

**Erzeugung und Transformation haploider
regenerativer Kallusse bei
Populus nigra (L.) × hybrida**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
FRANK DEUTSCH
aus Hamburg

Hamburg 2004

Für Imme

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Großhansdorf, der Bundesanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Hamburg, in Verbindung mit dem Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg. Sie wurde durch die Forschungsinitiative „Genomanalyse am biologischen System Pflanze (GABI)“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unterstützt.

Meinem Doktorvater Herrn Dr. Matthias Fladung möchte ich für die Betreuung der Arbeit herzlich danken. Er hat mir den nötigen Freiraum eingeräumt und mich durch sein Vertrauen und sein Engagement in allen Belangen unterstützt.

Frau Prof. Dr. Birgit Ziegenhagen sei herzlich umarmt für ihr analysierendes und strukturierendes Auge.

Herrn Dr. Jochen Kumlehn danke ich vielmals für seine Hilfsbereitschaft, Diskussionsfreude und Durchsicht meines Manuskripts.

Herrn Dr. Sandeep Kumar möchte ich für zahlreiche Gespräche danken, in denen ich viel Fachliches und auch Persönliches gelernt habe.

Frau Susanne Bein, Frau Doris Ebbinghaus, Frau Katrin Groppe, Herrn Olaf Nowitzki, Frau Anke Schellhorn und Frau Inge Schulze danke ich vom Herzen für eine tolle Unterstützung und Zusammenarbeit. Frau Susanne Bein danke ich besonders dafür, mir die Pappeln ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ gezeigt zu haben.

Herrn Dieter Boedecker möchte ich für seine Tatkraft bei der Zweigernte danken.

Frau Christina Waitkus und Frau Regina Felten danke ich für ihre Hilfe bei den fotografischen Arbeiten.

Mein Dank gilt Frau Dr. Annegret Schum des Instituts für Zierpflanzenzüchtung, Ahrensburg, für die Nutzung eines Durchflussscytometers.

Herrn Prof. Dr. Dieter Eckstein und Frau Dr. Claudia Grünwald bin ich dankbar, mich zu dieser Dissertation ermuntert zu haben.

Herrn Dipl.-Biologe (jetzt bereits Doktor) Sascha Liepelt danke ich für eine lebendige, diskussionsfreudige und fruchtbare Zimmerpartnerschaft.

Meiner Familie danke ich für ihre stetige Unterstützung, ihren großen Rückhalt, und nicht zuletzt immer wieder für den Wink, dass es auch weitere wichtige Dinge neben der Doktorarbeit gibt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1. Einleitung	1
1.1. Ziel der Arbeit	1
1.2. <i>Populus</i> – ein Modellsystem für Forstbäume	1
1.3. Transposon-Tagging	3
1.4. Erzeugung haploider Pappeln	5
1.4.1. Pollenreifung	6
1.4.2. Pollenembryogenese	8
1.4.3. Die haploide Pappelforschung	10
1.5. Aufgabenstellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Pflanzenmaterial	13
2.2. Chemikalien	13
2.3. Kulturmedien	14
2.4. Pollenkultur	16
2.4.1. Auswahl und Sterilisation der Kätzchen	16
2.4.2. Isolation unreifer Pollenzellen	17
2.4.3. Kultur unreifer Pollenzellen	18
2.5. <i>Agrobacterium</i>-vermittelter Gentransfer	19
2.5.1. Verwendetes Genkonstrukt	19
2.5.2. Transformation von regenerativen Kallussen	20
2.6. Bestimmung des Ploidiegrades	20
2.6.1. Mikroskopie von Metaphase-Chromosomen	20
2.6.2. Durchflusscytometrie	20
2.7. Molekularbiologische Analysen	21
2.7.1. Isolierung genomischer Pappel-DNA	21
2.7.2. PCR-Analysen	21
2.7.3. Trennung und Färbung von PCR-Produkten für Mikrosatelliten	22
2.7.4. Trennung und Färbung von PCR-Produkten der <i>roIC</i> - und <i>Ac</i> -Amplifikation	22
2.7.5. Southern-Blot-Analyse	22

2.8. Statistische Methoden	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Etablierung einer Pollenkultur bei Populus	23
3.1.1. Auswahl eines geeigneten Genotyps als Donorpflanze unreifer Pollen	23
3.1.2. Isolation und Pollenaufreinigung	24
3.1.3. Induktion der Zellteilung und Androgenese	25
3.1.4. Zellvitalitätsrate, Populationsdichte und Kaltlagerung	26
3.1.5. Initialbehandlungen in der Kultur unreifer Pollenzellen	29
3.1.6. Pflanzenregeneration	31
3.2. Analyse des Ploidiegrades und der Zygotie	35
3.2.1. Bestimmung der Ploidiestufe erhaltener Kalluslinien mittels Durchfluscytometrie	35
3.2.2. Nachweis des haploiden Ursprungs mittels Mikrosatelliten	37
3.2.3. Verteilung der vererbten Allele innerhalb der regenerierten Kalluspopulation	40
3.3. Aufrechterhaltung haploider regenerativer Kalluslinien <i>in vitro</i>	41
3.4. Genetische Transformation haploider Pappeln	47
3.4.1. <i>Agrobacterium</i> -vermittelter Gentransfer	47
3.4.2. Transgennachweis durch PCR und Ploidiegrad transgener Linien	47
3.4.3. Transgennachweis durch Southern-Blot	49
3.4.4. Ploidieanalyse und Regeneration transgener Pflanzen	49
4. Diskussion	51
4.1. Etablierung eines Regenerationssystems aus isolierten unreifen Pappelpollen	51
4.2. Bestätigung des haploiden Ursprungs	61
4.3. Transformation haploider regenerativer Kallusse	64
4.4. Chancen des Transposon-Tagging-Ansatzes mit haploiden regenerativen Kalluslinien – ein Ausblick	65
5. Zusammenfassung	68
6. Literatur	70

Abkürzungen

Gewebekultur

BAP	6-Benzylaminopurin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
FDA	Fluoresceindiacetat
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
NAA	Naphtylessigsäure

Molekularbiologische Abkürzungen

bp	Basenpaare
U	Units, Einheiten
cDNA	Komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ac	<i>Activator</i> , Transposon aus Mais
<i>roIC</i>	<i>root locus C</i> aus <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
CaMV	Blumenkohl-Mosaik-Virus
35S	konstitutiver Promotor vom Blumenkohl-Mosaik-Virus
<i>npt II</i>	<i>Neomycin-Phosphotransferase II</i>
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Verhältnis der optischen Dichten einer DNA-Lösung bei $\lambda=260$ und 280 nm
SSR	Mikrosatellit (Simple sequence repeat)
QTL(s)	Quantitativer Eigenschaftsort (Quantitative trait locus (loci))
EST	expressed sequence tag
T-DNA	Transfer-DNA
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalzdihydrat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abb.
cm	Zentimeter
d	Tag(e)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1. Einleitung

1.1. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, von Arten bzw. Hybriden der Gattung *Populus* haploide regenerationsfähige Kallusse zu erzeugen und in eine Erhaltungskultur zu überführen. Zudem sollten haploide Regenerate auf ihre Transformierbarkeit hin überprüft und als Pflanzenmaterial für einen Transposon-Tagging-Ansatz bei Pappeln bereitgestellt werden.

1.2. *Populus* – ein Modellsystem für Forstbäume

Forstbäume als prägender Teil von Wäldern haben einen hohen ökonomischen und ökologischen Wert. Einerseits stellen die Wälder die Ressourcen für eine Holzgewinnung dar, wobei das Holz ein unverzichtbarer regenerativer Werk- und Brennstoff ist. Andererseits sind Wälder Ökosysteme, die einen unersetzlichen Schutz vor Bodenerosion, Lärm und Immissionen leisten, zum Klimaschutz (CO₂-Sequestrierung) und zur Wasserspeicherung beitragen und den Menschen Erholung und vielen Tieren und Pflanzen Lebensräume bieten. Zudem gibt es bedeutsame biologische Facetten der Baumanatomie und -physiologie, die nur anhand von Bäumen selbst untersucht werden können. Hierzu zählen insbesondere die Holzbildung, die saisonale Allokation und Deposition von Nährstoffen, die Frostabhärtung, die iterative Entwicklung der komplexen Baumkrone und der Wechsel von der juvenilen zur adulten Phase. Dieser komplexe Wechsel von juvenilem zu reifem Wachstum und die langen Generationszeiten trugen dazu bei, dass die Domestikation der Forstbäume verglichen mit der von Kulturpflanzen noch in den Kinderschuhen steckt (Taylor 2002).

Inzwischen gelang es Forst- und Holzbiologen mit Bezug auf die oben genannten Baumeigenschaften zu rechtfertigen, dass Bäume als Modellsysteme innerhalb der Botanik angesehen werden sollten, und setzten durch, dass nach der Sequenzierung des Genoms der allgemein anerkannten Modellpflanze *Arabidopsis* (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000) und des Genoms der monokotylen Modellkulturpflanze Reis (*Oryza sativa* L.) (Goff *et al.* 2002) ebenfalls die Sequenzierung eines Forstbaumgenoms initiiert wurde (<http://www.ornl.gov/ipgc/>), um die forstliche Genomforschung zu beschleunigen. Ein Individuum der Gattung *Populus*, der weibliche Klon *P. trichocarpa* 'Nisqually-1', wurde als Modellbaum ausgewählt. Allgemein werden als Gründe für die Genomsequenzierung einer

Pappelart deren schnelles Wachstum, ihr kleines Genom und ihr weitverbreiteter Einsatz in den Forstwissenschaften und in der Forstindustrie angeführt.

Unter vielen Forst- und Holzwissenschaftlern (Chaffey 1999, Robinson 1999, Dinus *et al.* 2001, Van Raemdonck *et al.* 2001, Taylor 2002, Wullschleger *et al.* 2002, Confalonieri *et al.* 2003) sehen auch Bradshaw *et al.* (2000) in *Populus* das Baummodellsystem. Sie beschrieben detailliert sowohl die Vorteile als auch die Nachteile der Pappel als Modellbaum, die hier in Kurzform wiedergegeben werden:

Vorteile der Pappel

- gut etablierte Zusammenarbeit zwischen den Pappelgenetikern, -physiologen und – pathologen
- reichhaltige genetische Variation in der Baummorphologie, -anatomie, und physiologie sowie in der Empfindlichkeit gegenüber biotischem und abiotischem Stress in natürlichen Populationen
- leichte sexuelle Vermehrung und interspezifische Hybridisierung
- enge Kopplung der physiologischen Eigenschaften und der Biomasseproduktivität
- gut charakterisierte molekulare Physiologie zur Erforschung der Signalbewegungen
- große Datensammlungen anatomischer, physiologischer und forstwirtschaftlicher Eigenschaften und auf diesen Daten basierende Wachstums- und Produktivitätsmodelle
- einfaches Klonen individueller Genotypen
- kleines Genom: 550 Mio. Basenpaare in einem haploiden Chromosomensatz, d.h. nur viermal größer als *Arabidopsis* aber ca. 40mal kleiner als relevante Gymnospermen wie Kiefer, Fichte und Tanne
- leichte Transformierbarkeit und Regeneration als Voraussetzung zur Erforschung von Genfunktionen

Nachteile der Pappel

- weltweit nur eine mittelmäßige wirtschaftliche Bedeutung
- Generationsintervalle von 4-10 Jahren
- Pappeln sind zweihäusig, eine Selbstung ist unmöglich
- das rasche Wachstum führt schnell zu hohen Pflanzen, die viel Raum und spezielle Mess- und Arbeitstechniken außerhalb der menschlichen Reichweite erfordern
- fast keine Existenz von Stammbäumen mehrerer Generationen, um z.B. QTLs gut genealogisch verfolgen zu können

Die Gattung *Populus* L. zählt zur Familie der *Salicaceae*, die mit weiteren 36 Familien nach der derzeitigen kladistischen Analyse der Ordnung *Malphigiales* angehören (Stevens 2003). Nach der allgemein anerkannten Klassifikation von Eckenwalder (1996) sind 29 Arten in sechs Sektionen in der Gattung *Populus* gruppiert. Es handelt sich weitgehend um laubabwerfende Baumarten der gemäßigten nördlichen Hemisphäre. Sie sind zweihäusig und windbestäubend. Das schnelle Wachstum der Pappeln ist für die Forst- und Holzwirtschaft interessant. In Schnellwuchsplantagen (Kurzumtriebsplantagen) können geeignete Klone ihre volle Höhe von ca. 40m bereits in 20 Jahren erreichen. Heutzutage werden Pappeln weltweit in Plantagen angebaut und hauptsächlich für Zellstoff und Papier, Verpackungsmaterialien, Holzwerkstoffprodukte und zur Energieerzeugung genutzt. In Deutschland wird ein verstärkter Einsatz von Pappelplantagen als Sonderkultur für Energieholz oder Biomasse geprüft (Hofmann 1999) und derzeit vom Verbraucherministerium mit dem Förderprogramm "Nachwachsende Rohstoffe" unterstützt (<http://www.verbraucherministerium.de>)

1.3. Transposon-Tagging

Die funktionelle Genomforschung bedient sich verschiedener Ansätze, um Gene zu identifizieren und ihre Funktion zu charakterisieren. In der Pappelgenomforschung wurden hierfür neben der oben beschriebenen Genomsequenzierung bereits über 100.000 Expressed-Sequenz-Tags von 18 cDNA-Banken sequenziert und annotiert (Jansson *et al.* 2003). Genhomologe (*PTLF*, *Populus trichocarpa*-Homolog von *LEAFY*; Rottmann *et al.* 2000) bzw. Genorthologe (*PTAG2*, *P. trichocarpa*-Ortholog von *AGAMOUS*; Brunner *et al.* 2000) wurden ebenso wie das Activation-Tagging (Busov *et al.* 2003) zur Gencharakterisierung genutzt. Ein besonderes Interesse hat die forstliche Genomforschung an den Holzeigenschaften und der Holzbildung, insbesondere der Lignin-Biosynthese. Durch Überexpression und Suppression von Genen, die Enzyme der Monolignol-Biosynthese exprimieren, wurden Versuche durchgeführt, den Ligningehalt bzw. die Ligninzusammensetzung so zu verändern, dass z.B. die Ligninentfernung bei der Papierherstellung erleichtert wird (Baucher *et al.* 1998, Franke *et al.* 2000, Chen *et al.* 2001).

Das Abschalten (Knockout) von Genen, das in den Versuchsorganismen zu morphologisch oder physiologisch detektierbaren Veränderungen führen kann, stellt einen weiteren gängigen Ansatz dar, die Funktion eines Gens anhand dieser Fehlfunktion abzuleiten. Dazu werden T-DNAs ebenso wie bewegliche genetische Elemente (transponierende Elemente, Transposons) in großem Maßstab als Werkzeuge in der Genomanalyse vieler Pflanzenarten

eingesetzt (zusammengefasst in Walbot 1992, Lönneborg und Jansson 1993, Osborne und Baker 1995, Maes *et al.* 1999).

Beim Transposon-Tagging wird die spezifische Eigenschaft transponierender Elemente, aus einem DNA-Locus herausgeschnitten und in einen anderen Locus eingebaut zu werden, genutzt. In einer Pflanze, die aktive transponierende Elemente im Genom trägt, kann ein Allel auf diese Weise funktionsunfähig werden, wenn ein Transposon z.B. in ein Exon eines Gens inseriert. Durch eine Selbstung, die in einigen Nachkommen zum homozygoten Zustand des defekten Allels führt, wird dann möglicherweise ein veränderter Phänotyp hervorgebracht, was als Insertionsmutation oder Knockout-Mutation bezeichnet wird. In manchen Pflanzenarten wie z.B. Kartoffel, Tabak und Pappel wurden bisher keine oder nur unzureichend bewegliche genetische Elemente gefunden. Um das Transposon-Tagging auch in diesen Pflanzenarten nutzen zu können, wurde geprüft, ob Transposone z.B. aus Mais in anderen Pflanzen funktionieren (Belzile und Yoder 1992, Chuck *et al.* 1993, James *et al.* 1995, Lawrence *et al.* 1995, Greco *et al.* 2001, Scholz *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Transposons nicht nur gentechnisch übertragen werden können, sondern dass sie auch in den heterologen Pflanzenarten transponieren.

So wurden bereits mit Transposons aus Mais in heterologen Pflanzen erfolgreich Gene identifiziert und charakterisiert (Osborne und Baker 1995, Martienssen 1998). Verschiedene Strategien, die den Zeitpunkt und die Frequenz der Transposition kontrollieren, die Exzision und Re-Insertion überwachen und die möglichst flächendeckend Insertionsmutanten erzeugen, wurden von Sundaresan (1996) beschrieben. Weiter entwickelte Methoden wie das Gene-Trapping, das eine Insertion eines Transposons in ein Gen aufzeigt und die Selektion von Insertionsmutanten ermöglicht, wurde von Maes *et al.* (1999) beschrieben.

Viele auch wirtschaftlich relevante Arten der Gattung *Populus* gelten als leicht transformierbar und regenerierbar. Parsons *et al.* (1986) berichteten erstmals von einer reproduzierbaren Transformation in *Populus*. Sie setzten hierfür zwei Wildtypstämme von *A. tumefaciens* als Transformationsvektoren ein. Fillatti *et al.* (1987) regenerierten die ersten transgenen Pappeln (*P. alba* × *P. grandidentata*), denen mittels *A. tumefaciens* ein definiertes Gen inkorporiert wurde. Diese Pflanzen exprimierten das *aroA*-Gen, das eine Herbizidresistenz vermittelt. Weitere erfolgreiche Transformationen folgten bei vielen Pappelarten und -hybriden (aufgelistet in Confalonieri *et al.* 2003).

Im gleichen Jahr, in dem von der ersten Transformation bei Pappeln berichtet wurde, erklärten Baker *et al.* (1986), dass die Transposition des *Activator*-Elementes (*Ac*) aus Mais

in Tabak nachgewiesen wurde. Es war die erste Darstellung einer Transposition eines pflanzlichen Transposons in einer Wirtspflanze. Fünf Jahre später beschrieben Howe *et al.* (1991), dass *Ac* in Pappeln integrierbar ist und bald darauf, dass *Ac* aus dem ursprünglichen Ort in der T-DNA herausgeschnitten werden kann (Howe *et al.* 1994). Die Re-Integration von *Ac* ins Pappelgenom wurde von Fladung (1999) durch Southern-Analysen nachgewiesen. Er verwendete hierzu eine Doppelhybridisierung, d.h. die Southern-Blots, die bereits nach einer Hybridisierung mit einer *roIC* markierten Sonde eine Exzision des *Ac*-Elementes erkennen ließen, wurden anschließend mit *Ac* markierten Sonden rehybridisiert.

Voraussetzung eines erfolgreichen Transposon-Tagging ist, dass die Funktion eines getroffenen Allels nicht durch das andere Allel (bei Diploiden) oder verwandte Gene ersetzt werden darf, damit eine mögliche durch den Knockout verursachte phänotypische Variation ersichtlich wird. Während der Funktionsersatz durch verwandte Gene oder Genduplikationen nicht beeinflusst werden kann, gewährleistet ein homozygoter Zustand des getroffenen Gens, dass das andere Allel nicht exprimiert wird. Dies wird im Normalfall mittels Selbstung erreicht; im Fall von *Populus* kann jedoch keine Selbstung durchgeführt werden, weil Pappeln diözisch sind.

