76 ***
	Wiederholung	2	0,05	0,03	
	Fehler	14	1,60	0,11	
	Gesamt	23	10,27		
0.-18.	Behandlung	7	5,94	0,85	25,84 ***
	Wiederholung	2	0,11	0,05	
	Fehler	14	0,46	0,03	
	Gesamt	23	6,50		

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.10:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten des Genotyps 'Retina' gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	7	4,28	0,61	0,92
	Wiederholung	2	2,31	1,15	1,74
	Fehler	14	9,29	0,66	
	Gesamt	23	15,88		
7.-12.	Behandlung	7	3,43	0,49	1,36
	Wiederholung	2	0,63	0,32	0,88
	Fehler	14	5,05	0,36	
	Gesamt	23	9,11		
13.-18.	Behandlung	7	1,07	0,15	1,03
	Wiederholung	2	< 0,01	< 0,01	0,01
	Fehler	14	2,09	0,15	
	Gesamt	23	3,16		
0.-18.	Behandlung	7	8,42	1,20	0,98
	Wiederholung	2	3,44	1,72	1,40
	Fehler	14	17,15	1,22	
	Gesamt	23	29,00		

**Tab. A.11:** Regenerationsraten (%) von Primärexplantaten verschiedener Apfelgenotypen während definierter Kultivierungsphasen in Abhängigkeit von der Konzentration der Phosphataseinhibitoren NaF und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

Genotyp	Kultivierungsphase (Woche)	Behandlung und Konzentration (µM)							
		Kontrolle 1	Kontrolle 2	NaF			Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		
		0	0	5	50	100	5	50	100
Elstar	0.-6.	33,3	40,0	56,7	56,7	53,3	66,7	76,7	53,3
	7.-12.	30,0	26,7	53,3	56,7	36,7	53,3	56,7	43,3
	13.-18.	30,0	26,7	43,3	36,7	43,3	53,3	53,3	40,0
	0.-18.	53,3	63,3	80,0	76,7	70,0	76,7	96,7	80,0
Gala	0.-6.	70,0	63,3	76,7	73,3	70,0	70,0	83,3	76,7
	7.-12.	60,0	60,0	70,0	83,3	70,0	70,0	76,7	70,0
	13.-18.	53,3	53,3	63,3	76,7	70,0	63,3	60,0	60,0
	0.-18.	93,3	100	90,0	90,0	90,0	100	93,3	96,7
Golden Delicious	0.-6.	43,3	43,3	53,3	66,7	70,0	60,0	63,3	66,7
	7.-12.	26,7	30,0	46,7	53,3	60,0	43,3	63,3	63,3
	13.-18.	30,0	30,0	43,3	46,7	46,7	46,7	63,3	60,0
	0.-18.	63,3	63,3	66,7	86,7	86,7	73,3	83,3	93,3
Pinova	0.-6.	76,7	73,3	80,0	100	86,7	96,7	100	96,7
	7.-12.	66,7	63,3	83,3	83,3	80,0	93,3	86,7	90,0
	13.-18.	66,7	63,4	73,3	76,7	80,0	73,3	76,1	83,3
	0.-18.	93,3	80,0	96,7	100	93,3	100	100	100
Reka	0.-6.	43,3	36,7	66,7	56,7	56,7	63,3	70,0	66,7
	7.-12.	63,3	53,3	80,0	60,0	60,0	90,0	96,7	76,7
	13.-18.	70,0	63,3	80,0	56,7	56,7	80,0	93,3	66,7
	0.-18.	86,7	90,0	96,7	90,0	90,0	100	100	86,7

Tab. A.11: Fortsetzung.

Genotyp	Kultivierungsphase (Woche)	Behandlung und Konzentration ( $\mu\text{M}$ )							
		Kontrolle 1	Kontrolle 2	NaF			Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		
				0	0	5	50	100	5
Remo	0.-6.	33,3	26,7	50,0	46,7	43,3	43,3	46,7	43,3
	7.-12.	23,3	23,3	46,7	50,0	40,0	46,7	43,3	40,0
	13.-18.	23,3	23,3	43,3	43,3	36,7	56,7	43,3	40,0
	0.-18.	53,3	50,0	70,0	90,0	66,7	80,0	70,0	80,0
Retina	0.-6.	16,7	13,3	6,7	0	13,3	3,3	16,7	20,0
	7.-12.	10,0	3,3	0	3,3	16,7	3,3	6,7	10,0
	13.-18.	3,3	0	0	0	6,7	0	0	6,7
	0.-18.	20,0	16,7	6,7	3,3	20,0	6,7	23,3	20,0