Ein Ausweg aus diesem Problem besteht in der Haploidisierung der Pappel. Wenn das zu transformierende Pflanzenmaterial haploid ist, d.h. nur über einen einfachen Chromosomensatz und folglich auch nur über ein Allel je Genort verfügt, reicht es aus, dieses eine Allel funktionsunfähig zu machen, um eine mögliche Insertionsmutation zu erzeugen. Pappeln sind diploid ($2n = 2x$) und besitzen 38 Chromosomen (Gallego Martin *et al.* 1987).

1.4. Erzeugung haploider Pappeln

Haploide Angiospermen bestehen aus Körperzellen, die die gametophytische Chromosomenzahl, also die halbe Chromosomenzahl der Sporophyten haben. Sie stellen einen Abbruch in der generativen Pflanzenentwicklung dar, in welcher gametophytische und sporophytische Generationen alternieren. Monohaploide Pflanzen, aus den Gametophyten diploider Sporophyten hervorgehend und allgemein als Haploide bezeichnet, sind meist weniger vital als Diploide ihrer Art und können keine Reduktionsteilung mehr durchlaufen, entsprechen aber sonst normalen Pflanzen. Im Jahre 1922 berichteten Blakeslee *et al.* erstmals von einer haploiden Gefäßpflanze, einem haploiden Stechapfel (*Datura stramonium*). Von da an wurden Haploide in vielen Pflanzenarten gefunden. Der erste und

bisher einzige Fund einer natürlich gewachsenen haploiden Pappel wurde von Tralau (1957) beschrieben.

Seit der Entdeckung der Generierung haploider Pflanzen durch die Antherenkultur (Guha und Maheshwari 1964) wurden Haploide gezielt erzeugt, um aus ihnen durch nachfolgende Verdoppelung des Chromosomensatzes doppelhaploide Pflanzen zu erhalten. Diese rein homozygoten Linien wurden erfolgreich in vielen Züchtungsprogrammen von Kulturpflanzen eingesetzt (Jähne und Lörz 1995, Maluszynski *et al.* 2002). Doppelhaploide wurden ebenfalls für Zwecke der genetischen Kartierung, z.B. bei Raps (Cloutier *et al.* 1995) und bei Gerste (Toojinda *et al.* 2000), wie auch für transgene Expressionsstudien bei Tabak verwendet (Beaujean *et al.* 1998).

Neben der Erzeugung haploider Pflanzen aus den unreifen männlichen Mikrogametophyten wurden Haploide auch mittels Fruchtknoten- oder Samenanlagekultur aus den unreifen weiblichen Makrogametophyten (Gynogenese) produziert (Keller und Korzun 1996). Die Gynogenese hat aber den Nachteil, dass aus rein praktischen Gründen nur eine begrenzte Zahl an Gametophyten isoliert und getestet werden kann. Hingegen erlaubt eine Androgenese die Kultur einer unzählig großen Population genetisch unterschiedlicher Zellen. Deshalb beschränkte sich diese Arbeit auf eine Regeneration aus dem unreifen männlichen Gametophyten, d.h. auf eine Pollenembryogenese. Zum besseren Verständnis der Pollenembryogenese folgt ein Überblick über die Pollenreifung.

1.4.1. Pollenreifung

Einen allgemeinen Überblick über die Pollenentwicklung geben Bedinger (1992) und Reynolds (1997): In Angiospermen werden die Organe, die die männlichen Sporen, die Mikrosporen, bilden, Antheren genannt. Vier Antherenwandschichten (Epidermis, Endothecium, Mittelschicht, Tapetum) umgeben den mit Flüssigkeit gefüllten Loculus, in welchem die Pollenmutterzellen (Mikrosporozyten) aus einem sporogenem Gewebe gebildet werden.

Abb. 1 fasst die dann folgende Pollenreifung (hier bei Mais) zusammen. Eingebettet in Kallose (β -1,3-Glucan), durchlaufen die Pollenmutterzellen (Abb. 1A) die Meiose und produzieren Tetraden von Mikrosporen, welche noch von der Kallose umgeben sind (Abb. 1B). Die Kallose wird enzymatisch abgebaut, um vier einzelne Mikrosporen zu entlassen, die in wenigen Tagen schnell wachsen und ihre äußere Zellwand (Exine) synthetisieren (Abb. 1C). Während des weiteren Wachstums wandert der Zellkern zur Zellperipherie und mehrere

kleine Vakuolen verschmelzen zu einer großen (Abb. 1D,E). Die Mikrospore teilt sich asymmetrisch in eine kleine generative Zelle und eine große vegetative Zelle (Pollenmitose I). Die generative ist von der vegetativen Zelle vollkommen umschlossen (Abb. 1F). Anschließend wird die innere Zellwand (Intine) gebildet und Stärke angereichert (Abb. 1G). Die hier dargestellte Teilung der generativen Zelle in die beiden Spermazellen (Pollenmitose II) findet bei der Pappel, wie bei den meisten Dikotyledonen, erst nach der Pollenkeimung im Pollenschlauch statt (Rougier *et al.* 1991). Der Pollen schließt die Stärkeakkumulation ab (Abb. 1H), das Tapetum löst sich auf, die locale Flüssigkeit verschwindet und der Pollen dehydriert, um von der Anthere als bizelluläres reifes Pollenkorn entlassen zu werden (Pacini 2000).

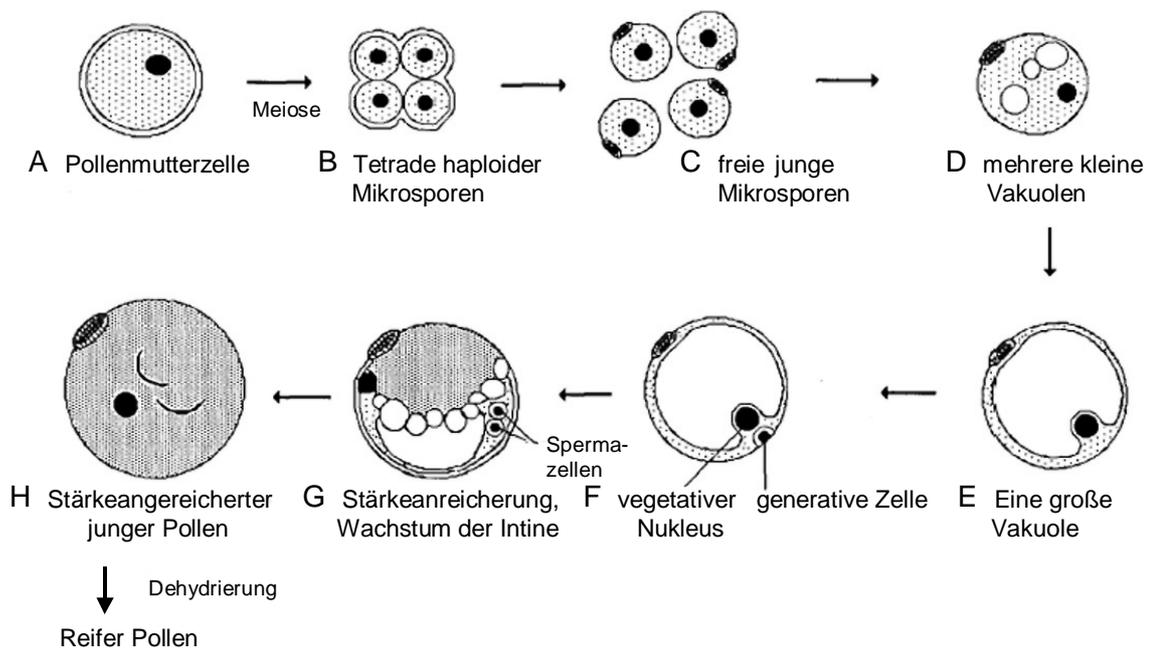


Abb. 1: Schematische Pollenreifung bei Mais (aus Bedinger 1992). Beschreibung im Text. Zu beachten ist, dass hier bereits die Teilung der generativen Zelle während der Pollenreifung erfolgt (E). Beim Pappelpollen geschieht dies erst im wachsenden Pollenschlauch, also nach der Pollenreifung.

Wenig ist über die Struktur und die Entwicklung des Pappelpollen bekannt. Zwar wurde der binukleare Status des reifen Pollen schon 1952 (Nagaraj) festgestellt, auch wurde die Pollenwandchemie in Verbindung mit Pollen-Stigma-Interaktionen hinsichtlich einer Inkompatibilität zwischen verschiedenen Pappelarten näher beleuchtet (Knox *et al.* 1972, Ashford und Knox 1980, Villar *et al.* 1993) und die Assoziation von dem vegetativen Zellkern mit der generativen Zelle (male germ unit, MGU) im reifen Pollen (Sun *et al.* 1988) und während des Pollenschlauchwachstums (Rougier *et al.* 1991) untersucht. Jüngstens wurden

sogar Konzentrationen von Östradiol (steriodales Östrogen) an Pappelblüten während der Pollenreifung gemessen und in Verbindung mit der Sexdetermination gebracht (Khallel *et al.* 2003). Aber weder wurde bisher die normale Pollenreifung, von der Pollenmutterzelle bis zum reifen Pollenkorn, noch die androgenetische Entwicklung eines unreifen Pollens für die Gattung *Populus* bzw. generell für Baumarten beschrieben.

1.4.2. Pollenembryogenese

Die normale Reifung eines Pollen kann unter bestimmten Umständen abbrechen und in ein androgenetisches Wachstum übergehen, das als Mikrosporen- oder Pollenembryogenese bezeichnet wird. Sie wurde mittels Licht- und Elektronenmikroskopie untersucht und für einige Arten detailliert beschrieben, z.B. bei Tabak (Sunderland und Wicks 1973), bei Mais (Barnabas *et al.* 1987), bei Weizen (Reynolds 1993), bei Gerste Kumlehn und Lörz (1999). Für Baumarten liegen keine Beschreibungen vor.

Welche der zahlreichen physiologischen Faktoren, die einen Einfluss auf eine Androgenese haben können, wie Alter und Wuchsbedingungen des Donorbaumes, Behandlungen der Antheren oder Mikrosporen, Mediumzusammensetzung und -konsistenz, Temperatur, Licht, Populationsdichte der unreifen Pollen oder Antheren und Präsenz somatischen Gewebes bedeutsam sind, ist für jede Pflanzenart verschieden und kann nicht verallgemeinert werden. Dennoch gibt es zwei konsistente Eigenschaften, die generell für eine androgenetische Induktion nötig sind (Reynolds 1997):

- Ein definiertes Stadium in der Pollenentwicklung
- Ein äußerer Stimulus

Zur ersten Eigenschaft zeigte sich in den meisten untersuchten Embryogenesen angiospermer Pflanzenarten, dass die Periode um die erste Pollenmitose herum (späte uninukleare bis frühe binukleare) das entscheidende Stadium für eine androgenetische Induktion war (Rhagavan 1986).

Zum weitaus größten Teil basieren die Berichte über die Erzeugung haploider Pappeln auf Antherenkulturen. In diesen Antherenkulturen wurden die Antheren aufgelegt, wenn in ihnen freie (Zhu *et al.* 1980, Ho and Raj 1985, Kexian und Nagarajan 1990, Stoehr und Zsuffa 1990a, Baldursson *et al.* 1993) bzw. in Tetraden vorliegende (Mofidabadi *et al.* 1995, Kiss *et al.* 2001) Mikrosporen enthalten waren. Es ist bei *Populus* noch nicht hinreichend untersucht,

in welchem Stadium der Wechsel vom gametophytischen zum androgenetischen Wachstum stattfindet.

Bezüglich des äußeren Stimulus wurden allerlei Faktoren verwendet, um einem unreifen Pollen den nötigen Impuls zur Kallus- und Embryobildung zu geben. Reynolds (1997) fasste zusammen, dass Temperatur, sowohl Wärme als auch Kälte, der meist verbreitete externe Stimulus für die Pollenembryogenese war (z.B. Kunz *et al.* 2000, Dias 2001, Sato *et al.* 2002). Ebenso hat „Hunger“ (eine geringe Versorgung mit Kohlenhydraten und Stickstoff) Bedeutung erlangt (Touraev *et al.* 1996a, Höfer *et al.* 1999, Hu und Kasha 1999, Indrianto *et al.* 1999). Daneben kamen auch Gamma-Strahlung und Ethanol (Pechan und Keller 1989) und Chemikalien (Eady *et al.* 1995, Zheng *et al.* 2001) zum Einsatz. Für alle Antheren- und Pollenkulturen sollte auf jeden Fall die *In-vitro*-Überführung für sich als ein starker Stress angesehen werden (Reynolds 1997). Die Isolation der Antheren bzw. des Pollen von der Blütenknospe kann bereits ein Stimulus sein.

Im Gegensatz zur Antherenkultur ist die Pollenkultur nicht nur eine wichtige Technik in der Kulturpflanzenzüchtung, sondern auch in der Grundlagenforschung. Sie ermöglicht eine Beobachtung der gametophytischen und androgenetischen Entwicklung von Pollen (Kumlehn and Lörz 1999, Custers *et al.* 2000). Ferner ist es vorteilhaft, dass in einer Pollenkultur eine erste Zellteilung beobachtet und somit frühzeitig in einem Genotypentest auf Responsivität hin untersucht werden kann. Kulturbedingungen wie Nährstoffe, Wachstumsregulatoren und pH-Wert des Mediums haben eine direkte Wirkung auf die isolierten unreifen Pollenzellen und auch ein Transformationsansatz innerhalb der Pollenkultur hat einen direkten Zugang ohne Beeinflussung eines umgebenden Gewebes. Außerdem wird die Gefahr einer Regeneration aus Antherengewebe wie sie für *Populus* berichtet wurde (Stoehr and Zsuffa 1990b, Wu and Nagarajan 1990) reduziert.

Teilweise ersetzte die Pollenkultur aufgrund ihrer höheren Produktivität die Antherenkultur zur Produktion haploider und doppelhaploider Pflanzen. Vergleichende Studien bei *Brassica napus* (Siebel and Pauls 1989), *Hordeum vulgare* (Hoekstra *et al.* 1992, Davies and Morton 1998) und *Triticum aestivum* (Holme *et al.* 1999) ergaben, dass Pollenkulturen (Mikrosporenkulturen) vier- bis zehnmals mehr Embryonen erzeugen als Antherenkulturen. Zudem erwies sich die Kultur isolierter Pollen bei Gerste auch weniger genotypenabhängig als die Antherenkultur (pers. Mitteilung, Kumlehn 2003). Über Pollenkulturen mit Pappelpollen liegen bisher keine Studien vor. Überhaupt ist die Pollenkultur bei Bäumen kaum eingesetzt worden. Radojevic *et al.* (1999) berichteten von einem Ansatz zur

Pollenkultur bei der Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum* L.) und Höfer *et al.* (1999) erhielten zwei diploide Pflanzen aus einer Pollenkultur beim Apfel (*Malus domestica* Borkh.).

1.4.3. Die haploide Pappelforschung

Vor fünfzig Jahren berichtete Tulecke (1953) von haploidem Gewebe, das sich aus isolierten keimenden Pollenzellen vom Fächerblattbaum (*Ginkgo biloba* L.) formte. Eine weiterführende Regeneration wurde dabei jedoch nicht erzielt. Weitere Versuche, isolierten Pollen verschiedener Baumarten zu kultivieren, waren nicht erfolgreich oder kamen nicht über das Kallus-/Embryonalstadium hinaus (zusammengenommen in Winton and Stettler 1974, Laurain *et al.* 1993).

In der Pappelforschung waren Fremdbestäubung und Bestäubung mit hitzebehandelten Pollen die ersten Experimente, die haploide oder doppelhaploide Pappeln hervorbrachten (Kopecky 1960, Winton and Einspahr 1968). Die erfolgreiche Produktion in krautigen Pflanzen (Nitzsche and Wenzel 1977) führte in den 1970er und 1980er Jahren zu intensivierten Studien an der Generierung haploider Forstbäume mit Hilfe unterschiedlicher Methoden wie der Bestäubung mit bestrahltem Pollen (Stettler und Bawa 1971), der Behandlung mit Toluidinblau nach der Bestäubung (Parthenogenese, Illies 1974), der Antherenkultur (Wang *et al.* 1975) und der Fruchtknotenkultur (Wu und Xu 1984) (s. auch Zusammenfassungen: Chen 1987, Baldursson and Ahuja 1996b). Die Antherenkultur war die meist verwendete Methode, um haploide Pflanzen zu produzieren, und *Populus*-Arten und ihre Hybriden (Zhu *et al.* 1980, Ho and Raj 1985, Stoehr and Zsuffa 1990a, Mofidabadi *et al.* 1995) waren neben *Hevea* (Chen *et al.* 1982) und *Aesculus* (Radojevic *et al.* 1989) diejenigen, deren Pollen die Fähigkeit zur fortlaufenden Zellteilung zeigten.

Fasst man alle Veröffentlichungen zur Produktion von Hapliden bei Forstgehölzen zusammen, sind die Ergebnisse verglichen mit denen von krautigen Kulturpflanzen enttäuschend und vernachlässigbar (Baldursson and Ahuja 1996b). Geringe Lebensfähigkeit und frühe spontane Chromosomenverdoppelung wurden als Gründe für den Mangel an stabil haploiden Pappeln angesehen (Wu and Nagarajan 1990, Baldursson and Ahuja 1996a, Kiss *et al.* 2001, Kiss 2002 pers. Mitteilung). Meines Wissens sind weltweit keine haploiden Pappeln verfügbar. Folglich war es notwendig, haploide Pappeln für einen Transposon-Tagging-Ansatz selbst zu erzeugen. Zusätzlich sollten nach einer erfolgreichen Generierung Haploider die Bedingungen für eine längerfristige Aufrechterhaltung des haploiden Statuses studiert werden.

1.5. Aufgabenstellung

Folgende Kriterien wurden an das zu erzeugende haploide Pflanzenmaterial angelegt, um es für anschließende Transformationen zu verwenden:

- Frühzeitige Verfügbarkeit der Kallusse für eine Ploidieanalyse, um haploides Gewebe vor einer eventuellen Diploidisierung identifizieren zu können
- Gewährleistung der Transformierbarkeit und Regenerationsfähigkeit haploider Kallusse
- Aufrechterhaltung der haploiden Stufe regenerierbarer Kalluslinien für eine langfristige *in vitro*-Kultur

Eine Kultur isolierter unreifer Pollen erlaubt die Generierung unabhängiger Kalluslinien und deren Ploidieanalyse. Ebenso ist eine Transformation dieser Kallusse grundsätzlich möglich. Somit erfüllt die Pollenkultur die ersten beiden Kriterien im Gegensatz zu einer Antherenkultur, welche die Isolation eines Genotypen und die Ploidieanalyse i.d.R. erst im Stadium der Ausdifferenzierung, d.h. der Sprossbildung, zulässt. Die Herausbildung von kallösem Gewebe in einer Anthere kann nicht eindeutig einem gametophytischen oder somatischen Ursprung zugeordnet werden. Neben den bereits unter 1.4.2. erwähnten Vorteilen der Pollenkultur war dieses Argument ausschlaggebend, eine Pollenkultur zur Erzeugung haploiden Pflanzenmaterials zu benutzen.