**Tab. A.12:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der NaF-Konzentration (ohne 'Retina' und Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Genotyp	5	10,40	2,08	97,02 ***
	Konzentration	2	0,15	0,07	3,49 *
	Wechselwirkung	10	1,36	0,14	6,36 ***
	Wiederholung	2	0,03	0,02	0,71
	Fehler	34	0,73	0,02	
	Gesamt	53	12,67		
7.-12.	Genotyp	5	6,06	1,21	32,83 ***
	Konzentration	2	< 0,01	< 0,01	0,05
	Wechselwirkung	10	1,84	0,18	4,99 ***
	Wiederholung	2	0,03	0,02	0,47
	Fehler	34	1,26	0,04	
	Gesamt	53	9,20		
13.-18.	Genotyp	5	7,52	1,50	63,92 ***
	Konzentration	2	0,13	0,06	2,70
	Wechselwirkung	10	1,17	0,12	4,96 ***
	Wiederholung	2	0,02	0,01	0,46
	Fehler	34	0,08	0,02	
	Gesamt	53	9,63		
0.-18.	Genotyp	5	5,91	1,18	60,85 ***
	Konzentration	2	0,03	0,02	0,93
	Wechselwirkung	10	1,23	0,12	6,35 ***
	Wiederholung	2	0,02	0,01	0,49
	Fehler	34	0,66	0,02	
	Gesamt	53	7,86		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.13:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Konzentration (ohne 'Retina' und Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Genotyp	5	18,60	3,71	161,36 ***
	Konzentration	2	0,73	0,37	15,95 ***
	Wechselwirkung	10	0,67	0,07	2,92 ***
	Wiederholung	2	0,04	0,02	0,80
	Fehler	34	0,78	0,02	
	Gesamt	53	20,77		
7.-12.	Genotyp	5	10,60	2,11	64,72 ***
	Konzentration	2	0,91	0,45	13,92 ***
	Wechselwirkung	10	0,84	0,08	2,59 *
	Wiederholung	2	0,06	0,03	0,86
	Fehler	34	1,11	0,03	
	Gesamt	53	13,48		
13.-18.	Genotyp	5	7,54	1,51	48,49 ***
	Konzentration	2	0,45	0,23	7,29 **
	Wechselwirkung	10	1,33	0,13	4,28 ***
	Wiederholung	2	0,03	0,02	0,55
	Fehler	34	1,06	0,03	
	Gesamt	53	10,41		
0.-18.	Genotyp	5	9,60	1,92	124,73 ***
	Konzentration	2	0,74	0,37	24,18 ***
	Wechselwirkung	10	0,64	0,06	4,16 ***
	Wiederholung	2	< 0,01	< 0,01	0,07
	Fehler	34	0,52	0,02	
	Gesamt	53	11,51		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.14:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvariante) auf die Anzahl der aus sekundären Kalli des Genotyps 'Elstar' regenerierten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	6	16,88	2,81	13,50 ***
	Wiederholung	2	0,58	0,29	1,38
	Fehler	12	2,50	0,21	
	Gesamt	20	19,96		
7.-12.	Behandlung	6	7,51	1,25	3,78 *
	Wiederholung	2	0,69	0,35	1,05
	Fehler	12	3,97	0,33	
	Gesamt	20	12,18		
13.-18.	Behandlung	6	10,45	1,74	4,04 *
	Wiederholung	2	0,46	0,23	0,53
	Fehler	12	5,17	0,43	
	Gesamt	20	16,08		
19.-24.	Behandlung	6	10,92	1,82	3,73 *
	Wiederholung	2	0,35	0,18	0,36
	Fehler	12	5,85	0,49	
	Gesamt	20	17,11		
0.-24.	Behandlung	6	23,59	3,93	26,83 ***
	Wiederholung	2	0,66	0,33	2,25
	Fehler	12	1,76	0,15	
	Gesamt	20	26,01		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.15:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvariante) auf die Anzahl der aus sekundären Kalli des Genotyps 'Gala' regenerierten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	6	4,04	0,67	58,27 ***
	Wiederholung	2	0,01	0,00	
	Fehler	12	0,14	0,01	
	Gesamt	20	4,17		
7.-12.	Behandlung	6	7,29	1,22	56,76 ***
	Wiederholung	2	0,16	0,08	
	Fehler	12	0,26	0,02	
	Gesamt	20	7,71		
13.-18.	Behandlung	6	3,85	0,64	19,05 ***
	Wiederholung	2	0,11	0,06	
	Fehler	12	0,40	0,03	
	Gesamt	20	4,37		
19.-24.	Behandlung	6	14,04	2,34	6,13 **
	Wiederholung	2	1,49	0,74	
	Fehler	12	4,58	0,38	
	Gesamt	20	20,11		
0.-24.	Behandlung	6	3,22	0,54	26,90 ***
	Wiederholung	2	0,03	0,01	
	Fehler	12	0,24	0,02	
	Gesamt	20	3,50		