Mit der hier vorgelegten Arbeit sollte ein *in vitro*-Regenerationssystem aus isolierten unreifen Pollen der Pappel etabliert werden. Ferner sollten während der Entwicklung des Protokolls folgende Gesichtspunkte, die einen Einfluss auf die Kultur haben könnten, untersucht werden:

- Test mehrerer Genotypen auf deren Responsivität
- Verwendung eines Induktionsmediums mit zwei verschiedenen Zusätzen an Wachstumsregulatoren; einmal nur mit einem Cytokinin (BAP), das andere Mal mit einem Cytokinin und einem Auxin (NAA)
- Einfluss der Kaltlagerung der Kätzchen, der Zellvitalitätsrate und der Populationsdichte
- Evaluierung verschiedener Initialbehandlungen zur Induktion der androgenetischen Entwicklung von unreifen Pollen

Zusätzlich sollte von aus der Pollenkultur hervorgegangenen Kallussen die Ploidie mittels Durchflusscytometrie bestimmt und der haploide Ursprung diploider und polyploider Kallusse anhand von Mikrosatelliten-Markern überprüft werden.

Schließlich sollte die Transformierbarkeit regenerativer Kallusse unter Verwendung eines 35S-*Ac-roIC* Konstruktes geprüft werden. Dieses *Ac*-Transposon-System wurde im Tabak entwickelt (Spena *et al.* 1989). Das zwischen dem 35S-Promotor und *roIC*-Gen liegende *Ac*-Transposon verhindert eine *roIC*-Expression. Eine Exzision des Transposons stellt eine *roIC*-Aktivität her. Geschieht dies während der Blattentwicklung bilden sich scharf abgegrenzte *roIC*-spezifische Sektoren, die sich hellgrün vom sonst dunkelgrünen Blatt aufgrund einer reduzierten Chlorophyll-Pigmentierung hervorheben (Spena *et al.* 1989, Fladung *et al.* 1997). Hellgrüne Sektoren im Blatt markieren also putative Transpositions-Ereignisse.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Verschiedene Genotypen wurden hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in einer Zellkultur überprüft. Untersuchungen sowohl zur Sterilisierbarkeit der Kätzchen als auch zur Induktion erster mitotischer Teilungen in unreifen Pollen wurden mit den in Tab. 1 aufgeführten männlichen Bäumen der Gattung *Populus* durchgeführt:

Tab. 1: In Voruntersuchungen getestete Bäume

Genotyp	Ort	Species
Aue 1 Aue 2 Vorderdeich	Bünningstedt (Ammersbek) / Schleswig-Holstein Bünningstedt (Ammersbek) / Schleswig-Holstein Hamburg	<i>P. nigra</i> L. Hybride (Sektion <i>Aigeiros</i>)
SU 115	Inst. f. Forstgenetik u. Forstpflanzenzüchtung, Großhansdorf	<i>P. tremula</i> L. (Sektion <i>Populus</i>)
Esch 14	Inst. f. Forstgenetik u. Forstpflanzenzüchtung, Großhansdorf	<i>P. tremula</i> L. × <i>tremuloides</i> Michaux (Sektion <i>Populus</i>)
Balsampappel	Waldsieversdorf / Brandenburg	<i>P. sp.</i> (Sektion <i>Tacamahaca</i>)

Die Genotypen SU 115 und Esch 14 stehen im Arboretum des Institutes für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung in Großhansdorf bei Hamburg. Die weiteren ausgewählten Bäume stehen an Straßen oder im freien Gelände. Alle Bäume waren ca. 20 bis 30 m hoch und Blütenzweige wurden am 18.12.2000 für Untersuchungen zur Gewebekulturtauglichkeit beerntet. Die späteren Ernten an den Bäumen 'Aue 1' und 'Aue 2' erfolgten am 01.03.2001, 18.12.2001 und 01.02.2002. Die Blütenzweige wurden entweder unter zu Hilfenahme einer Leiter geschnitten oder mit einem per Katapult über die Äste geschossenen Seil abgebrochen. Die Blütenzweige wurden mit ihren Schnittenden in Wasser bei einer Temperatur von 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2. Chemikalien

Zur Medienherstellung wurden Chemikalien von folgenden Firmen verwendet: Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim). Die

Grundmedien MS (Murashige und Skoog 1962) und Woody Plant Medium (WPM, Lloyd and McCown 1981) wurden als Fertigpulver (Duchefa, Haarlem, NL) eingesetzt. Wachstumsregulatoren und Antibiotika wurden von Duchefa (Haarlem, NL) geliefert. Als Mediumverfestigungsmittel wurden Agar Agar von Serva (Heidelberg) und Phytigel von Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) genutzt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien für die molekularbiologischen Analysen von nachstehenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg), Fluka (Buchs, CH), Gerbu (Gaiberg), Gibco BRL (Paisley, GB), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seetze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim). Die Agarose stammte von Peqlab (Erlangen).

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammen von Roche Diagnostics (Mannheim).

2.3. Kulturmedien

Induktionsmedien:

Zur Induktion der Embryogenese bzw. Kallusentwicklung aus isolierten unreifen Pollenzellen wurde als Basalmedium das Flüssigmedium K99 (Kumlehn, unveröffentlicht, Tab. 2) verwendet. In den Eignungsuntersuchungen traten teilweise Kontaminationen durch Bakterien auf. Um eventuell erneut auftretende Bakterienkontaminationen zu verringern, wurden die Antibiotika Cefotaxime und Amoxicillin zugesetzt.

Im Jahre 2001: K99-4B-CAx; K99 mit $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP, $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Cefotaxime und $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Amoxicillin, pH 5,8.

Im Jahre 2002: K99-N4B-CAx K99 mit $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP, $0,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA, $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Cefotaxime und $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Amoxicillin, pH 5,8.

„Hungermedium“:

Das Flüssigmedium enthielt 0,4 M Maltose, 10 mM MES, 1 mM CaCl_2 , Mikroelemente WPM und wurde auf pH 5,8 eingestellt (modifiziert nach Kumlehn *et al.* 1999). Auch hier wurden die Antibiotika Cefotaxime und Amoxicillin zu je $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ zugesetzt.

Regenerationsmedien:

Zur Pflanzenregeneration wurden WPM und MS-Medium als Fertigpulver (Duchefa, Haarlem, Niederlande) mit 0,6% Agar und unterschiedlichem Gehalt an Wachstumsregulatoren bei pH 5,8 eingesetzt (siehe Tab. 3).

Tab. 2: Zusammensetzung des Basalmediums K99 für die Induktion und der Basalmedien WPM und MS für die weiterführende Regeneration.

Komponenten [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	K99	WPM	MS
<i><u>Makroelemente</u></i>			
NH_4NO_3	80 (1 mM)	400 (5 mM)	1650 (20,1 mM)
KNO_3	2022 (20 mM)	/	1900 (18,8 mM)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	/	471 (2,35 mM)	/
K_2SO_4	/	990 (5,68 mM)	/
KH_2PO_4	340 (2,5 mM)	170 (1,25 mM)	170 (1,25 mM)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	441 (3 mM)	95,7 (0,65 mM)	441 (3 mM)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246 (1 mM)	370,1 (1,5 mM)	370,1 (1,5 mM)
NaFeEDTA	27,5 (75 μM)	36,7 (100 μM)	36,7 (100 μM)
<i><u>Mikroelemente</u></i>			
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	11,2 (50 μM)	22,3 (130 μM)	16,9 (100 μM)
H_3BO_3	3,1 (50 μM)	6,2 (100 μM)	6,2 (100 μM)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,2 (25 μM)	8,6 (29,9 μM)	8,6 (29,9 μM)
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,12 (0,5 μM)	0,25 (1 μM)	0,25 (1 μM)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 (0,1 μM)	0,25 (1 μM)	0,025 (0,1 μM)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,024 (0,1 μM)	/	0,025 (0,1 μM)
KI	0,17 (1 μM)	/	0,83 (5 μM)
<i><u>Organika</u></i>			
Retinol	0,01 (0,04 μM)	/	/
Thiamin·HCl	1,0 (3 μM)	/	/
Nicotinsäure	1,0 (8,1 μM)	1 (3 μM)	0,1 (0,3 μM)
Riboflavin	0,2 (0,5 μM)	0,5 (4,1 μM)	0,5 (4,1 μM)
Ca-Pantothenat	1,0 (4,2 μM)	/	/
Folsäure	0,4 (0,9 μM)	/	/
Pyridoxin·HCl	1,0 (4,9 μM)	/	/
Cobalamin	0,02 ()	0,5 (2,4 μM)	0,5 (2,4 μM)
Ascorbinsäure	2,0 (11,4 μM)	/	/
Calciferol	0,01 (0,03 μM)	/	/
Biotin	0,01 (0,04 μM)	/	/
Cholinchlorid	1,0 (7,1 μM)	/	/
p-Aminobenzoessäure	0,02 (0,1 μM)	/	/
Glycin	/	/	/
myo-Inositol	100 (560 μM)	2 (26,6 μM)	2 (26,6 μM)
		100 (560 μM)	100 (560 μM)
Apfelsäure	40 (0,3 μM)		
Zitronensäure	40 (0,1 μM)		
Fumarsäure	40 (0,3 μM)		
Natrium-Pyruvat	20 (0,2 μM)		
Glutamin	1,023 (7 mM)		
Maltose·H ₂ O	90 000 (250mM)		

Tab. 3: Zusammensetzung der Medien für die Regeneration aus Kallussen (pH 5,8).

	WPM	WPM 368	WPM 367	WPM 368-Malt	½ MS 368
Grundmedium	WPM	WPM	WPM	WPM	0,5 MS
BAP	/	1 mg·l ⁻¹	0,5 mg·l ⁻¹	1 mg·l ⁻¹	1 mg·l ⁻¹
NAA	/	0,02 mg·l ⁻¹	0,02 mg·l ⁻¹	0,02 mg·l ⁻¹	0,02 mg·l ⁻¹
Maltose-H ₂ O	/	/	/	4 g·l ⁻¹	/
Saccharose	20 g·l ⁻¹	20 g·l ⁻¹	20 g·l ⁻¹	/	20 g·l ⁻¹

2.4. Pollenkultur

2.4.1. Auswahl und Sterilisation der Kätzchen

An Zweigen stehende Blütenknospen wurden in einer Klimakammer bei 22°C und täglich 16 h Licht zum Austreiben angeregt (Abb. 2). Der Pollen der Kätzchen wurde auf sein Entwicklungsstadium hin mit einem Durchlichtmikroskop BH-2 (Olympus, Tokyo, Japan) untersucht. Die Blütenkätzchen wurden geerntet, wenn das Tetradenstadium des Pollens weitgehend durchlaufen war und einzellige Mikrosporen vorlagen. Zu dem Zeitpunkt war ein Kätzchen nahezu doppelt so lang wie seine Hüllblätter (Abb. 2C). Jeweils ein bis drei Kätzchen wurden in einer Petrischale (Greiner, Frickenhausen) auf befeuchtetes Filterpapier gelegt, die Petrischale mit Parafilm (American National Can, USA) versiegelt und bei 2°C im Dunkeln gelagert. Einen Tag vor der Isolation der unreifen Pollenkörner wurden die Kätzchen für 10 min in 5%-igem Natriumhypochlorit (12% Chlorgehalt) und einem Tropfen Tween 80 (Sigma, St. Louis, USA) oberflächensterilisiert, zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und weiter bei 2°C im Dunkeln gelagert.

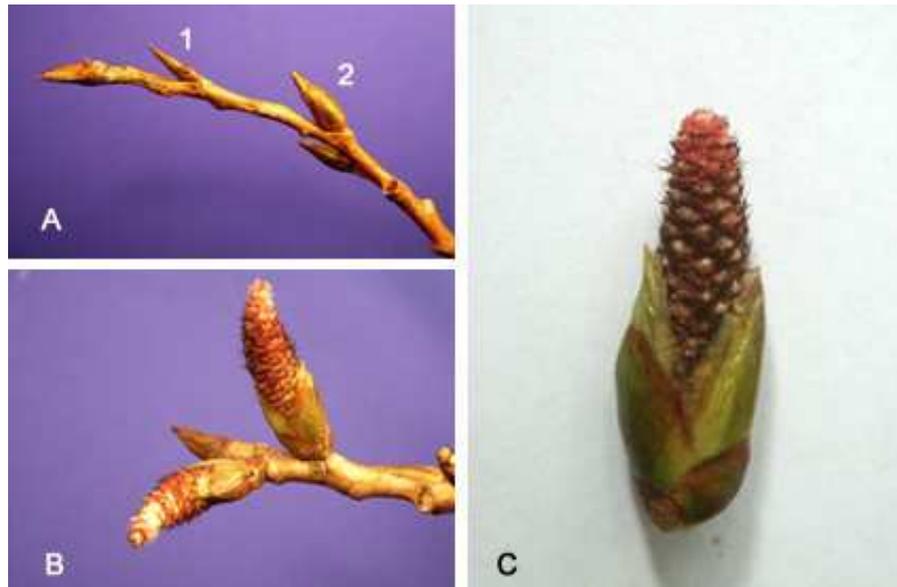


Abb. 2: **A** Blattknospe (1) und Blütenknospe (2) am Zweig. **B** Austreibende Blütenknospen. **C** Geerntetes unreifes Kätzchen.

2.4.2. Isolation unreifer Pollenzellen

Die Isolierungsschritte wurden mit gekühlten Geräten (4°C) und gekühlten, auf Eis gelagerten Medien durchgeführt. Die sterilisierten unreifen Kätzchen wurden von ihren Hüllblättern befreit, geviertelt und mittels eines Homogenisators (Waring Micro Blendor, Eberbach, Ann Arbor, USA), in 0,4 M Mannitol zweimal je 5 sec mit geringer Geschwindigkeit (Einstellung ‚low‘) zerkleinert. Der Inhalt des Homogenisators wurde durch ein 100 µm-Sieb (Wilson, Nottingham, UK) gegossen, um die Pollen von den Geweberesten des Blütenkätzchens zu trennen.

Das weitere Vorgehen verlief in den beiden Kulturjahren unterschiedlich:

Im Jahr 2001 wurde die gewonnene Pollen-Mannitol-Suspension in zwei 50 ml Röhrchen durch zweimaliges Zentrifugieren (10 min bei 110 g und 4°C) gereinigt. Eine Trennung der vitalen von den toten Pollenzellen wurde mittels einer Dichtegradientenzentrifugation getestet. Nach der zweimaligen Waschstufe wurde das Pellet in 2 ml Mannitol resuspendiert. Die Suspension wurde entweder auf eine 4 ml 19% (w/v) Maltose-H₂O-Lösung oder auf eine Percoll-Lösung (20, 40 und 60% Percoll in Induktionsmedium) pipettiert und bei 100 g zentrifugiert. Sowohl akkumulierte Pollen aus den Grenzschichten als auch innerhalb der einzelnen Schichten wurden heraus pipettiert, erneut gewaschen und mikroskopiert. Zur Überprüfung der Vitalität wurden 100 µl Suspension unreifen Pollens mit einer Fluorescein-diacetat-Lösung (0,5 mg FDA /ml Aceton) (Widholm 1972) an einem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus BH-2, Tokyo, Japan) überprüft.

Im Jahre 2002 wurde die Waschstufe verkürzt und vereinfacht: Auf die Isolation unreifer Pollenzellen folgte anstatt der zweimaligen Zentrifugation eine Siebwaschung. Die in Mannitol suspendierten unreifen Pollen wurden zuerst durch ein 100 µm-Sieb gegossen, anschließend auf einem 15 µm-Sieb mit Mannitol gewaschen und in eine Petrischale (94 x 15 mm) gespült. Diese Suspension wurde zentrifugiert und das Pellet in 40 ml Hungermedium bzw. Induktionsmedium K99-N4B-CAx resuspendiert und in Petrischalen (60 x 15 mm) kultiviert.

Zur Ermittlung der Zelldichte und der Vitalitätsrate wurde die Anzahl der Zellen mit einem Hämocytometer (Schreck, Hofheim) bestimmt. In acht Großquadraten mit einem Volumen von jeweils 10^{-4} ml wurden die vitalen und toten Zellen gezählt und der Mittelwert gebildet.

2.4.3. Kultur unreifer Pollenzellen

In den Eignungsuntersuchungen wurde eine Hälfte der unreifen Pollenzellenpopulation direkt in das Induktionsmedium K99-4B-CAx und die andere Hälfte für 6 Tage in das Hungermedium mit anschließendem Transfer ins Induktionsmedium überführt. Hierbei wurden in den Populationen, die mit Hungermedium behandelt worden waren, mehr Kallusbildungen gefunden als in den Populationen ohne diese Hungerbehandlung. Daraufhin wurden die Versuche im Jahre 2001 mit dieser sechstägigen Hungerbehandlung durchgeführt. Die nach der Waschung erhaltenen Pellets wurden in 40 ml Hungermedium resuspendiert und je 2 ml in 35 x 10 mm Petri-Schalen für 6 bzw. 10 Tage bei 20°C dunkel gelagert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der unreife Pollen im Induktionsmedium K99-4B-CAx resuspendiert (35 x 10 mm Petri-Schalen) und für vier bis acht Wochen bei 26°C im Dunkeln inkubiert.

Im Jahre 2002 wurde das Induktionsmedium zusätzlich mit einem Auxin (0,2 mg/ml NAA) angereichert (K99-N4B-CAx). Des weiteren wurde mit Populationen unreifen Pollens von 20 Kätzchen (10 Kätzchen je Donorpflanze) ein Vergleich verschiedener Initialbehandlungen bezüglich der Ausbeute durchgeführt. Jeweils ein Viertel der Population unreifer Pollenzellen eines Kätzchens wurde einer der vier verschiedenen Initialbehandlungen unterzogen:

26°C : Ohne Vorbehandlung: Induktionsmedium, 26°

6d 20°C Hunger : Hungerbehandlung: 6d Hungermedium, 20°C; danach Induktionsmedium, 26°C

6d 32°C : Wärmebehandlung: 6d Induktionsmedium, 32°C; danach Induktionsmedium, 26°C

6d 32°C Hunger : Hunger- und Wärmebehandlung: 6d Hungermedium, 32°C; danach Induktionsmedium, 26°C

2.5. *Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer

2.5.1. Verwendetes Genkonstrukt

Für die Transformation wurde ein Genkonstrukt verwendet, das das Ac-Transposon aus Mais zwischen dem 35S-Promotor und dem *rolC*-Gen enthält (Abb. 3).