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.16:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvariante) auf die Anzahl der aus sekundären Kalli des Genotyps 'Golden Delicious' regenerierten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	6	8,08	1,35	6,10 **
	Wiederholung	2	0,02	0,01	
	Fehler	12	2,65	0,22	
	Gesamt	20	10,75		
7.-12.	Behandlung	6	3,48	0,58	1,82
	Wiederholung	2	0,31	0,16	
	Fehler	12	3,83	0,32	
	Gesamt	20	7,62		
13.-18.	Behandlung	6	7,64	1,27	7,11 **
	Wiederholung	2	0,01	< 0,01	
	Fehler	12	2,15	0,18	
	Gesamt	20	9,80		
19.-24.	Behandlung	6	3,90	0,65	3,32 *
	Wiederholung	2	0,95	0,48	
	Fehler	12	2,35	0,20	
	Gesamt	20	7,20		
0.-24.	Behandlung	6	8,05	1,34	4,51 *
	Wiederholung	2	0,05	0,02	
	Fehler	12	3,57	0,30	
	Gesamt	20	11,67		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

**Tab. A.17:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvariante) auf die Anzahl der aus sekundären Kalli des Genotyps 'Pinova' regenerierten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	6	3,79	0,63	45,58 ***
	Wiederholung	2	0,02	0,01	
	Fehler	12	0,17	0,17	
	Gesamt	20	3,98		
7.-12.	Behandlung	6	2,80	0,47	5,42 **
	Wiederholung	2	0,05	0,02	
	Fehler	12	1,03	0,09	
	Gesamt	20	3,88		
13.-18.	Behandlung	6	3,58	0,60	6,72 **
	Wiederholung	2	0,33	0,17	
	Fehler	12	1,07	0,09	
	Gesamt	20	4,98		
19.-24.	Behandlung	6	3,11	0,52	2,02
	Wiederholung	2	0,16	0,08	
	Fehler	12	3,08	0,26	
	Gesamt	20	6,35		
0.-24.	Behandlung	6	3,64	0,61	36,62 ***
	Wiederholung	2	0,01	0,01	
	Fehler	12	0,20	0,02	
	Gesamt	20	3,85		

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.18:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvariante) auf die Anzahl der aus sekundären Kalli des Genotyps 'Reka' regenerierten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	6	4,12	0,69	13,67 ***
	Wiederholung	2	0,01	0,01	
	Fehler	12	0,60	0,05	
	Gesamt	20	4,74		
7.-12.	Behandlung	6	0,94	0,16	4,28 *
	Wiederholung	2	0,17	0,08	
	Fehler	12	0,44	0,04	
	Gesamt	20	1,54		
13.-18.	Behandlung	6	2,05	0,34	4,31 *
	Wiederholung	2	0,13	0,07	
	Fehler	12	0,95	0,08	
	Gesamt	20	3,13		
19.-24.	Behandlung	6	3,71	0,62	1,43
	Wiederholung	2	1,62	0,81	
	Fehler	12	5,19	0,43	
	Gesamt	20	10,52		
0.-24.	Behandlung	6	1,13	0,19	4,44 *
	Wiederholung	2	0,04	0,02	
	Fehler	12	0,51	0,04	
	Gesamt	20	1,68		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.19:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvariante) auf die Anzahl der aus sekundären Kalli des Genotyps 'Remo' regenerierten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	6	18,40	3,06	36,19 ***
	Wiederholung	2	1,47	0,73	
	Fehler	12	1,01	0,08	
	Gesamt	20	20,84		
7.-12.	Behandlung	6	8,45	1,41	2,87
	Wiederholung	2	0,68	0,34	
	Fehler	12	5,90	0,49	
	Gesamt	20	15,03		
13.-18.	Behandlung	6	6,99	1,16	2,14
	Wiederholung	2	0,22	0,11	
	Fehler	12	6,54	0,54	
	Gesamt	20	13,75		
19.-24.	Behandlung	6	2,29	0,38	4,00 *
	Wiederholung	2	0,19	0,10	
	Fehler	12	1,14	0,10	
	Gesamt	20	3,62		
0.-24.	Behandlung	6	23,18	3,87	29,68 ***
	Wiederholung	2	1,05	0,52	
	Fehler	12	1,56	0,13	
	Gesamt	20	25,79		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.20:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener NaF- und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Behandlungen (einschließlich der Kontrollvariante) auf die Anzahl der aus sekundären Kalli des Genotyps 'Retina' regenerierten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Behandlung	6	3,04	0,51	6,21 **
	Wiederholung	2	0,03	0,02	
	Fehler	12	0,98	0,08	
	Gesamt	20	4,05		
7.-12.	Behandlung	6	0,39	0,06	1
	Wiederholung	2	0,13	0,06	1
	Fehler	12	0,77	0,06	
	Gesamt	20	1,29		
13.-18.	Behandlung	6	0,77	0,13	1
	Wiederholung	2	0,26	0,13	1
	Fehler	12	1,53	0,13	
	Gesamt	20	2,56		
19.-24.	Behandlung	6	0	0	-
	Wiederholung	2	0	0	-
	Fehler	12	0	0	
	Gesamt	20	0	0	
0.-24.	Behandlung	6	6,90	1,15	6,32 **
	Wiederholung	2	0,24	0,12	
	Fehler	12	2,18	0,18	
	Gesamt	20	9,33		