Die Merkmale des verwendeten Genkonstrukts sind:

Agrobacterium tumefaciens-Stamm: GV3101 Typ C58

Plasmid: pPCV002

Transferierte DNA-Sequenzen:

pg5 *Amp*^R = *Amp*^R-Gen (codiert ein Polypeptid für eine Ampicillin-Resistenz) unter Kontrolle des beschnittenen Promotors des T_L-DNA Gen 5 aus *Agrobacterium*

Promotor: 35S = konstitutiver Promotor des Blumenkohl-Mosaik Virus

Transposon: *Ac* = *Activator*, Transposon aus Mais

Reporter-Gen: *rolC* = *root locus C* aus *Agrobacterium rhizogenes*

Selektionsmarker: *pnos-nptII* = *Neomycin-Phosphotransferase II* Gen unter Kontrolle des nos-Promotors aus *Escherichia coli*

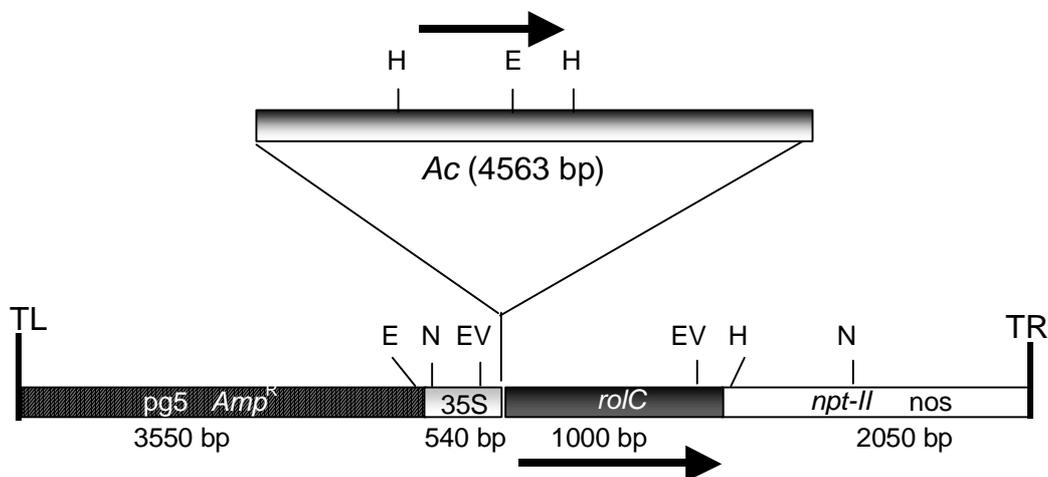


Abb. 3: Struktur des 35S-Ac-*rolC* Genkonstrukts (Spena *et al.* 1989) und Schnittstellen für *NcoI* (N), *HindIII* (H), *EcoRI* (E) und *EcoRV* (EV)
TL: linke T-DNA-Grenze. TR: rechte T-DNA-Grenze. Pfeile: Transkriptionsrichtung

2.5.2. Transformation von regenerativen Kallussen

Die Transformation von regenerativen Kallussen der Schwarzpappelhybride erfolgte nach der Blattabschnitt-*Agrobacterium* Co-Kultur Methode (Horsch 1985, Fladung *et al.* 1997). Regenerative Kallusabschnitte und aufsitzende Adventivblätter bzw. -sprosse wurden mit einer Übernachtkultur von *Agrobacterium tumefaciens* für zwei Tage auf WPM inkubiert. Nach anschließender mehrmaliger Waschung in sterilem und mit Cefotaxime ($500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) versetztem Wasser wurden die Kallusabschnitte auf die Regenerationsmedien WPM 368 und WPM 367 überführt, denen Kanamycinsulfat ($50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) zur Selektion transgener Zellen und Cefotaxime ($500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) zum Abtöten verbleibender *Agrobakterien* zugesetzt wurden (WPM 367KC, WPM 368KC). Jeweils nach ca. 4 Wochen wurden die Explantate auf das gleiche Medium umgesetzt. Sich entwickelnde Sprosse wurden auf wachstumsregulatorfreiem und mit Kanamycinsulfat- ($50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) und Cefotaxime ($500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) - versetztem WPM bewurzelt.

2.6. Bestimmung des Ploidiegrades

2.6.1. Mikroskopie von Metaphase-Chromosomen

Die Bestimmung der Chromosomenzahl von ‚Aue 2‘ erfolgte mikroskopisch (BH-2, Olympus, Tokyo, Japan) in Metaphaseplatten an Wurzelspitzenquetschpräparaten nach Färbung mit Orceinessigsäure. Die Chromosomenzahl von *Populus nigra* L. beträgt $2n = 2x = 38$ (Blackburn and Harrison 1924, Gallego Martin *et al.* 1987). Diese Chromosomenzahl wurde für die Donorbäume ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ bestätigt (Abb. 4).



Abb. 4: Zelle mit 38 kondensierten Chromosomen von ‚Aue 2‘.

2.6.2. Durchflusscytometrie

Der Ploidiegrad regenerierter Kallusse und Sprosse wurde durchflusscytometrisch bestimmt. Blatt- oder Kallusabschnitte wurden mit einer Rasierklinge in einem Extraktionspuffer (Partec, Münster) kleingeschnitten, um die Zellkerne der Farblösung (Partec, Münster)

besser zugänglich zu machen. Die Lösung enthält den Farbstoff DAPI, der spezifisch im DNA-Doppelstrang interkaliert. Die gesamte Suspension wurde durch ein 30 µm Nylonnetz gefiltert, bevor der Ploidiegrad von ca. 5000 Zellkernen in einem Flowcytometer (CAII Cell Analyzer, Partec, Münster) analysiert wurde. Von einem Gewebe, das nicht den diploiden Grad aufwies, wurde mindestens eine zweite Probe analysiert. Haploide Kallusse bzw. Pflanzen wurden monatlich überprüft. Junge Blätter von *in vitro* regenerierten Pflanzen der Donorpflanze ‚Aue 2‘ wurden als diploider Standard sowohl extern (allein analysiert) als auch intern (mit der Probe zusammen präpariert und analysiert) eingesetzt. Der G1-DNA-Peak am Flowcytometer wurde auf Kanal 100 gesetzt. Eine Analyse von gemörsertem Pollen bestätigte, dass ein Peak auf Kanal 50 aus haploiden Zellen resultierte.

2.7. Molekularbiologische Analysen

2.7.1. Isolierung genomischer Pappel-DNA

Ca. 20 mg Blatt- bzw. Kallusgewebe wurden mit einer Schüttelmühle (Retsch, Hilden) nach dem Protokoll von Ziegenhagen *et al.* (1993) homogenisiert. Die genomische DNA wurde gemäß eines verkürzten CTAB-Protokolls (Dumolin *et al.* 1995) einschließlich einer abschließenden Behandlung mit 0,5 µg RNase (Roche Diagnostics, Mannheim) bei 37°C für 30 min extrahiert. Der DNA-Gehalt wurde mittels BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

2.7.2. PCR-Analysen

Sieben Mikrosatellitenorte wurden mit Hilfe einer PCR-Reaktion untersucht: WPMS 4, WPMS 6, WPMS 9 und WPMS 13 wie beschrieben von Van der Schoot *et al.* (2000). WPMS 14, WPMS 18 und WPMS 20 wie beschrieben von Smulders *et al.* (2001).

Jedes 25 µl PCR Reaktionsgemisch enthielt 1× PCR Reaktionspuffer, 1,6 mM MgCl₂, 0,2 µM von jedem Primer, 0,1 mM dNTP, 0,5 U Taq-DNA-Polymerase (Eurogentec, Köln) und 20 ng genomische DNA. Die PCR wurde sowohl in einem GeneAmp 9600 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA) als auch in einem Touch-Down TM Thermal System (Hybaid Limited, Teddington, UK) mit den in Tab. 4 dargestellten Einstellungen durchgeführt. Die Gene *rolC* und *Ac* in transformierten Regeneraten wurden mit Primern wie beschrieben von Fladung *et al.* (1997) amplifiziert.

Tab. 4: PCR-Bedingungen für folgende Genorte.

	WPMS 4	WPMS 6, 9, 14, 18, <i>Ac, rolC</i>	WPMS 13, 20	
Initialdenaturation		4 min bei 94°C		} 30 Zyklen
Denaturation	5 s bei 94°C	30 s bei 94°C	30 s bei 94 °C	
Annealing	15 s bei 55°C	30 s bei 60°C	15 s bei 60°C	
Extension	1 min bei 72°C	1 min bei 72°C	1 min bei 7 2°C	
Finalextension	10 min bei 72°C mit anschließendem A bkühlen auf 4°C			

2.7.3. Trennung und Färbung von PCR-Produkten für Mikrosatelliten

Trennung und Färbung von PCR-Produkten in Polyacrylamid-Gelen wurden gemäß Streiff *et al.* (1998) und der Modifizierung von Degen *et al.* (1999) vollzogen. ‚Aue 2‘ lief in jedem Gel als heterozygoter Standard mit.

2.7.4. Trennung und Färbung von PCR-Produkten der *rolC*- und *Ac*-Amplifikation

Die PCR-Produkte wurden mit einer 1,0% (w/v) Agarose-Gelelektrophorese (Gelpuffer: 0,5xTAE) getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt (0,25 µl/ml Färbelösung) und mit UV-Licht visualisiert. In jedem Gel liefen PCR-Produkte von ‚Aue 2‘ als Negativkontrolle und des transgenen Zitterpappelklons Esch5:35S-*rolC*#1 (Fladung *et al.* 1997) als Positivkontrolle mit.

2.7.5. Southern-Blot-Analyse

Nach einem Verdau der genomischen DNA (30 µg) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung im 1,5%-igen Agarosegel und ein Transfer der DNA auf eine Biotinylated Nylonmembran (Pall Europe Ltd., Portsmouth, UK) nach Maniatis *et al.* (1989). Die Hybridisierung und Chemolumineszenzreaktion erfolgte auf Basis der nichtradioaktiven DIG-Oxygenin-Methode von Neuhaus-Url und Neuhaus (1993), wobei die Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden wie beschrieben von Fladung und Ahuja (1995) durchgeführt wurde. Die Expositionen erfolgten auf Röntgenfilmen (Kodak).

2.8. Statistische Methoden

Statistisch analysierte Experimente wurden nach dem Zufallsprinzip durchgeführt. Zur Analyse wurden nicht-parametrische Verfahren (Chi-Quadrat-Test nach McNemar, U-Test nach Mann-Whitney, H-Test nach Kruskal-Wallis) eingesetzt, da bei den erhaltenen Daten keine Normalverteilung angenommen werden konnte.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Regenerationssystems aus unreifen Pollenzellen bei *Populus* zur Erzeugung haploider regenerativer Kallusse und deren Transformation.

3.1. Etablierung einer Pollenkultur bei *Populus*

3.1.1. Auswahl eines geeigneten Genotyps als Donorpflanze unreifer Pollen

Die auf ihre Gewebekulturtauglichkeit hin überprüften Pappelbäume besaßen folgende Eigenschaften: Die Blütenzweige waren für das Abschneiden oder Abbrechen erreichbar, eindeutig einem Baum zuzuordnen (bei dicht stehenden Bäumen besteht Verwechslungsgefahr herabgefallener Blütenzweige) und männlich.

Zusätzlich limitierten endogene Pathogene die Auswahl. Erst danach konnte das Potential der Pollen zur Umstellung von der gametophytischen Entwicklung (Pollenbildung) zur Entwicklung somatischen Gewebes (Mikrosporen-Embryogenese) getestet werden. Nach der Prozessierung dreier Kätzchen je Genotyp erwiesen sich Pollen der Genotypen ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ (Abb. 5 A, B) aufgrund von Zellteilungen in unreifen Pollen bzw. der Bildung mehrerer Mikrokallusse im Induktionsmedium K99-4B-CAx als responsiv. Auch in einer Kultur der Balsampappel wurden zwei Mikrokallusse festgestellt. Die Kulturen unreifer Pollen der beiden Zitterpappeln Esch 14 und SU 115 waren durch starke Kontaminationen gekennzeichnet. Beim Klon ‚Vorderdeich‘ wurden keine Zellteilungen gefunden (Tab. 5). Alle weiteren Experimente wurden mit den Genotypen ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ fortgeführt, weil sie bezüglich Keimfreiheit und Responsivität am Besten abschnitten.

Tab. 5: Test auf Keimfreiheit und Responsivität bei 6 Genotypen

Genotyp	Keimfreie Kulturen unreifer Pollen nach der Sterilisation	Bildung von Mikrokallussen (Responsivität)
Aue 1	2 von 3	Ja
Aue 2	3 von 3	Ja
Vorderdeich	3 von 3	Nein
SU 115	1 von 3	Nein
Esch 14	0 von 3	Nein
Balsampappel	2 von 3	Ja



Abb. 5: A ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ innerhalb einer Pappelgruppe zwischen Weide und Bach.
 B Kätzchenentwicklung bei ‚Aue 1‘. Von oben nach unten: Kätzchen zwei, sechs und 10 Tage nach Aufstellen eines Zweiges mit geschlossenen Knospen bei Zimmertemperatur.

3.1.2. Isolation und Pollenaufreinigung

Die Isolation von unreifen Pollen wurde durch das Homogenisieren der Kätzchen in einem Mixer mit anschließendem Filtern erzielt. Die auf die Isolation folgende übliche Zellaufreinigung, d.h. die Trennung der vitalen von den toten Zellen bzw. Trennung unterschiedlicher Pollenstadien, wurde mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (Maltose bzw. Percoll) nicht erreicht. Die Dichte der 19%-igen Maltose Lösung erwies sich als zu gering; es bildete sich keine Zwischenschicht. Demgegenüber wurden an den Grenzschichten im Mannitol/Percoll-Gradienten (Mannitol auf 20, 40 und 60% Percoll in Induktionsmedium) Pollenzellen angereichert. Auch innerhalb einer Percollschicht traten wolkige Zellansammlungen auf. Vitale und tote Zellen wurden unter zu Hilfenahme der FDA-

Färbung in allen Schichten mit Ausnahme des Sediments gefunden (Abb. 6). Sie waren nicht voneinander trennbar.

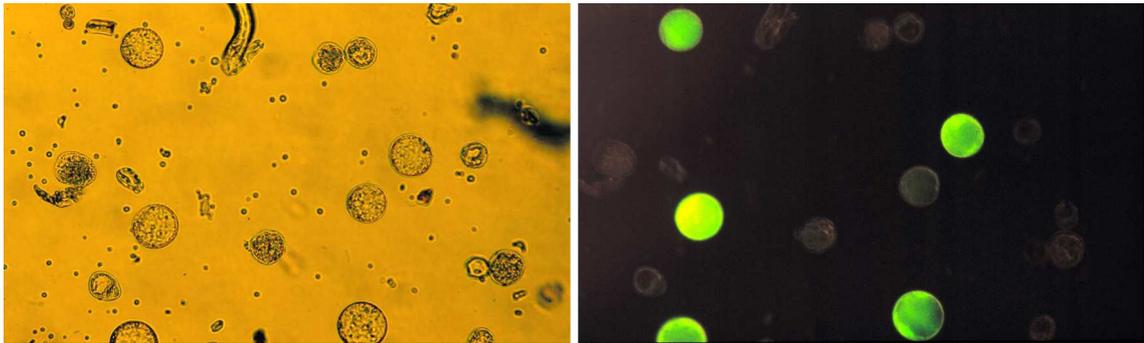


Abb. 6: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie des gleichen Bildes: Tote und vitale (grün leuchtende) Pollenzellen. Oben ist die Spitze eines Pollenschlauchs zu sehen.

Deshalb wurde die gesamte isolierte Population ins Flüssigmedium überführt. Das im Jahr 2002 eingeführte Spülen der isolierten Pollenzellen mit 0,4 M Mannitol auf einem 15 µm-Sieb verbesserte die Zellaufreinigung. Hierdurch konnten die in Lösung übergegangenen Enzyme und sonstigen aktiven Substanzen zerstörter Zellen einfacher als durch Zentrifugation entfernt werden. Das Herausfiltern kollabierter Zellen und Zellfragmente, die kleiner als 15 µm waren, ermöglichte eine bessere Beobachtung der Flüssigkulturen (Abb. 7A). Die Isolationen wurden durchgeführt, solange vitale Pollenzellen mit einem Anteil von mehr als 10% in den Kätzchen zur Verfügung standen.

3.1.3. Induktion der Zellteilung und Androgenese

In der Pollenkultur mit Hungerphase wurden die ersten Zellteilungen frühestens einen Tag nach Ende der Hungerphase im Induktionsmedium festgestellt. In der Kultur ohne Hungerphase wurden Teilungen im Induktionsmedium K99-N4B-CAx innerhalb der ersten Woche beobachtet (Abb. 7B). In Kulturen, die einer Initialtemperatur von 32°C unterworfen waren, wurden nach drei Tagen erste Zellteilungen bemerkt. Die sich weiter entwickelnden, multizellulären Strukturen wurden in zwei Kallustypen unterschieden: In einen kompakten Mikrokallus (Abb. 7C) und einen seltener vorkommenden, aus großen schlauchförmigen Zellen bestehenden Mikrokallus (Abb. 7D). Dieser war häufig im Induktionsmedium K99-N4B-CAx, jedoch kaum im Induktionsmedium K99-4B-CAx zu finden. Das weitere Wachstum des kompakten Mikrokallus mündete entweder in einen globulären festen Kallus oder in einen Embryo (Abb. 7E). Der schlauchförmige Kallustyp entwickelte sich zu einem weichen, teils leicht schleimigen und glasigen Kallus. In wenigen unreifen Pollenkulturen wurden außerdem Pollenschläuche gesehen, welche auf ein spätes Reifestadium von Pollenkörnern bei der Isolation hinwiesen (Abb. 7C). In den wärmebehandelten Pollenkulturen wurde nicht ein einziger Pollenschlauch entdeckt. Die Entwicklung von einer unreifen Pollenzelle bis zum

Kallus mit einem Durchmesser von ca. 1 mm dauerte 4 bis 8 Wochen. Dann wurden die Kallusse aus dem flüssigen auf das feste Medium überführt.

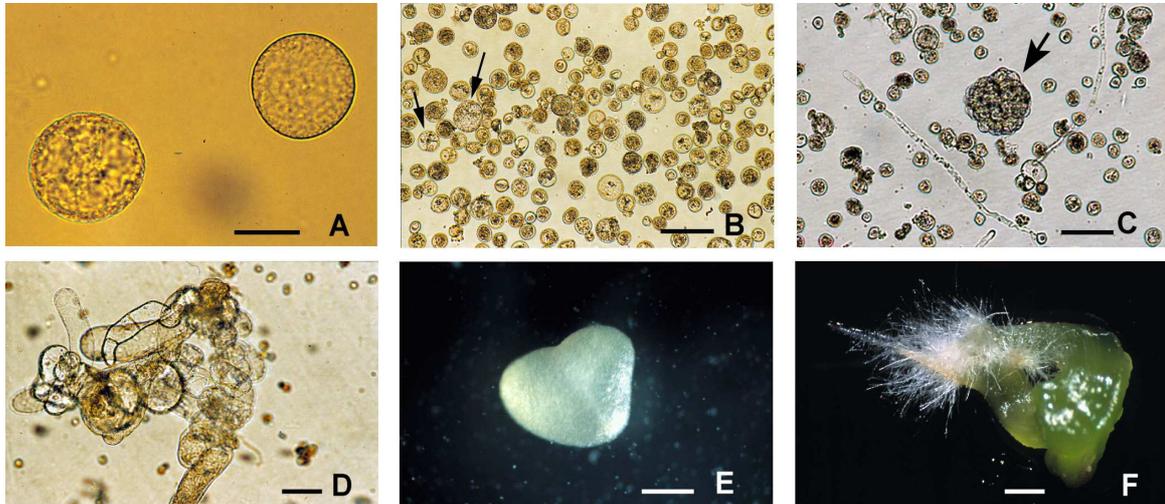


Abb. 7: Isolierte unreife Pollenzellen, Kallus- und Embryobildung **A** Vitale Mikrosporen nach der Isolation. **B** Erste Zellteilungen (Pfeile). **C** kompakter Mikrokallus zwischen kollabierten Pollenzellen und Pollenschläuchen. **D** Kallus aus transparenten schlauchförmigen Zellen **E** Embryo nach vierwöchiger Kultur. **F** Embryo mit Adventivwurzeln und Kotyledonen nach achtwöchiger Kultur. Maßstab: **A** 25µm, **B-D** 100 µm, **E** 500 µm, **F** 1 mm

In den Pollenkulturen von 2001 entwickelten sich 112 Kallusse, die größer als 1 mm waren. Das sind im Durchschnitt 19 Kallusse je responsives Kätzchen. Aus den Kulturen von 2002 gingen 1375 Kallusse hervor, die größer als 1 mm waren. Das sind im Durchschnitt 72 Kallusse je responsives Kätzchen, also fast viermal mehr als im Jahre 2001. Die Kallusausbeute der Pollenkulturen beider Jahre zeigt Tab. 6. Sowohl zwischen den Kulturzeiträumen (2001 bzw. 2002) als auch zwischen den Genotypen wurde kein signifikanter Unterschied nach dem U-Test gefunden. In beiden Jahren waren etwa die Hälfte der prozessierten Kätzchen nicht responsiv.