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

**Tab. A.21:** Regenerationsraten (%) von sekundären Kalluslinien verschiedener Apfelgenotypen in Abhängigkeit von der Konzentration der Phosphataseinhibitoren NaF und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> während definierter Kultivierungsphasen.

Genotyp	Kultivierungsphase (Woche)	Behandlung und Konzentration (µM)						
		Kontrolle	NaF			Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		
			0	5	50	100	5	50
Elstar	0.-6.	0	4,2	16,7	16,7	29,2	33,3	25,0
	7.-12.	0	8,3	8,3	20,8	20,8	12,5	16,7
	13.-18.	0	4,2	8,3	16,7	20,8	20,8	12,5
	19.-24.	0	4,2	0	20,8	12,5	4,2	8,3
	0.-24.	0	8,3	25,0	45,8	41,7	54,2	33,3
Gala	0.-6.	66,7	41,7	66,7	58,3	54,2	100	83,3
	7.-12.	29,2	25,0	66,7	54,2	41,7	79,2	50,0
	13.-18.	45,8	33,3	66,7	50,0	58,3	91,7	45,8
	19.-24.	25,0	4,2	41,7	45,8	41,7	16,7	4,2
	0.-24.	75,0	62,5	79,2	70,8	75,0	100	87,5
Golden Delicious	0.-6.	16,7	12,5	33,3	29,2	45,8	70,8	58,3
	7.-12.	16,7	8,3	25,0	25,0	29,2	41,7	8,3
	13.-18.	4,2	12,5	20,8	20,8	33,3	45,8	16,7
	19.-24.	4,2	0	4,2	16,7	8,3	12,5	12,5
	0.-24.	29,2	16,7	50,0	50,0	54,2	79,2	62,5
Pinova	0.-6.	37,5	20,8	41,7	33,3	58,3	66,7	62,5
	7.-12.	29,2	20,8	25,0	16,7	29,2	41,7	29,2
	13.-18.	8,3	8,3	12,5	16,7	37,5	29,2	16,7
	19.-24.	0	4,2	8,3	4,2	0	16,7	0
	0.-24.	41,7	33,3	66,7	41,7	58,3	83,3	70,8

Tab. A.21: Fortsetzung.

Genotyp	Kultivierungsphase (Woche)	Behandlung und Konzentration ( $\mu\text{M}$ )							
		Kontrolle	NaF				Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		
			0	5	50	100	5	50	100
Reka	0.-6.	40,0	73,3	60,0	33,3	60,0	86,7	60,0	
	7.-12.	33,3	80,0	46,7	60,0	80,0	73,3	66,7	
	13.-18.	33,3	93,3	40,0	53,3	60,0	60,0	66,7	
	19.-24.	6,7	46,7	20,0	6,7	20,0	6,7	20,0	
	0.-24.	60,0	93,3	80,0	66,7	100	100	100	
Remo	0.-6.	5,6	16,7	16,7	22,2	22,2	27,8	5,6	
	7.-12.	0	5,6	27,8	11,1	0	11,1	0	
	13.-18.	0	0	11,1	11,1	0	5,6	0	
	19.-24.	0	0	0	11,1	0	0	0	
	0.-24.	5,6	16,7	33,3	27,8	22,2	33,3	5,6	
Retina	0.-6.	4,2	4,2	4,2	0	0	12,5	0	
	7.-12.	0	0	0	0	0	4,2	0	
	13.-18.	0	0	0	0	0	8,3	0	
	19.-24.	0	0	0	0	0	0	0	
	0.-24.	4,2	4,2	4,2	0	0	16,7	0	