3.1.4. Zellvitalitätsrate, Populationsdichte und Kaltlagerung

Im Jahr 2002 wurde geprüft, ob der Anteil vitaler Pollenzellen, die Populationsdichte und die Länge der Kaltlagerung geernteter Kätzchen einen Einfluss auf den Ertrag der Kultur unreifer Pollenzellen hat. Nach der Isolation wurde die Anzahl aller unreifen Pollenzellen und der vitalen unreifen Pollenzellen durch ein Häemocytometer abgeschätzt. Ebenfalls wurde auf diese Weise die Populationsdichte in der Kultur bestimmt, denn das isolierte Sediment aus unreifen Pollenzellen eines jeden Kätzchens war jeweils in einem Volumen von 40 ml

resuspendiert (Tab. 7). Ein Einfluss von Pollenvitalitätsrate, Populationsdichte oder Kaltlagerung auf die Kallusausbeute anhand der Daten von 38 Isolationen war nicht erkennbar. Korrelationsdiagramme und Korrelationskoeffizienten sind in Abb. 8 dargestellt. Ein linearer Zusammenhang bestand zwischen ihnen nicht.

Tab. 6: Zusammenfassung der Kallusinduktion

Donorpflanze	Kätzchen	Responsive Kätzchen	Kallusse (> 1mm)	Min-Max: Kallusse / responsives Kätzchen	Durchschnitt: Kallusse / responsives Kätzchen
<u>Jahr 2001</u>					
Aue 1	8	4	98	2 - 70	26
Aue 2	3	2	14	5 - 9	4
Insgesamt 2001	11	6	112	2 - 70	19
<u>Jahr 2002</u>					
Aue 1	14	8	358	4 - 95	45
Aue 2	19	11	1017	2 - 296	92
Insgesamt 2002	33	19	1375	2 - 296	72

Tab. 7: Zellvitalitätsrate und Populationsdichte

	Zellvitalitätsrate	Populationsdichte
Mittelwert*	44 %	$3,7 \times 10^5$ Zellen / ml
Standardabweichung	19 %	$2,4 \times 10^5$ Zellen / ml

* Daten wurden bei 38 Pollenisolationen erhoben.

Nach einer sechswöchigen Kaltlagerung (2°C) wurde in sechs Kätzchen, in denen sich zu Beginn mehr als 20% vitale unreife Pollenzellen befanden, mittels FDA-Test keine vitale Zelle mehr gefunden. Ebenfalls wurden von im Februar/März geernteten Blütenreisern nach einer sechswöchigen Dunkellagerung bei 4°C im Wasser keine vitalen Pollenzellen in neun untersuchten Blütenknospen entdeckt. Diese waren zudem nicht mehr in der Lage unter Licht und Wärme auszutreiben. Ein Hinweis, dass die Regenerationsfähigkeit unreifer Pollenzellen durch Kaltlagerung nicht über den natürlichen Blütezeitpunkt der Pappeln hinaus zu erhalten ist. Im Gegensatz zu den Blütenknospen trieben die Blattknospen nach sechs Wochen noch aus.

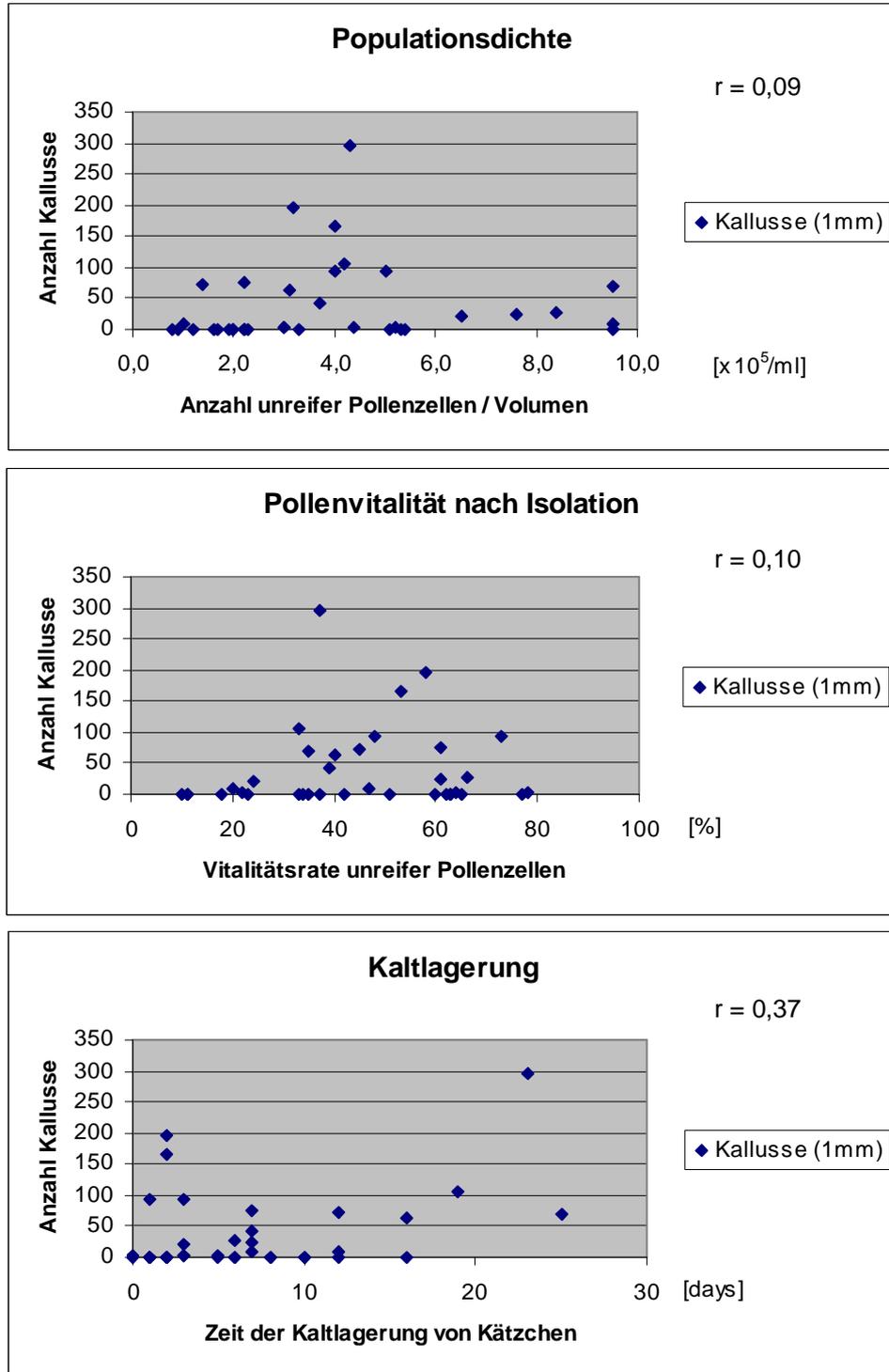


Abb. 8: Korrelationsdiagramme mit zugehörigen Korrelationskoeffizienten: Anzahl erhaltener Kallusse > 1 mm im Verhältnis zur Populationsdichte, Pollenvitalitätsrate und Zeit der Kätzchen-kaltlagerung.

3.1.5. Initialbehandlungen in der Kultur unreifer Pollenzellen

Im Jahr 2002 wurden Populationen unreifer Pollenzellen von 20 Kätzchen (jeweils 10 von ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘) isoliert und geviertelt. Jeweils ein Viertel einer Population wurde einer der vier unter 2.4.3 beschriebenen Behandlungen (26°C; 6d 32°C; 6d 26°C Hunger; 6d 32°C Hunger) unterworfen. Die Populationen von sechs Kätzchen generierten unter keiner der vier Behandlungen einen Kallus. Außerdem waren die Populationen vier anderer Kätzchen teilweise und die Populationen zwei weiterer Kätzchen vollständig mit Pilz oder Bakterien kontaminiert. Ihre Ausbeuten wurden nicht in den Vergleich einbezogen. Die Ergebnisse der restlichen acht Populationen unreifer Pollenzellen sind in Tab. 8 zusammengefasst. Sowohl die hungerbehandelten als auch die wärmebehandelten Kulturen brachten eine höhere Ausbeute als die unbehandelten. Eine kombinierte Wärme- und Hungerbehandlung führte zu den höchsten Kalluserträgen. Allerdings bestand nach dem Signifikanztest von Kruskal und Wallis zwischen einer und allen anderen Behandlungen kein signifikanter Unterschied. Ein Vergleich der einzelnen Behandlungen untereinander mittels U-Test ergab, dass die Kallusausbeute der Kulturen mit Wärmebehandlung (6d 32°C) und mit kombinierter Wärme-Hunger-Behandlung (6d 32°C Hunger) gegenüber der Ausbeute unbehandelter Kulturen (26°C) signifikant erhöht war.

Ergebnisse

Tab. 8: Anzahl erhaltener Kalluse aus dem Vergleich verschiedener Initialbehandlungen

26°C:	Ohne Initialbehandlung: Induktionsmedium, 26°
6d 32°C:	Wärmebehandlung: 6 d Induktionsmedium, 32° C; danach Induktionsmedium, 26°C
6d 20°C Hunger:	Hungerbehandlung: 6 d Hungermedium, 20°C; danach Induktionsmedium, 26°C
6d 32°C Hunger:	Hunger- und Wärmebehandlung: 6 d Hungermedium, 32°C; danach Induktionsmedium, 26°C

Kultur unreifen Pollens (Donor)	26°C	6d 32°C	6d 20°C Hunger	6d 32°C Hunger	total
A19 (Aue 1)	8	19	16	19	62
A23 (Aue 2)	82	66	56	91	295
A26 (Aue 1)	1	19	3	71	94
A27 (Aue 2)	1	5	7	15	28
A30 (Aue 1)	5	15	3	6	29
A35 (Aue 2)	0	11	95	59	165
A36 (Aue 2)	1	22	80	93	196
A39 (Aue 1)	9	23	8	3	43
total	107	180	268	357	912

Die Kulturen von sechs unreifen Kätzchen waren nicht responsiv. Sechs Kulturen unreifer Kätzchen wurden wegen Kontamination nicht in diesem Vergleich berücksichtigt.

3.1.6. Pflanzenregeneration

Die Ergebnisse der Pflanzenregeneration aus Kallussen und Embryonen für die Jahre 2001 und 2002 sind in Tab. 9 zusammengefasst. Embryonen wurden nur im Induktionsmedium K99-4B-CAx mit anschließendem Transfer auf wachstumsregulatorfreies Medium gebildet.

Tab. 9: Zusammenfassung der Regenerationsergebnisse: Anzahl erhaltener Kallusse und *in vitro*-Pflanzen aus den Kulturen der Jahre 2001 und 2002.

Donorpflanze	Kallusse (≥ 1mm)	Ergrüne Kallusse und Embryonen ^a	Organ- differenzierung ^a	<i>In vitro</i> - Pflanzen ^a
<u>Jahr 2001</u>				
Aue 1	98	35 (35%)	4 (4%)	1 (1%)
Aue 2	14	4	1	
Insgesamt 2001	112	39 (35%)	5 (4%)	1 (0.9%)
<u>Jahr 2002</u>				
Aue 1	358	185 (52%)	77 (21%)	3 (0,8%)
Aue 2	1017	330 (32%)	151 (15%)	12 (1,2%)
Insgesamt 2002	1375	515 (37%)	228 (17%)	15 (1,1%)

^a In Klammern: Prozentualer Anteil des Wertes je Kallusanzahl > 1mm.

Im Jahr 2001 wuchsen Kallusse und Embryonen auf semifestem Regenerationsmedium WPM ohne Wachstumsregulatoren heran. Ein Drittel der 112 Kallusse und Embryonen wurden im Licht grün, einige Embryonen formten Kotyledonen und Wurzelhärchen (Abb. 7F). Eine Kultur auf wachstumsregulatorfreiem Medium resultierte in einer Vitrifikation und Absterben der Kallusse und Embryonen. Fünf der Kallusse bzw. Embryonen differenzierten nach einem Transfer auf das Medium WPM 367 Adventivblätter oder Sprosse aus. Jedoch regenerierten nur aus einem Kallus (M22-1c5) Pflanzen. Dieser regenerative Kallus M22-1c5 wurde auf WPM 367 fortlaufend alle vier bis sechs Wochen umgesetzt. Auf den Kallusstücken bildeten sich Kleinstsprosse mit eingewölbten schmalen Blättern (Abb. 9A und B), die für Pappeln nicht charakteristisch waren. Gelegentlich bildeten sich verlängerte Sprosse mit länglichen pappeltypischeren Blättern (regenerierbare Sprosse, Abb. 9C), welche sich zu Pflanzen entwickeln konnten (Abb. 9D). Diese Pflanzen waren langsam wachsend und kleinwüchsig.

Im Jahre 2002 wurden alle hervorgegangenen 1375 Kallusse auf wachstumsregulatorhaltigen semifesten Medien kultiviert. Mehr als ein Drittel von ihnen

wurde unter Licht grün und ein Sechstel von ihnen differenzierte Organe wie Sprosse, Adventivblätter oder Adventivwurzeln aus (Tab. 9). Zwischen den drei eingesetzten Medien (WPM 368 $\frac{1}{2}$, MS 368, WPM 368 Maltose) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl ergrünter Kallusse (Tab. 10). Die meisten transparenten Kallusse wurden braun und starben ab, wenige bildeten einen grünen Kern, aus dem später Sprosse etc. regenerierten. Von den 228 Kalluslinien, die erste Organe ausdifferenzierten, wurden 104 Kalluslinien ausgewählt, mit denen die Regeneration fortgeführt wurde. Die Auswahlkriterien waren intensive Grünfärbung, Blattbildung oder Sprossbildung (z. B. Linie FD25 in Abb. 10A) . Die Sprosse wurden zur Bewurzelung auf wachstumsregulatorfreies WPM überführt. Dabei bildeten 15 Linien Wurzeln aus (Abb. 10B). Bis zum Abschluss dieser Arbeit wurden acht Linien in Erde überführt, die unter 3.3. näher beschrieben sind. Alle Linien besaßen kleinere Blätter und Stammhöhen als die gleichzeitig in Erde überführten Regenerate der Kontrolle ‚Aue 2‘. Zudem variierten sie untereinander in Wuchshöhe und Phänotyp (Abb. 11A). Zwei Pflanzen der Kalluslinie M22-1c5 waren zum Abschluss der Arbeit bereits in der zweiten Vegetationsperiode in Erde (Abb. 11B und C).



Abb. 9: Pflanzenregeneration in der Kultur unreifer Pollenzellen 2001: Regenerative Kalluslinie M22-1c5. **A, B** Kleinstsprosse mit eingedrehten Blättern auf einem Kallus. **C** Regenerierbarer Spross. **D** Drei Regenerate und Kontrolle ‚Aue 2‘ (links) vier Wochen nach Überführung in Erde. **Maßstab:** **A-C** 2 mm, **D** 5 cm

Tab. 10: Wirkung der Regenerationsmedien auf das Ergrünen der Kallusse in Licht.

	WPM 368	1/2 MS 368	WPM 368 Maltose	Summe
Aufgelegte Kallusse	451	484	440	1375
Ergrünte Kallusse	160	196	159	515
Aufgelegte Kallusse/ Ergrünte Kallusse	35%	40%	36%	37%

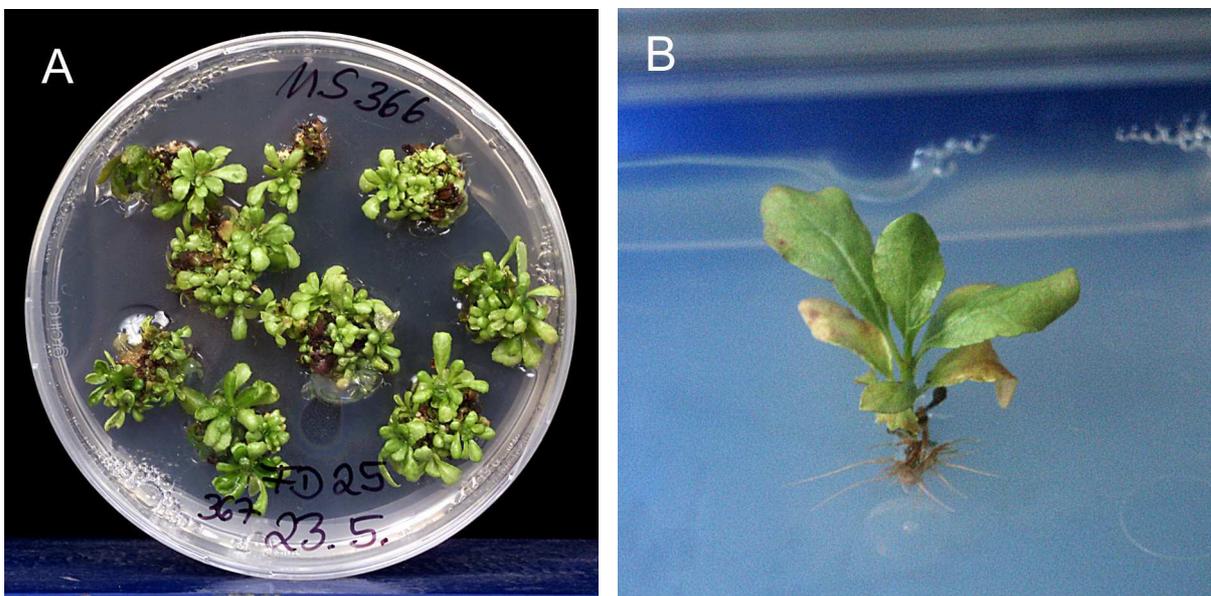


Abb. 10: Linie FD25:

A Regenerativer Kallus mit Adventivsprossen (Schalendurchmesser: 90 mm)

B Regenerat *in vitro* (Höhe: ca. 20 mm).