**Tab. A.22:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der NaF-Konzentration (ohne 'Retina' und Kontrollvariante) auf die Anzahl der an sekundären Kalluslinien gebildeten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Genotyp	5	27,34	5,47	42,37 ***
	Konzentration	2	3,90	1,95	15,11 ***
	Wechselwirkung	10	6,05	0,60	4,69 ***
	Wiederholung	2	0,90	0,45	3,49 *
	Fehler	36	4,39	0,13	
	Gesamt	53	42,57		
7.-12.	Genotyp	5	27,53	5,51	16,84 ***
	Konzentration	2	4,08	2,04	6,24 **
	Wechselwirkung	10	7,40	0,74	2,27 *
	Wiederholung	2	1,09	0,54	1,67
	Fehler	36	11,11	0,33	
	Gesamt	53	51,22		
13.-18.	Genotyp	5	45,03	9,01	29,03 ***
	Konzentration	2	9,57	4,78	15,42 ***
	Wechselwirkung	10	6,36	0,64	2,05
	Wiederholung	2	1,20	0,60	1,93
	Fehler	36	10,55	0,31	
	Gesamt	53	72,70		
19.-24.	Genotyp	5	16,49	3,30	8,17 ***
	Konzentration	2	4,42	2,21	5,48 **
	Wechselwirkung	10	15,72	1,57	3,90 **
	Wiederholung	2	0,29	0,15	0,36
	Fehler	36	13,72	0,40	
	Gesamt	53	50,64		
0.-24.	Genotyp	5	30,30	6,07	48,39 ***
	Konzentration	2	6,69	3,35	26,71 ***
	Wechselwirkung	10	7,55	0,76	6,03 ***
	Wiederholung	2	0,96	0,48	3,85 *
	Fehler	36	4,26	0,13	
	Gesamt	53	49,77		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.23:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Konzentration (ohne 'Retina' und Kontrollvariante) auf die Anzahl der an sekundären Kalluslinien gebildeten Sprosse in unterschiedlichen Kultivierungsphasen.

Kultivierungsphase (Woche)	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
0.-6.	Genotyp	5	40,84	8,17	147,28 ***
	Konzentration	2	1,96	0,98	17,69 ***
	Wechselwirkung	10	3,45	0,35	6,23 ***
	Wiederholung	2	0,26	0,13	2,30
	Fehler	36	1,89	0,06	
	Gesamt	53	48,40		
7.-12.	Genotyp	5	40,67	8,13	81,85 ***
	Konzentration	2	1,20	0,60	6,03 **
	Wechselwirkung	10	3,72	0,37	3,74 **
	Wiederholung	2	0,41	0,21	0,21
	Fehler	36	3,38	0,10	
	Gesamt	53	49,38		
13.-18.	Genotyp	5	60,98	12,20	103,40 ***
	Konzentration	2	1,89	0,95	8,01 **
	Wechselwirkung	10	2,17	0,22	1,84 *
	Wiederholung	2	0,18	0,09	0,78
	Fehler	36	4,01	0,12	
	Gesamt	53	69,23		
19.-24.	Genotyp	5	7,84	1,57	5,20 **
	Konzentration	2	0,75	0,38	1,25
	Wechselwirkung	10	9,17	0,92	3,04 **
	Wiederholung	2	2,62	1,31	4,34 *
	Fehler	36	10,25	0,30	
	Gesamt	53	30,64		
0.-24.	Genotyp	5	61,42	12,28	202,61 ***
	Konzentration	2	1,75	0,87	14,41 ***
	Wechselwirkung	10	3,33	0,33	5,50 ***
	Wiederholung	2	0,44	0,22	3,62 *
	Fehler	36	2,06	0,06	
	Gesamt	53	69,00		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.24:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der Endothall-Konzentration im Bereich von 1 bis 100  $\mu\text{M}$  (ohne 'Retina' und Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

<b>Varianzursache</b>	<b>FG</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F-Wert</b>
Genotyp	5	9,17	1,83	26,72 ***
Konzentration	4	157,86	39,46	575,12 ***
Wechselwirkung	20	10,86	0,54	7,91 ***
Wiederholung	2	0,07	0,04	0,53
Fehler	58	3,98	0,07	
Gesamt	89	181,94		

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.25:** Regenerationsraten (%) unter dem Einfluss verschiedener Endothall-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 100  $\mu\text{M}$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei Wiederholungen mit je zehn Explantaten.

<b>Konzentration (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Regenerationsrate (%)</b>						
	<b>Elstar</b>	<b>Gala</b>	<b>Golden Delicious</b>	<b>Pinova</b>	<b>Reka</b>	<b>Remo</b>	<b>Retina</b>
0 (Kontrolle 1)	33,3	73,3	43,3	90,0	53,3	10,0	15,0
0 (Kontrolle 2)	40,0	73,3	43,3	83,3	50,0	13,3	6,7
1	70,0	80,0	86,7	100	66,7	80,0	20,0
5	36,7	30,0	53,3	36,7	10,0	6,7	3,3
25	6,7	6,7	6,7	13,3	3,3	0	3,3
50	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	3,3	0

**Tab. A.26:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses von Endothallkonzentrationen im Bereich von 0 bis 100  $\mu\text{M}$  auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

Genotyp	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
Elstar	Konzentration	6	30,30	5,05	129,45 ***
	Wiederholung	2	0,12	0,06	1,54
	Fehler	12	0,47	0,04	
	Gesamt	20	30,89		
Gala	Konzentration	6	49,49	8,25	167,84 ***
	Wiederholung	2	0,10	0,05	0,97
	Fehler	12	0,59	0,05	
	Gesamt	20	50,18		
Golden Delicious	Konzentration	6	39,15	6,53	124,96 ***
	Wiederholung	2	0,09	0,05	0,87
	Fehler	12	0,62	0,05	
	Gesamt	20	39,87		
Pinova	Konzentration	6	63,88	10,65	396,98 ***
	Wiederholung	2	0,02	0,01	0,44
	Fehler	12	0,32	0,03	
	Gesamt	20	64,23		
Reka	Konzentration	6	28,98	4,83	7,18 ***
	Wiederholung	2	0,31	0,15	0,24
	Fehler	12	1,13	0,09	
	Gesamt	20	30,41		
Remo	Konzentration	6	17,94	2,99	2,35 ***
	Wiederholung	2	0,10	0,05	0,53
	Fehler	12	0,86	0,07	
	Gesamt	20	18,90		
Retina	Konzentration	6	3,70	0,62	7,44 *
	Wiederholung	2	0,41	0,20	2,46
	Fehler	12	0,99	0,08	
	Gesamt	20	5,11		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.27:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der Endothallkonzentration im Bereich von 0,05 bis 1  $\mu$ M (ohne 'Retina' und Kontrollvarianten ) auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

<b>Varianzursache</b>	<b>FG</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F-Wert</b>
Genotyp	5	15,11	3,02	113,22 ***
Konzentration	3	0,15	3,02	1,86
Wechselwirkung	15	1,44	1,00	3,60 ***
Wiederholung	2	0,07	0,03	1,30
Fehler	46	1,23	0,03	
Gesamt	71	18,00		

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.28:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses von Endothallkonzentrationen im Bereich von 0 bis 1  $\mu\text{M}$  auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

Genotyp	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
Elstar	Konzentration	5	3,12	0,62	41,19 ***
	Wiederholung	2	0,03	0,02	
	Fehler	10	0,15	0,02	
	Gesamt	17	3,30		
Gala	Konzentration	5	1,29	0,26	8,98 **
	Wiederholung	2	0,11	0,06	
	Fehler	10	0,29	0,03	
	Gesamt	17	1,69		
Golden Delicious	Konzentration	5	8,12	1,62	32,25 ***
	Wiederholung	2	0,03	0,02	
	Fehler	10	0,50	0,05	
	Gesamt	17	8,66		
Pinova	Konzentration	5	2,37	0,47	17,02 ***
	Wiederholung	2	0,20	0,10	
	Fehler	10	0,28	0,03	
	Gesamt	17	2,85		
Reka	Konzentration	5	0,43	0,09	3,80 *
	Wiederholung	2	0,16	0,08	
	Fehler	10	0,22	0,02	
	Gesamt	17	0,81		
Remo	Konzentration	5	10,89	2,18	14,80 ***
	Wiederholung	2	0,22	0,11	
	Fehler	10	1,47	0,15	
	Gesamt	17	12,59		
Retina	Konzentration	5	2,49	0,50	1,46
	Wiederholung	2	0,38	0,19	
	Fehler	10	3,41	0,34	
	Gesamt	17	6,28		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.29:** Regenerationsraten (%) unter dem Einfluss verschiedener Endothall-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 1  $\mu\text{M}$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei Wiederholungen mit je zehn Explantaten.

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Regenerationsrate (%)						
	Elstar	Gala	Golden Delicious	Pinova	Reka	Remo	Retina
0 (Kontrolle 1)	43,3	70,0	46,7	86,7	50,0	30,0	23,3
0 (Kontrolle 2)	50,0	73,3	50,0	80,0	53,3	23,3	26,7
0,05	63,3	93,3	76,7	83,3	63,3	70,0	26,7
0,1	63,3	93,3	83,3	93,3	63,3	56,7	6,7
0,5	63,3	70,0	76,7	83,3	60,0	60,0	23,3
1	66,7	80,0	90,0	86,7	70,0	73,3	40,0

**Tab. A.30:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener L-p-Bromotetramisoloxalat-Konzentrationen und des Genotyps (ohne 'Retina' und Kontrollvarianten) auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

<b>Varianzursache</b>	<b>FG</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F-Wert</b>
Genotyp	5	36,96	7,39	264,68 ***
Konzentration	5	13,94	2,79	99,79 ***
Wechselwirkung	25	5,76	0,23	8,25 ***
Wiederholung	2	0,11	0,05	1,89
Fehler	70	1,96	0,03	
Gesamt	107	58,72		