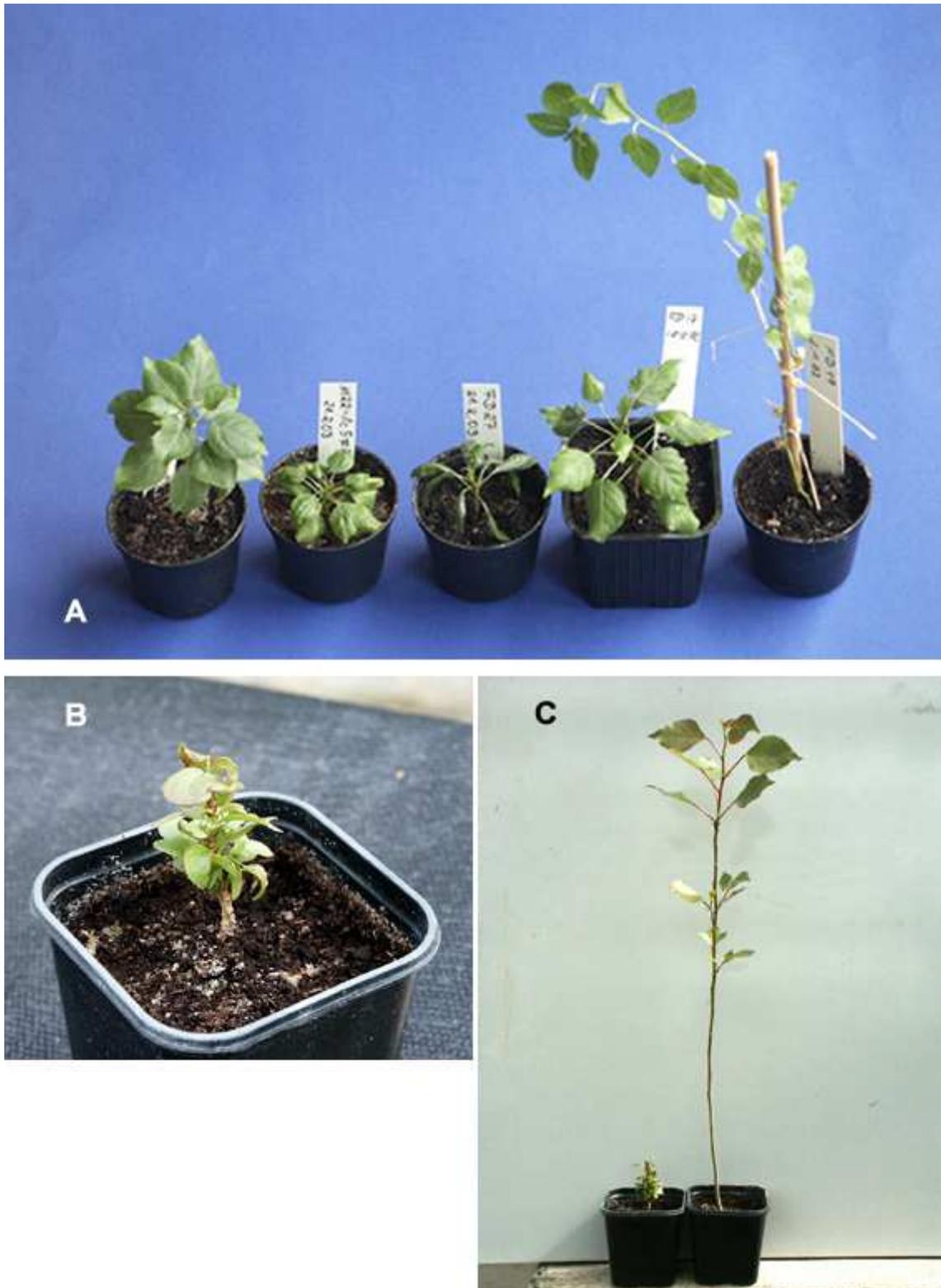


Abb. 11: **A** Phänotypische Variation der Regenerate aus den Pollenkulturen 2001 und 2002. Von links nach rechts: FD 10, M22-1c5, FD27, FD 17, FD 19. **B** M22-1c5: Blattaustrieb im zweiten Jahr. **C** M22-1c5 (links) im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrolle Aue 2 zu Beginn der zweiten Vegetationsperiode. Topfdurchmesser rund: 5 cm, eckig: 6 cm.

3.2. Analyse des Ploidiegrades und der Zygotie

3.2.1. Bestimmung der Ploidiestufe erhaltener Kalluslinien mittels Durchflusscytometrie

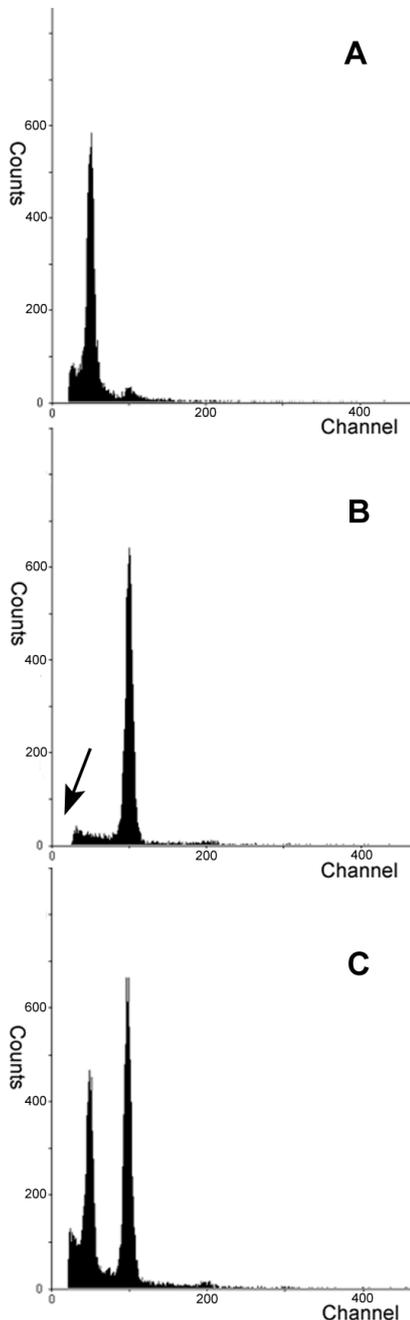


Abb. 12: Durchflusscytometrische Analyse der DAPI-gefärbten DNA. Ein Schwellenwert filterte kleine Signale heraus (Pfeil). **A** Haploide regenerative Kalluslinie M22-1c5. **B** Diploide Kontrolle ‚Aue 2‘. **C** M22-1c5 und ‚Aue 2‘ in einer Probe zur gleichen Zeit gemessen.

Blattabschnitte des *in vitro* kultivierten Klons ‚Aue 2‘ dienen bei allen Analysereihen der Durchflusscytometrie als Kontrollen zum Eichen des diploiden Peaks (Kanal 100). Eine Analyse gemörserter reifen Pollens ergab, dass haploide Zellkerne einen Peak im Kanal 50 erzeugen. Aus Pollen und diploidem Kontrollgewebe bestehende Proben, welche gemeinsam präpariert und gemessen wurden, wurde genauso exakt der einfache und doppelte haploide DNA-Gehalt wiedergegeben wie bei einer jeweiligen Einzelmessung (Abb. 12).

Die Ergebnisse der Ploidiestufenbestimmung regenerierter Kalluslinien beider Jahre mittels der Durchflusscytometrie sind in Tab. 11 zusammengefasst. Im Jahre 2001 wurde der Ploidiegrad von neun Kalluslinien bestimmt: Zwei Linien waren haploid, fünf diploid, eine war tetraploid und eine andere zeigte Ploidiegrade von $2n$ und $4n$. Eine der beiden haploiden Kalluslinien diploidisierte innerhalb von 6 Wochen nach der Erstmessung. Die andere haploide Kalluslinie, M22-1c5, wird als haploider regenerativer Kallus seit zwei Jahren auf wachstumsregulatorhaltigem Medium (WPM 367) kultiviert (siehe 3.3). Des Weiteren wurde der Ploidiegrad von 94 regenerativen Kalluslinien aus der Kultur 2002 analysiert. Sechzehn Linien waren haploid, von denen sechs diploidisierten, eine einging, zwei nach einjähriger Kultur ohne

Sprossbildung verworfen wurden und sieben weiterhin in Kultur geführt werden (Tab. 12). Die Diploidisierung der sechs Kallusse wurde 4-16 Wochen nach der ersten haploiden Bestimmung festgestellt. Bisher konnten aus der Linien FD25 und FD83 haploide Pflanzen *in vitro* regeneriert und in Erde überführt werden.

Tab. 11: Ploidiegrad von 103 durchflusscytometrisch analysierten Kalluslinien.

	gesamt	n	n + 2n	1,5n	2n	2n + 4n	3n	4n
Anzahl Kallusse (2001)	9	2			5	1		1
Anzahl Kallusse (2002)	94	16	1	1	69	2	1	4
Insgesamt	103	18	1	1	74	3	1	5

Tab. 12. Bestehende haploide regenerative Kalluslinien und Ploidiegrade ihrer Entwicklungsstufen (Stand August 2003)

Haploide regenerative Kalluslinie	Donor	Ploidiegrade von					
		Sprossen		Pflanzen <i>in vitro</i>		in Erde überführte Pflanzen	
		n	2n	n	2n	n	2n
M22-1c5 Kleinspross	Aue 1	33	7	-	-	-	-
M22-1c5 regenerier. Spross		-	20	-	8	-	5
FD4	Aue 2	3	2	1	2	-	-
FD21	Aue 2	9	7	-	2	-	-
FD25	Aue 1	20	-	8	-	4	3
FD81	Aue 2	1	1	-	-	-	-
FD83	Aue 2	2	1	-	1	2	1
FD84	Aue 2	1	1	-	-	-	-

Aus den unbehandelten Kulturen gingen mehr Haploide hervor als aus den initialbehandelten (Tab. 13). Bezogen auf die Gesamtanzahl der Kallusse > 1mm war der Anteil haploider regenerativer Kallusse mit 7% in den unbehandelten Kulturen höher als in den drei initialbehandelten Kulturen, deren Anteil jeweils bei ca. 1% lag. Somit wurde zwar durch die kombinierte Wärme- und Hungerbehandlung die absolute Ausbeute an Kallussen erhöht, die Erzeugung haploider Gewebe hingegen verringert. Ein statistischer Nachweis ist aufgrund der geringen Anzahl von insgesamt 14 Haploiden nicht möglich (eine Chi-Quadrat-Einfachanordnung erfordert einen Mindestumfang von 20).

Tab. 13: Verteilung der regenerativen Kallusse, die aus dem Vergleich der Initialbehandlungen im Jahre 2002 stammen und deren Ploidiegrad bestimmt wurde.

	26°C; ohne Initialbehandlung	6d 32°C	6d 20°C Hunger	6d 32°C Hunger
Gesamtanzahl Kallusse >1mm	107	180	268	357
Regenerative Kallusse	12	14	17	26
Davon haploid	7	2	3	2
Anteil haploider regenerativer Kallusse an der Gesamtanzahl	7%	1,1%	1,1%	0,6%

3.2.2. Nachweis des haploiden Ursprungs mittels Mikrosatelliten

Der molekularbiologische Nachweis des haploiden Ursprungs bei diploiden und polyploiden Regeneraten einer Pollenkultur basiert auf der Heterozygotie des Donorbaums. Mit Hilfe von Mikrosatelliten werden in der DNA der heterozygoten Donorpflanze Polymorphismen identifiziert. Haploide und homozygote (doppelhaploide, multihaploide) Regenerate können dann aufgrund des fehlenden Polymorphismus erkannt werden.

Aus Kallus- bzw. Blattgewebe wurde nach dem verkürzten CTAB-Protokoll (Dumolin *et al.* 1995) genomische DNA in Mengen von 300 ng/µl bis 2000 ng/µl (durchschnittlich 900 ng/µl) und in einer hohen Qualität mit einem OD₂₆₀/OD₂₈₀ Verhältnis von durchschnittlich 1,94 (Min-Max 1,80-2,03) isoliert. Die DNA von den Donorbäumen ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘, von neun Kalluslinien aus der Pollenkultur 2001 und von 68 Kalluslinien aus der Kultur 2002 wurden analysiert. Darunter befanden sich acht haploide und unter diesen die vier regenerativen Linien M22-1c5, FD4, FD21 und FD25. Einerseits dienten die Haploiden als homozygote Kontrollen, andererseits sollte ihre Allelverteilung untersucht werden.

Von den sieben untersuchten SSR-Loci WPMS 4, WPMS 6, WPMS 9, WPMS 13, WPMS 14, WPMS 18 und WPMS 20 waren alle bei den Donorbäumen heterozygot. Die allelischen Kombinationen an diesen SSR-Loci waren bei ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ identisch. Abb. 13 gibt ein Beispiel für Geno- und Haplotypen der Donorbäume und der von ihnen abstammenden regenerierten Kalluslinien am SSR-Locus WPMS 14.

Der Ort WPMS 4 lieferte für die Donorbäume nur eine Bande (Abb. 14) und innerhalb der Regenerate wiesen einige diese Bande auf und andere nicht. Diese Aufspaltung deutete auf ein Nullallel hin und bestätigte die Heterozygotie der Donorbäume an diesem Mikrosatellitenort. Ein Nachweis der Homozygotie an diesem Ort war nur für das Nullallel (keine Bande) möglich, weshalb WPMS 4 nicht für die Untersuchung des haploiden Ursprungs eingesetzt wurde. Der Locus WPMS 6 zeigte unklare Bandenstrukturen (Abb. 15) und wurde nicht weiter verwendet. Damit wurden fünf Mikrosatelliten-Marker für die Untersuchung zum haploiden Ursprung der regenerativen Kalluslinien eingesetzt.

Die Auswertung der erhaltenen Allelverteilungen ergab, dass die acht Haploiden, 55 Diploiden, drei Tetraploiden und eine Aneuploide (zwischen $1n$ und $2n$) in allen fünf untersuchten SSR-Loci genau eines der väterlichen Allele je Mikrosatellitenort aufwiesen, sich also eindeutig als Regenerate haploider Pollen erwiesen. Für die nichthaploiden Linien wurde entsprechend eine reine Homozygotie angenommen. Eine diploide Linie wies neben vier homozygoten Loci mit WPMS 20 einen Ort auf, von dem kein Allel amplifiziert wurde. Auch für diese Linie wurde die Homozygotie angenommen. Interessanterweise traten bei den Diploiden auch sechs Linien auf, die sowohl homozygote als auch heterozygote Loci offenbarten. Für diese Linien wurde ein haploider Ursprung verneint. Ihre Allelverteilung ist in Tab. 14 dargestellt.

Drei Diploide besaßen an allen Loci die gleiche Allelkombination wie die Donorbäume. Der Ursprung aus einer haploiden Pollenzelle wurde hier verneint. Aus keiner dieser Kalluslinien regenerierten in der *in vitro*-Kultur Pflanzen. Eine der drei Linien ging ein. Die beiden anderen bildeten wenige Sprosse aus, die jedoch nicht wurzelten. Diese Linien wurden nicht weiterkultiviert. Tab. 15 zeigt die Allelverteilung von analysierten und erfolgreich in Erde überführten Linien.

Zusammenfassend wird festgehalten, dass alle Haploiden genau ein Allel je Mikrosatellit aufwiesen, so wie es von einem einfachen Chromosomensatz erwartet wurde. Von den 69 Di- und Tetraploiden waren neun nicht homozygot. Ihr Ursprung lag demnach nicht in einer einzelnen haploiden Zelle. Einen Überblick der gesamten Zytotieanalyse gibt die Tab. 16.

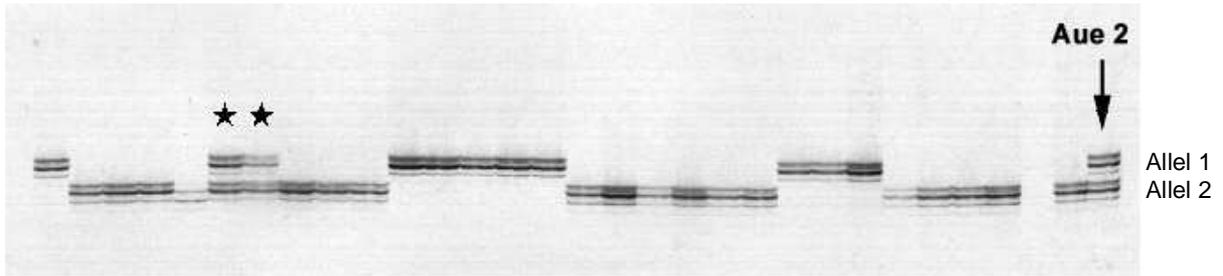


Abb. 13: Polyacrylamid-Gel des SSR-Locus WPMS 14 von 29 Kalluslinien und der heterozygoten Kontrolle 'Aue 2' (Pfeil). Zwischen den homozygoten Linien (jeweils eine Bande) sind zwei mit heterozygoten Loci ersichtlich (Zwei Banden, Sterne)

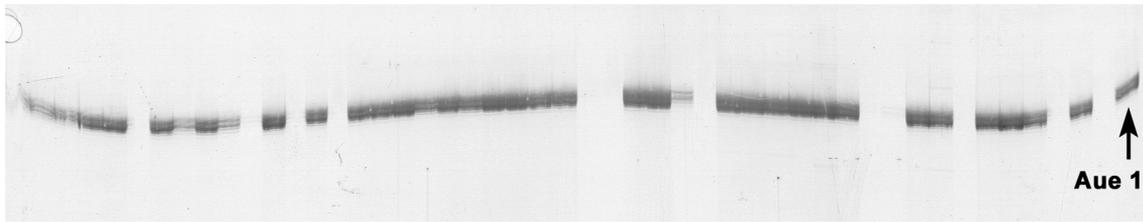


Abb. 14: SSR-Locus WPMS 4: Donorpflanze Aue 1 und 48 Kalluslinien.

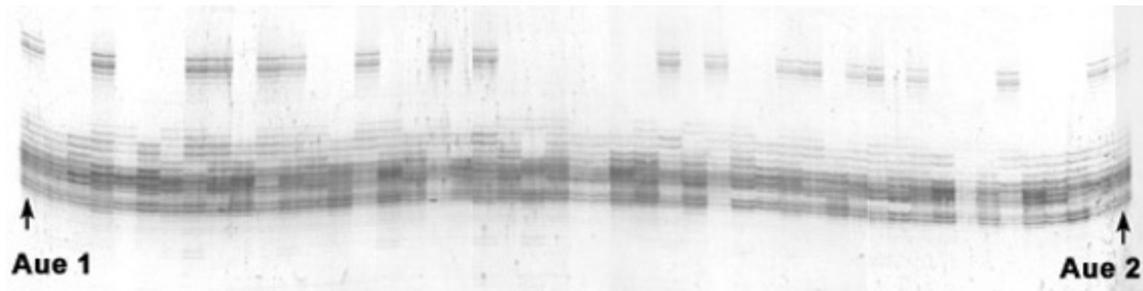


Abb. 15: SSR-Locus WPMS 6: Donorbäume Aue 1 und Aue 2 und 46 Regenerate.

Tab. 14: Sechs diploide Kallusse aus der Pollenkultur, die sowohl homozygote (weiß) als auch heterozygote (grau) Loci besitzen. Die beiden Allele 1 und 2 sind jeweils aufgeführt.

Linie	WPMS 9	WPMS 13	WPMS 14	WPMS 18	WPMS 20	Donor
M23-3	1 2	1 2	1 2	1 2	2	Aue 1
FD 12	1 2	1 2	1	1 2	1 2	Aue 2
FD 7	1 2	2	1 2	1 2	1	Aue 2
FD 35	1 2	2	2	1 2	1 2	Aue 2
FD 18	1	2	1 2	1 2	1 2	Aue 2
FD 40	2	1 2	1	2	1 2	Aue 2

Tab. 15: Allelverteilung der Linien, die mittels Mikrosatelliten analysiert und deren Pflanzen erfolgreich in Erde überführt wurden.