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.31:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener L-p-Bromotetramisoxalat-Konzentrationen auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

Genotyp	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
Elstar	Konzentration	6	7,92	1,13	55,44 *** 7,03
	Wiederholung	2	0,29	0,14	
	Fehler	12	0,29	0,02	
	Gesamt	20	8,49		
Gala	Konzentration	6	4,62	0,66	37,60 *** 3,38
	Wiederholung	2	0,12	0,06	
	Fehler	12	0,25	0,02	
	Gesamt	20	4,99		
Golden Delicious	Konzentration	6	5,85	0,84	40,84 *** 1,16
	Wiederholung	2	0,05	0,02	
	Fehler	12	0,29	0,02	
	Gesamt	20	6,19		
Pinova	Konzentration	6	1,88	0,27	3,88 *** 0,86
	Wiederholung	2	0,00	0,00	
	Fehler	12	0,20	0,01	
	Gesamt	20	2,08		
Reka	Konzentration	6	3,25	0,46	13,96 *** 0,54
	Wiederholung	2	0,04	0,02	
	Fehler	12	0,47	0,03	
	Gesamt	20	3,76		
Remo	Konzentration	6	13,48	1,93	16,29 *** 2,14
	Wiederholung	2	0,51	0,25	
	Fehler	12	1,66	0,12	
	Gesamt	20	15,64		
Retina	Konzentration	6	0,43	0,06	0,74 0,62
	Wiederholung	2	0,10	0,05	
	Fehler	12	1,16	0,08	
	Gesamt	20			

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.32:** Regenerationsraten (%) unter dem Einfluss verschiedener L-p-Bromotetramisoloxalat-Konzentrationen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei Wiederholungen mit je zehn Explantaten.

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Regenerationsrate (%)						
	Elstar	Gala	Golden Delicious	Pinova	Reka	Remo	Retina
0 (Kontrolle 1)	40,0	70,0	40,0	40,0	50,0	13,3	0
0 (Kontrolle 2)	46,7	66,7	43,3	43,3	56,7	13,3	3,3
0,1	70,0	93,3	93,3	93,3	80,0	53,3	3,3
0,5	66,7	93,3	63,3	63,3	76,7	50,0	0
1	60,0	83,3	53,3	53,3	73,3	46,7	0
5	60,0	73,3	60,0	60,0	53,3	46,7	0
10	36,7	66,7	53,3	53,3	46,7	40,0	0
25	30,0	56,7	30,0	30,0	46,7	43,3	6,7

**Tab. A.33:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der Protein-kinaseinhibitor-Behandlung auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse zu verschiedenen Boniturzeitpunkten.

Boniturzeitpunkt	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
4. Woche	Genotyp	2	0,44	0,22	5,93 *
	Behandlung	2	13,97	6,99	188,38 ***
	Wechselwirkung	4	0,88	0,22	5,93 **
	Wiederholung	2	0,01	<0,01	0,12
	Fehler	16	0,59	0,04	
	Gesamt	26	15,89		
6. Woche	Genotyp	2	2,43	1,21	8,31 **
	Behandlung	2	10,50	5,25	35,93 ***
	Wechselwirkung	4	2,20	0,55	3,77 *
	Wiederholung	2	0,20	0,10	0,68
	Fehler	16	2,34	0,15	
	Gesamt	26	17,67		
8. Woche	Genotyp	2	6,11	3,06	10,40 **
	Behandlung	2	3,09	1,54	5,25 *
	Wechselwirkung	4	2,10	0,53	1,78
	Wiederholung	2	0,86	0,43	1,47
	Fehler	16	4,70	0,29	
	Gesamt	26	16,86		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.34:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses des Genotyps und der Protein-kinaseinhibitor-Behandlung auf die Anzahl der regenerierenden Primärexplan-  
tate zu verschiedenen Boniturzeitpunkten.

Bonitur-zeitpunkt	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
4. Woche	Genotyp	2	0,13	0,06	5,29 *
	Behandlung	2	9,20	4,60	380,77 ***
	Wechselwirkung	4	0,26	0,06	5,29 **
	Wiederholung	2	<0,01	<0,01	0,19
	Fehler	16	0,19	0,01	
	Gesamt	26			
6. Woche	Genotyp	2	0,93	0,47	5,32 *
	Behandlung	2	4,36	2,18	24,83 ***
	Wechselwirkung	4	2,11	0,53	6,00 *
	Wiederholung	2	0,24	0,12	1,35
	Fehler	16	1,40	0,09	
	Gesamt	26	9,04		
8. Woche	Genotyp	2	0,62	0,31	1,97 **
	Behandlung	2	1,98	0,99	6,28
	Wechselwirkung	4	0,60	0,15	0,95
	Wiederholung	2	1,05	0,53	3,33
	Fehler	16	2,52	0,16	
	Gesamt	26	6,78		

\* signifikant bei  $p \leq 0,05$

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.35:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration und des Genotyps auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
Genotyp	4	3,90	0,98	27,12 ***
Konzentration	2	10,65	5,32	148,09 ***
Wechselwirkung	8	2,21	0,28	7,70 ***
Wiederholung	2	0,05	0,02	0,67
Fehler	28	1,01	0,04	
Gesamt	44	17,82		

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

**Tab. A.36:** Varianzanalyse zur Ermittlung des Einflusses der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Konzentration auf die Anzahl der an Primärexplantaten gebildeten Adventivsprosse.

Genotyp	Varianzursache	FG	SQ	MQ	F-Wert
Golden Delicious	Konzentration	4	3,49	0,87	11,71 **
	Wiederholung	2	0,22	0,11	1,46
	Fehler	8	0,60	0,07	
	Gesamt	14	4,30		
Pinova	Konzentration	4	1,43	0,36	23,37 ***
	Wiederholung	2	0,04	0,02	1,39
	Fehler	8	0,12	0,02	
	Gesamt	14	1,59		
<i>M. robusta</i>	Konzentration	4	1,43	0,36	31,25 ***
	Wiederholung	2	0,07	0,04	3,07
	Fehler	8	0,09	0,01	
	Gesamt	14	1,59		
Summe der Genotypen	Konzentration	4	1,16	0,29	31,98 ***
	Wiederholung	2	0,01	0,00	0,55
	Fehler	8	0,07	0,01	
	Gesamt	14	1,24		

\*\* signifikant bei  $p \leq 0,01$

\*\*\* signifikant bei  $p \leq 0,001$

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Wricke für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit, die jederzeit gewährte Unterstützung und die wertvollen fachlichen Anregungen. Herrn Prof. Dr. W. Spethmann danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, die die Arbeiten stets unterstützt haben. Insbesondere danke ich Frau Dr. M. Höfer, die mit der Bereitstellung des Pflanzenmaterials aus der Haploidentechnik und den konstruktiven Diskussionen das Zustandekommen der Arbeit maßgeblich gefördert hat. Ihr danke ich auch für die Durchsicht des Manuskripts. Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. C. Fischer für die Bereitstellung der Kreuzungspopulationen sowie Herrn Prof. Dr. S. Schmidt, der die Durchführung der Arbeiten am Institut für Obstzüchtung ermöglicht hat.

Den Mitarbeitern der Abteilung Angewandte Genetik der Universität Hannover danke ich für ihre Kooperationsbereitschaft, die mir das Erlernen der Methoden der Isoenzymanalysen und die Durchführung einiger Untersuchungen an dieser Abteilung ermöglichte. Ganz besonders erwähnen möchte ich die ausgezeichnete technische Unterstützung durch Frau I. Robotta. Ebenso gilt mein aufrichtiger Dank Frau Dr. E. Esch für die Hilfe bei der Durchführung der Kopplungsanalysen. Meine Aufenthalte in Hannover waren stets durch eine nette Arbeitsatmosphäre geprägt.

Bei Herrn Dr. W. Nast, TU Dresden, möchte ich mich für wertvolle Tipps bei der Etablierung der Elektrophoresetechnik am Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz bedanken.

Ein ganz anderer, spezieller Dank gilt meiner Familie für ihre Hilfe und ihr Verständnis sowie meinen Freunden und Bekannten, die mir mit ihren aufmunternden Worten eine moralische Unterstützung waren.



# Lebenslauf

Name: Christine Grafe  
Geboren: 4. November 1962 in Dresden  
Familienstand: ledig, 1 Kind

## Schulbildung

1969 - 1977 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule Freital  
1977 - 1981 Erweiterte Oberschule Freital

## Berufsausbildung

Sept. 1981 - Juli 1982 Ausbildung zur Gärtnerin für Zierpflanzenbau

## Hochschulausbildung

Sept 1982 - Febr. 1987 Studium der Fachrichtung Pflanzenzüchtung und  
Saatgutproduktion an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

## Berufstätigkeit

Juli 1982 - Aug. 1982 Gärtnerin für Zierpflanzenbau in der GPG "Freesia" Kreischa  
März 1987 - Dez. 1991 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Obstforschung  
Dresden-Pillnitz der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR  
seit Jan. 1992 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Obstzüchtung  
Dresden Pillnitz der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an  
Kulturpflanzen, während dieser Zeit Durchführung der Arbeiten  
für die Promotion