Linie	WPMS 9	WPMS 13	WPMS 14	WPMS 18	WPMS 20	Donor
M22-1c5	1	2	1	2	1	Aue 1
FD6	1	1	2	2	2	Aue 2
FD10	1	2	2	1	2	Aue 2
FD17	1	1	1	2	1	Aue 2
FD19	1	2	1	2	1	Aue 2
FD25	1	1	2	1	2	Aue 1
FD27	1	2	2	2	2	Aue 2

Tab. 16: Zygotieanalyse an fünf Mikrosatellitenorten bei 77 regenerativen Kalluslinien.

	haploid	diploid*	tetraploid
Homozygote Loci	8	57*	3
Heterozygote Loci wie die Donorbäume	-	3	-
Homo- und heterozygote Loci	-	6	-
Insgesamt	8	66	3

*incl. einer Aneuploiden

3.2.3. Verteilung der vererbten Allele innerhalb der regenerierten Kalluspopulation

Innerhalb der analysierten Gruppe homozygoter Kallusse wurde die Häufigkeit der einzelnen Allele bestimmt und mit der Chi-Quadrat-Einfachanordnung auf eine 1:1 Segregation hin untersucht (Tab. 17). Während am Locus WPMS 14 die Allelverteilung gegenüber einer 1:1 Aufspaltung signifikant verschieden war (für $p < 0,05$), war dieses am Locus WPMS 18 nicht der Fall (χ^2 -Wert für $p < 0,05$ ist 3,84). Sehr stark von der 1:1 Segregation verschieden war der Ort WPMS 9. Dort trugen 51 von 68 untersuchten Kallussen das Allel 1. Betrachtet man nur die Analyse des Mikrosatellitenortes WPMS 9 von den 15 Linien, die *in vitro* Pflanzen ausbildeten (Tab. 18), trugen 13 Linien das Allel 1 und zwei das Allel 2.

Tab. 17: Verteilung der vererbten Allele bei 68 regenerierten Kallussen, die jeweils ein Allel an allen Mikrosatellitenorten aufwiesen und Überprüfung der erwarteten 1:1 Segregation mittels Chi-Quadrat-Einfachanordnung. Allel 1 ist länger als Allel 2.

Allel	WPMS 9	WPMS 13	WPMS 14	WPMS 18	WPMS 20
1	51	38	25	26	33
2	17	30	43	42	34
χ^2	17**	1	4,76*	3,76	0

* $p < 0,05$; signifikant verschieden

** $p < 0,01$; signifikant verschieden

Tab. 18: Verteilung der vererbten Allele bei den analysierten Regeneraten, die *in vitro* wurzelten bzw. bereits in Erde überführt wurden.

Allel	WPMS 9	WPMS 13	WPMS 14	WPMS 18	WPMS 20
1	13*	4	7	4	6
2	2*	11	8	11	9

* $p \leq 0,05$; signifikant verschieden

Die χ^2 -Einfachanordnung ist wegen Häufigkeiten kleiner als 5 nicht zulässig. Der exakte Test nach Fisher und Yates ersetzt bei sehr kleinen Häufigkeiten und zwei Klassen die χ^2 -Einfachanordnung, erfordert allerdings ganze Zahlen. Wird die Stichprobengröße von 15 auf 14 und die größere Häufigkeit um eins reduziert, kann der Test nach Fisher und Yates angewendet werden. Die erwartete Häufigkeit ist dann 7 statt 7,5. Danach ist WPMS 9 signifikant von einer 1:1 Segregation verschieden. Mit einer Erhöhung der Häufigkeit des Allels 1 von 12 auf 13 wird die Signifikanz noch gestärkt.

3.3. Aufrechterhaltung haploider regenerativer Kalluslinien *in vitro*

Es bedarf einer langfristigen Kultur haploider Linien, um diese über einen längeren Zeitraum für Transformationen bereitstellen zu können. Der Aufrechterhaltung des haploiden Status steht die Problematik der Autopolyploidisierung entgegen. Durch eine selektive Kultur haploider regenerativer Kallusse und Sprosse, in der mittels regelmäßiger Überprüfung der Ploidiestufe nichthaploide Explantate entfernt werden, kann der haploide Status der Kultur aufrecht erhalten werden, wenn eine spontane Polyploidisierung nur gelegentlich auftritt.

Zudem sollte sich eine Kalluslinie *in vitro* gut vermehren und stetig Pflanzen hervorbringen. Unter den in Tab. 12 aufgeführten haploiden regenerativen Kalluslinien kamen hierfür die Linien M22-1c5, FD 25 und FD83 in Betracht, weil sie eine konstante Sprossregeneration aufwiesen und von ihnen Pflanzen in Erde transferiert werden konnten. Die anderen Linien schieden daher vorerst aus. Die Linie FD 4 war nicht vital trotz kurzzeitiger Sprossregeneration mit anschließender Bewurzelung. Vielfach starben einzelne Kallusse ab und zwei Pflanzen konnten nicht erfolgreich in Erde überführt werden. Die drei Linien FD 21, FD 81 und FD 84 bildeten bisher keine bewurzelten Sprosse.

M22-1c5

Bei der haploiden regenerativen Kalluslinie M22-1c5 wurden über 80 flowcytometrische Messungen an Kallus-, Spross- und Wurzelgewebe durchgeführt. Dabei fiel auf, dass 12 analysierte regenerierbare Sprosse und 8 Pflanzen *in vitro* einschließlich zweier Wurzeln allesamt diploid (Abb. 9C und D) und ein Spross sogar triploid waren. Das deutet darauf hin, dass für M22-1c5 das Bewurzeln auf der haploiden Ebene nicht möglich ist. Deshalb konnte in der Erhaltungskultur anhand dieser morphologischen Charakteristik putativ diploides Gewebe, d. h. alle Kallusse auf denen regenerierbare Sprosse saßen, ohne durchflusscytometrische Bestimmung eliminiert werden.

Diese Charakteristik war jedoch für den Umkehrschluss, haploides Gewebe anhand des Sprossphänotyps zu erkennen, nicht hinreichend. Eine durchflusscytometrische Analyse von 40 regenerativen Kallussen mit Kleinsprossen, die die charakteristischen eingewölbten Blätter trugen (Abb. 9A, B) und als haploid eingestuft wurden, enthüllte, dass sieben von diesen diploid waren.

Kallusse mit aufsitzenden Sprossen der Linie M22-1c5 sind gut *in vitro* vermehrbar und nach Sprossbewurzelung gut in Erde überführbar. Somit wurde für M22-1c5 eine selektive Kultur wie folgt etabliert: Es werden nur kleine Kallusstücke, die eine haploidtypische Morphologie aufwiesen, vermehrt. Alle zwei bis drei Monate werden die Kallusstücke mit Hilfe der Durchflusscytometrie auf ihre Ploidiestufe hin überprüft und gegebenenfalls diploide entfernt. Dadurch gelang es, den haploiden Status der regenerativen Kalluslinie M22-1c5 bereits über zwei Jahre hinaus zu erhalten. Die zwei Pflanzen, die bereits in der zweiten Vegetationsphase waren (Überwinterung im Gewächshaus > 0°C), entwickelten etwas größere Blätter und erreichten eine Höhe von 7 bis 8 cm (Abb. 16).



Abb. 16: Zweijährige Pflanze der Linie M22-1c5 (Höhe ca. 7 cm).

FD 25

Die regenerative Kalluslinie FD 25 wird seit dem September 2002 in der Propagations- und Bewurzelungsphase geführt. Ihr haploider Zustand erwies sich bisher als sehr stabil. Sieben Kallusstücke, Blätter von 31 teils bewurzelten Sprossen, und Wurzeln zweier Pflanzen wurden auf ihre Ploidiestufe hin untersucht. Alle untersuchten Explantate der Kalluslinie erwiesen sich als haploid. Nach Auflegen von Blättern einer regenerierten FD 25 auf Regenerationsmedium wurden erneut Kallusse gebildet. Einer von drei dieser „Sekundärkallusse“ war nach durchflusscytometrischer Analyse diploid. Wie bei der Linie M22-1c5 wurde auch bei dieser Linie durch regelmäßige Ploidieüberprüfung die Erhaltung des haploiden Status gewährleistet. FD 25 ist somit eine haploide regenerative Kalluslinie, die im haploiden Zustand zur Pflanze regeneriert werden kann. Sie ließ sich gut auf WPM 367 als regenerativer Kallus mit kleinen Sprossen kultivieren und vermehren. Wie bei M22-1c5 regenerierten aus der Kalluslinie FD 25 auch Sprosse mit größeren und dunkelgrünen Blättern, die bisher als doppelhaploid identifiziert wurden. Im Gegensatz zu den doppelhaploiden wurde bisher bei haploiden Regeneraten weder *in vitro* noch in Erde ein fortgesetztes Längenwachstum des Sprosses festgestellt (Abb. 17). Die Überführung der

Doppelhaploiden in Erde bereitete keine Probleme, wogegen die haploiden Pflanzen nach einigen Wochen abstarben.



Abb. 17: Doppelhaploide (links) und haploide Pflanze der Linie FD 25

FD 83

Von den drei hier beschriebenen Linien wird die regenerative Kalluslinie FD 83 seit November 2002 in der Propagations- und anschließenden Bewurzelungsphase geführt. Bis August 2003 wurde ihr haploider Status vierzehnmal überprüft. Ein Kallusstück mit Spross, der später als erster seiner Linie in Erde überführt wurde, war doppelhaploid (Abb. 18). Die übrigen zwölf Messungen an Kallusabschnitten und Blättern zeigten die haploide Stufe. Hierunter fallen auch zwei weitere in Erde überführte Pflanzen. FD83 ließ sich als Kallus ähnlich gut wie M22-1c5 und FD25 propagieren. Ihre Kapazität zur Spross- und Wurzelbildung war jedoch bisher geringer als die der beiden anderen Linien.



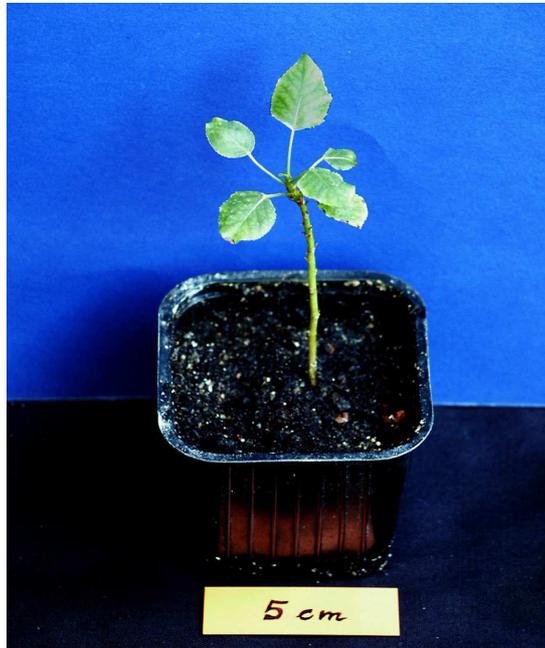
Abb. 18: Haploide (links) und doppelhaploide Pflanze der Linie FD 83

Doppelhaploide Pflanzen in Erde

Neben den haploiden und doppelhaploiden Regeneraten der haploiden Linien wurden zusätzlich fünf weitere Linien (FD6, FD10, FD17, FD19, FD27) in Erde überführt, die mit der Mikrosatellitenanalyse als doppelhaploid identifiziert wurden (Abb. 19).



FD 10: kurze Internodien



FD 17: kurze Internodien, Abwerfen alter Blätter



FD 19: rankender Wuchs



FD 27: schmal ovale, eingedrehte Blätter; sehr schwaches Längenwachstum

Abb. 19: Die doppelhaploiden Linien mit ihren Besonderheiten. Die Linie FD6 ähnelt im Phänotyp der Linie FD17.

3.4. Genetische Transformation haploider Pappeln

3.4.1. *Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer

Die haploiden regenerativen Kalluslinien M22-1c5 und FD25 wurden Transformationsexperimenten unterzogen. Es wurde das Verfahren der ‚Leaf-disc‘-Transformation angewendet, jedoch wurde zusätzlich zu Blatt- und Sprossabschnitten Kallusgewebe mit *Agrobacterien* co-kultiviert. Das Transgenkonstrukt enthielt neben dem Selektions-Gen *npt-II* und dem Reporter-Gen *rolC* das Transposon *Ac* aus Mais. Der Selektionsmarker codiert die Neomycin-Phosphotransferase II, ein kleines (25kD) bakterielles Enzym, welches die Phosphorylierung einiger Aminoglycosid-Antibiotika, unter anderen auch Kanamycin, katalysiert und sie dadurch inaktiviert. Ein Test an einigen Kallusstücken von M22-1c5 bestätigte die Toxizität der Konzentration von 50 mg Kanamycin pro Liter Medium. Die sowohl der Selektion als auch der Regeneration dienenden Medien WPM 368KC und WPM 367KC wurden direkt nach der Co-Kultur eingesetzt. Zwei Transformationsexperimente wurden jeweils an M22-1c5 und FD25 durchgeführt. Das für die Transformation eingesetzte Gewebe bestand aus drei bis fünf ca. 1 cm im Durchmesser großen Kallusstücken, die mehrfach geteilt wurden. Nach ca. 8-12 Wochen wurden kleine wachsende Kallusse von den abgestorbenen Geweben isoliert und auf den gleichen Medien weiterkultiviert, um einerseits die bereits eingesetzte Regeneration kleiner Kallusstücke fortzuführen und andererseits nicht-transgenes Gewebe, falls noch im Kallus vorhanden, abzutöten. Hierbei wurden 15 putativ transgene Linien erhalten (Tab. 19).

Tab. 19: Anzahl der Transformationsexperimente und erhaltener putativ transgener Linien.

Klon	Transformationsexperimente	Putativ transgene Kalluslinien
M22-1c5	2	5
FD 25	2	10

3.4.2. Transgennachweis durch PCR und Ploidiegrad transgener Linien

Vierzehn der 15 putativ transgenen Klone der Linien M22-1c5 und FD25 und zusätzlich eine nicht transgene Kontrolle („Aue 2“ oder FD25) wurden mittels PCR auf ihre Transgene *rolC* und *Ac* hin untersucht. Während unter den fünf putativ transgenen M22-1c5-Klonen nur in M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#1 die Transgene *rolC* und *Ac* amplifiziert wurden, wurden in acht von neun putativ transgenen FD25-Klonen *rolC* und *Ac*, und in einem nur *rolC* nachgewiesen (Abb. 20A, B). Die Ergebnisse sind in Tab. 20 zusammengefasst.

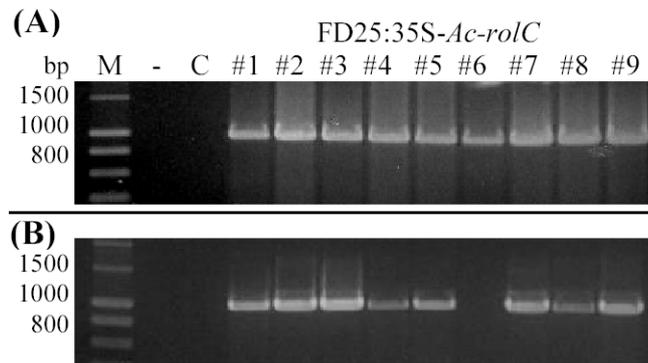


Abb. 20: Molekulare Analyse von FD25:35S-*Ac-rolC* transgenen haploiden regenerativen Kalluslinien. PCR-Amplifikation von *rolC* (A) und *Ac* (B). M = Molekularer Größenmarker. - = Wasserkontrolle ohne DNA. C = nicht-transgene FD25.

Tab. 20: Linien, die nach der Transformation auf Selektionsmedien regenerierten.

Klon	Ploidiestufe regenerierter Kalluslinie	PCR-Nachweis von <i>rolC</i>	PCR-Nachweis von <i>Ac</i>	Ploidiestufe regenerierter Pflanzen
M22-1c5:35S- <i>Ac-rolC</i> #1	1n	+	+	2n
M22-1c5:35S- <i>Ac-rolC</i> #2	2n	-	-	2n
M22-1c5:35S- <i>Ac-rolC</i> #3	2n	-	-	2n
M22-1c5:35S- <i>Ac-rolC</i> #4	2n	-	-	2n
M22-1c5:35S- <i>Ac-rolC</i> #5	2n	-	-	2n
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #1	1n (2n)*	+	+	n.v.
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #2	1n	+	+	1n
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #3	1n	+	+	1n
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #4	2n	+	+	n.v.
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #5	1n	+	+	n.v.
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #6	1n	+	-	n.v.
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #7	2n	+	+	n.v.
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #8	1n (2n)*	+	+	n.v.
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #9	1n (2n)*	+	+	n.v.
FD25:35S- <i>Ac-rolC</i> #10	2n	n.a.	n.a.	n.v.

n.a. = nicht analysiert

n.v. = zum Zeitpunkt der Ploidieanalyse nicht vorhanden

* kleiner diploider Peak

3.4.3. Transgennachweis durch Southern-Blot

In Southern-Blot-Analysen wurde die Integration des Markergens *roIC* im Genom der transformierten Regenerate M22-1c5:35S-*Ac-roIC*#1 und #2 untersucht. Die genomische DNA wurde sowohl mit *Eco* RI als auch mit *Hind* III restringiert, um die Kopienzahl des *roIC*-Gens zu bestimmen. Die Schnittstellen sind in Abb. 3 zu sehen. In M22-1c5:35S-*Ac-roIC*#1 wurde *roIC* gefunden, in M22-1c5:35S-*Ac-roIC*#2 nicht. Abb. 21 zeigt, dass sich in M22-1c5:35S-*Ac-roIC*#1 genau eine Kopie des *roIC* Gens befand.

3.4.4. Ploidieanalyse und Regeneration transgener Pflanzen

Die Ploidieanalyse enthüllte, dass M22-1c5:35S-*Ac-roIC*#1 und vier FD25:35S-*Ac-roIC* transgene regenerative Kalluslinien (#2, #3, #5, #6) haploid sind, andererseits vier M22-1c5:35S-*Ac-roIC* und drei FD25:35S-*Ac-roIC* transgene regenerative Kalluslinien doppelhaploid. Die durchflusscytometrische Messung dreier FD25:35S-*Ac-roIC* Transgene bildete zusätzlich zum haploiden Peak noch einen kleineren diploiden ab. In diesen Kalluslinien konnte kein rein haploides Gewebe entdeckt werden. Fünf M22-1c5:35S-*Ac-roIC*#1-Pflanzen (Abb. 22), drei FD25:35S-*Ac-roIC*#2 und zwei -#3-Pflanzen wurden bereits in Erde transferiert und durchflusscytometrisch gemessen. Die M22-1c5:35S-*Ac-roIC*#1-Pflanzen waren alle doppelhaploid, dagegen waren die fünf Pflanzen, die aus transformiertem FD25-Gewebe hervorgingen, haploid. Eine Aktivität des *Ac*-Elementes, die die Bildung hellgrüner Blattsegmente hervorrufen würde, wurde bisher an Pflanzen dieser Linie nicht beobachtet.

An einem Kallusabschnitt der Linie M22-1c5:35S-*Ac-roIC*#1 bildete sich eine haploide Sprossvariante aus, deren Spross und Blätter deutlich kleiner waren als die typischen kleinen haploiden Sprosse von M22-1c5 (Abb. 23). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten an der Sprossvariante keine molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt werden.

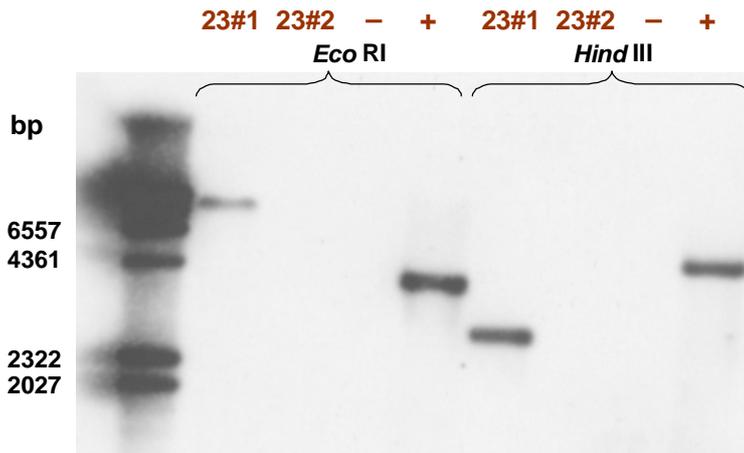


Abb. 21: Southern-Blot-Analyse der Regenerate M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#1 und M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#2. Die Hybridisierung erfolgte gegen eine DIG-Oxygenin-markierte *rolC*-Gensonde nach einer Restriktion mit den Enzymen *Eco* RI, *Hind* III *Eco* RV und *Nco* I. **23#1** Transformierte Linie M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#1 **23#2** Transformierte Linie M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#2; + positive Pappelkontrolle Esch5:35S-*rolC*#1; – negative Pappelkontrolle ‚Aue 2‘.

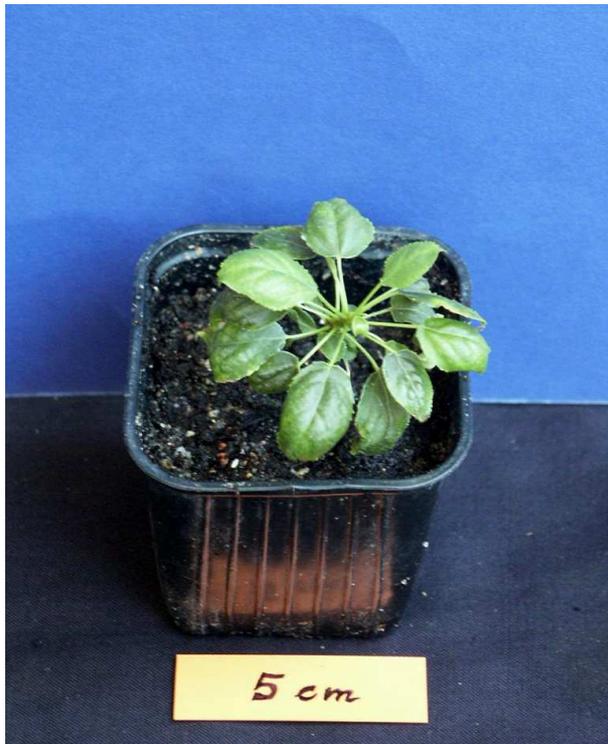


Abb. 22: M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#1, transgene Pflanze.



Abb. 23: M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#1. **Unten:** Typischer regenerativer Kallus. **Oben:** Variante mit kleinen Sprossen und Blättern. (beide ca. 1 cm breit).

4. Diskussion

Mit der hier vorgelegten Arbeit wurde ein *in vitro*-Regenerationssystem aus isoliertem unreifen Pollen in der Gattung *Populus* etabliert, welches eine vielversprechende Alternative zur Antherenkultur für die Generierung von haploidem und doppelhaploidem Pflanzenmaterial in der Forstbiotechnologie bietet.

Des Weiteren wurden durch die erfolgreiche Transformation haploiden Gewebes mit anschließender Regeneration transgener haploider Sprosse die ersten Schritte hin zu einem Transposon-Tagging-Ansatz vollzogen, der die Isolierung durch T-DNA- oder Transposon-getroffener Gene ermöglichen soll. Der Transposon-Tagging-Ansatz wird bezüglich seiner benötigten Voraussetzungen und Umsetzbarkeit zur Genisolierung und Gencharakterisierung diskutiert. Ein etabliertes Transposon-Tagging-System hätte eine große Bedeutung in der zukünftigen forstlichen Genomforschung.

4.1. Etablierung eines Regenerationssystems aus isolierten unreifen Pappelpollen

Genotyp

Die Antherenkulturforschung bei Getreide und Futtergräsern war durch sporadische und unvorhersehbare Ergebnisse charakterisiert, was sich erst mit der Identifizierung hoch responsiver Donor genotypen änderte (Andersen *et al.* 1991). Durch sexuelle Hybridisierung und eine nachfolgende Selektion konnten bei Gräsern Gene akkumuliert werden, die eine Mikrosporen-Embryogenese favorisierten (Halberg *et al.* 1990).

Eine sexuelle Hybridisierung und anschließende Selektion ist im Falle diözischer Arten wie den Pappeln nicht möglich, so dass Baldursson und Ahuja (1996b) in ihrem Review über Haploidie bei Forstpflanzen umfangreiche Genotypentests als einzig praktische Herangehensweise vorschlugen, um einen für systematische Experimente einsetzbaren Klon zu identifizieren. Trotz einiger Ansätze, in denen mehrere Genotypen gleichzeitig in Antherenkulturen verwendet wurden und Rückschlüsse auf ihre Responsivität zuließen (Ho und Raj 1985, Baldursson *et al.* 1993, Mofidabadi *et al.* 1995), wurde nur von einer wiederholten Nutzung eines responsiven Donorbaumes für die Erzeugung haploider Pflanzen berichtet. Stoehr und Zsuffa (1990a) setzten für ihre Studien den *P. maximowiczii*-Klon MD-1 ein, der sich zuvor in Untersuchungen von Ho und Raj (1985) als responsiv herausgestellt hatte. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die lange Reife zur Blühfähigkeit von vegetativ vermehrten Pappeln (4-10 Jahre) eine entsprechend lange Vorbereitungszeit anderer Forschungsgruppen erfordert, um diese responsiven Donorpflanzen bei sich einzusetzen.

Für die vorliegende Studie konnte leider nicht auf einen bereits beschriebenen responsiven Klon zurückgegriffen werden. Die eigene Voruntersuchung an sechs Genotypen erbrachte mit ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ zwei Bäume, deren unreife Pollenzellen in der Pollenkultur Mikrokallusse bildeten. Auch die Balsampappel brachte zwei Mikrokallusse hervor, während Kulturen der beiden Zitterpappelklone SU115 und Esch14 unter der Kontamination mit Bakterien und Pilzen litten und damit einer Feststellung ihres genetischen Potenzials zur Androgenese nicht zugänglich waren. Fortlaufend wurden somit nur Kätzchen der beiden Bäume ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ in den Experimenten eingesetzt, was mit zwei Vorteilen einher ging: Erstens existierte *in vitro* von ‚Aue 2‘ bereits ein Klon, der bezüglich Phänotyp, Wüchsigkeit und in-Erde-Überführung als Kontrolle genutzt werden konnte. Zweitens bestand so die Möglichkeit, die gewonnenen Ergebnisse mit einer Antherenkultur von ‚Aue 2‘ (Deutsch *et al.* 2003) zu vergleichen.

Die Mikrosatellitenanalyse, die zur Bestimmung des haploiden Ursprungs diploider Regenerate aus unreifen Pollenzellen der Schwarzpappelhybride eingesetzt wurde, ließ aufgrund gleicher Allele an den fünf untersuchten SSR-Loci vermuten, dass die beiden Donorbäume ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ zu einem Klon gehören.

Gleichfalls deutete die Mikrosatellitenanalyse an, dass auch bei Pappeln die Embryogenese aus unreifen Pollenzellen zu einem Teil genetisch bestimmt ist. Die Untersuchung der Allelverteilung bei 68 homozygoten Kallussen mittels der Chi-Quadrat-Einfachanordnung ergab, dass am Locus WPMS 9 die Allelverteilung signifikant von einer 1:1-Segregation verschieden ist (51:17). Die Pollen mit dem Allel 1 regenerierten besser als die mit dem Allel 2. Demnach stellt der SSR-Locus WPMS 9 einen potenziellen Marker für das Regenerationspotential der Donorbäume ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ dar. Möglicherweise markiert WPMS 9 einen Chromosomenabschnitt, der generell einen großen Einfluss auf die Regeneration bei *Populus* besitzt. Auch die schiefe Allelverteilung der zwei SSR-Loci WPMS 14 und WPMS 18 liegen beiderseits dicht an der Signifikanzschwelle von 5%. Ein größerer Probenumfang wäre nötig gewesen, um zu klären, ob sich auch hier die Allelverteilung tatsächlich von der 1:1-Segregation unterscheiden und diese beiden Mikrosatelliten ebenfalls einen genetischen Einfluß auf die Kallusbildung oder Regeneration aufzeigen.

Isolation und Kultur unreifer Pollen

Die unreifen Pollenzellen wurden aus geviertelten Kätzchen isoliert. Dabei wurden zwei verschiedene Aufreinigungen der Zellsuspensionen eingesetzt. Die im zweiten Jahr eingeführte Siebwaschung war schneller durchzuführen als die vorher verwendete

Zentrifugation und entfernte zudem kleine Zellreste, was die Beobachtung der unreifen Pollenzellen verbesserte. Sie ist somit die zu bevorzugende Methode, wenn die vitalen Pollenzellen nicht vom Rest der Kätzchenzerkleinerung mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation getrennt werden können. Diese Methode wurde auch zur Mikrosporenisolation bei *Malus* (Höfer *et al.* 1999) erfolgreich eingesetzt. Dabei wurde ebenfalls festgestellt, dass die Pollenentwicklung in den eingesetzten Antheren unterschiedlich weit fortgeschritten war. Auch Bueno *et al.* (1997) berichteten für Antheren von *Quercus suber* eine asynchrone Pollenentwicklung. Da auch in der vorliegenden Arbeit die unterschiedlichen Pollenentwicklungsstadien nicht getrennt werden konnten, war über das geeignete Stadium zur Induktion der Androgenese keine Aussage möglich.

Bei Pflanzengattungen wie Raps, Tabak, Gerste, Weizen und Reis sind Pollenkulturen etabliert und fortlaufend Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. In vielen Protokollen dieser Pollenkulturen wird eine Stressbehandlung zur Induktion und/oder zur Förderung der androgenetischen Entwicklung empfohlen (zusammengefasst bei Reynolds 1997, Pechan und Smykal 2001). Meist handelt es sich hierbei um Vorbehandlungen, d.h. die Mikrosporen oder der unreife Pollen werden erst nach der Behandlung aus den Antheren isoliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden eine Kaltlagerung der Kätzchen vor der Isolation und eine Hungerbehandlung und/oder eine Wärmebehandlung an isolierten unreifen Pollenzellen als Stressfaktoren eingesetzt. Während der Kaltlagerung ist es unwahrscheinlich, dass Kälte in Form eines Schocks auf Pappelpollen wirkt. Pappelblüten reifen in Mitteleuropa um den Frühlingsanfang und ca. zwei Wochen vor Blattaustrieb heran (Lefèvre *et al.* 2001). In dieser Zeit sind kalte Temperaturen und Fröste von Natur aus gegeben und stören nicht die gametophytische Entwicklung. Allerdings könnte die Kombination einer starken Verlangsamung der Pollenentwicklung mit einer gleichzeitigen Begrenzung der Nährstoffversorgung des Kätzchens, wie es bei einer Kaltlagerung isolierter Kätzchen vorliegt, durchaus ein Faktor zur Induktion der androgenetischen Entwicklung sein. Die erhobenen Daten dieser Pollenkultur ergaben keine Korrelation zwischen der Kaltlagerung der Kätzchen und der Kallusausbeute. Die stark streuenden Kallusausbeuten je Kätzchen und die Tatsache, dass die Kulturen der Hälfte aller prozessierten Knospen keine Kallusse bildeten, gleich, ob eine kurze oder lange Kaltlagerung voranging, zeigen, dass für ein statistisch abgesichertes Ergebnis ein größerer Probenumfang nötig gewesen wäre. Stoehr und Zsuffa (1990a) setzten eine 4-tägige Kaltlagerung (4°C) von Kätzchen an Zweigen von *P. maximowiczii* einer erfolgreichen Antherenkultur voran, deren Einfluss auf die Embryogenese mangels Vergleichsmöglichkeiten unklar blieb.

Während die Ergebnisse zur Kaltlagerung auf unterschiedlichen Kätzchen basierten, war dagegen der Vergleich verschiedener Initialbehandlungen an Populationen unreifer Pollenzellen, isoliert aus acht Kätzchen, kätzchenunabhängig. Denn für jede der drei Initialbehandlungen und der nicht behandelten Kontrolle wurde jeweils ein Viertel der Pollenpopulation eines Kätzchens eingesetzt. Sowohl Wärme- als auch Hungerbehandlung, vor allem die Kombination der beiden, erhöhten die Kallusausbeuten. Allerdings war die Erhöhung der Ausbeute nur für die Kulturen mit Wärmebehandlung und mit kombinierter Wärme- und Hungerbehandlung signifikant. Dies weist darauf hin, dass für den Stichprobenumfang die Streuung innerhalb der Werte zu groß war, als dass dieses Ergebnis verallgemeinert werden darf. Eine Tendenz, wonach eine Wärmebehandlung bzw. eine kombinierte Hunger- und Wärmebehandlung die Induktionsrate von Kallussen erhöht, ist jedoch ersichtlich und reiht sich in die Ergebnisse von Mikrosporenkulturen bei Raps (Cordewener *et al.* 1998) bzw. Tabak ein (Touraev *et al.* 1996a). Auch bei Weizen wurde dieser Zusammenhang gefunden (Touraev *et al.* 1996b, Hönicka 2002). Jedoch wurde auch festgestellt, dass eine kombinierte Hunger- und Wärmebehandlung verstärkt albine Weizenpflanzen hervorbringt (Hönicka 2002), was so weit führte, dass das eigentlich zu erreichende Ziel – die Produktion möglichst vieler grüner Pflanzen – ins Negative umgekehrt wurde. Eine Problematik, die bei Pappeln nicht besteht.

In vielen Protokollen von Antherenkulturen für Forstpflanzen sind (Vor-) Behandlungen der Antheren nicht erwähnt (Ho and Raj 1985, Chen 1987, Baldursson *et al.* 1993, Mofidabadi *et al.* 1995), folglich war eine besondere Behandlung vor oder während der Antherenkultur bei Pappel nicht zwingend. Auch bei Getreide kann eine Antherenkultur im Gegensatz zur Kultur isolierter Pollen ohne vorherige Stressbehandlung gelingen (Kumlehn, pers. Mitteilung).

Eine plausible Erklärung hierfür könnte sein, dass sich bei kultivierten Antheren zunächst eine Phase reduzierter Nährstoffversorgung ergibt, bis die Nährstoffe aus dem Medium den Pollen erreichen. Einen ähnlichen Hungeraspekt wird der Verwendung von Maltose im Kulturmedium zugesprochen (Indrianto *et al.* 1999). In planta wird der unreife Pollen gut mit Saccharose versorgt. Ehe der Pollen nach der Isolation seine Kohlenhydrat-Ernährung auf Maltose umgestellt hat, ergibt sich eine Hungerphase. Dies entspricht der gleichfalls kallusinduzierenden Kulturkondition ‚26°C‘ (Kontrollkondition ohne Initialbehandlung) im vorliegenden Vergleich unterschiedlicher Initialbehandlungen.

Unter den wenigen, die auf eine Vorbehandlung bei *Populus* hinwiesen, waren es Baldursson und Ahuja (1996b), die berichteten, dass eine Inokulation von *P. trichocarpa*-Antheren bei 32°C für 24-72 h vorteilhaft ist. Für eine andere Baumart, die Korkeiche

(*Quercus suber*), unterstrichen Bueno *et al.* (1997) die positive Wirkung einer Wärmebehandlung auf die Embryogenese in der Antherenkultur. Erst durch eine initiale Wärmebehandlung von 33°C über fünf Tage wurde eine Embryogenese induziert. In der meines Wissens nach bisher einzigen Pollenkultur bei Bäumen, die Pflanzen hervorbrachte, bei *Malus domestica* Borkh., wurden Hunger und Wärme als Stressfaktoren eingesetzt (Höfer *et al.* 1999). Die beiden erhaltenen Regenerate waren diploid (Höfer, pers. Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur die Kallusausbeute insgesamt ins Verhältnis zur Initialbehandlung gesetzt, sondern auch die Gesamtanzahl erhaltener regenerativer Kallusse bzw. haploider regenerativer Kallusse (3.2.1). Hier zeigte sich sehr deutlich, dass die Überführung ins Induktionsmedium ohne Wärme- bzw. Hungerstress die meisten haploiden Regenerate hervorbrachte. Somit regenerierten trotz geringerer Kallusausbeute mehr Haploide aus den Populationen unbehandelter unreifer Pollenzellen als aus den stressbehandelten Populationen. Ein entsprechendes Ergebnis wurde ebenfalls von Hönicka (2002) in Behandlungsexperimenten mit Weizenmikrosporen berichtet. Er stellte fest, dass 19 von 20 Pflanzen, hervorgegangen aus unbehandelten Mikrosporenkulturen, haploid waren, während Pflanzen, hervorgegangen aus kälte-, wärme- und hungerbehandelten Kulturen, höchsten zur Hälfte noch haploid waren. Hier regte insbesondere die Wärmebehandlung die Diploidisierung an (27 von 41 Pflanzen waren diploid).

Kulturmedien und Wachstumsregulatoren

Isolierte unreife Pollen bzw. Mikrosporen werden üblicherweise in flüssigen Medien kultiviert, z.B. bei Raps (Lionneton *et al.* 2001), Gerste (Castillo *et al.* 2001), Mais (Obert *et al.* 2000), Reis (Guo and Pulli 2000) oder Weizen (Liu *et al.* 2002). Demgegenüber bieten feste Medien schlechtere Voraussetzungen für eine Embryogenese (Jähne *et al.* 1994, Hönicka 2002). Für die vorliegende Arbeit wurde eine Isolationsmethode mit anschließender Flüssigkultur im Labor etabliert. Hierbei wurden unter Verwendung des Induktionsmediums K99-B4-CAx mit vorgeschalteter Hungerphase erste Zellteilungen erkannt, so dass bereits im Jahre 2001 nach der Einführung der Methode und einem sicheren Händeln der einzelnen Isolations- und Kulturschritte die ersten Experimente aufgenommen wurden. Weitere Medien wurden nicht getestet. Da in Pappelantherenkulturen hauptsächlich MS als Basis des Induktionsmediums eingesetzt wurde (Übersicht in Baldursson und Ahuja 1996b), ist eine vergleichende Untersuchung dieser beiden Medien für weitere Isolationen empfehlenswert. Das Medium K99 unterscheidet sich vom MS-Medium im Wesentlichen durch einen zwanzigfach geringeren Ammoniumnitratgehalt und ein größeres Vitaminspektrum.

Gleichfalls wäre ein Vergleich von Wachstumsregulatoren hinsichtlich der Induktionsrate aufschlussreich. Insbesondere die meist in Pappelantherenkulturen eingesetzten Wachstumsregulatoren 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Kinetin sollten mit den in dieser Studie verwendeten Wachstumsregulatoren NAA und BAP verglichen werden.

Im Jahre 2001 wurde das Cytokinin BAP (4 μM) allein dem Induktionsmedium zugesetzt und erwirkte eine Embryogenese unreifer Pollenzellen. Die fortgeführte Kultur auf wachstumsregulatorfreiem Medium war jedoch erfolglos. Nur unter Zusatz von Auxin (NAA) und Cytokinin (BAP) war es möglich, die Regeneration über Organogenese fortzuführen. Dieses Ergebnis bestätigt Baldursson *et al.* (1993), bei denen eine Embryogenese aus unreifen Pappelpollen (*P. trichcarpa*, *P. maximowiczii*) auch auf wachstumsregulatorfreiem Medium (WPM) abbrach. Sie folgerten, dass eine Embryogenese bei Pappeln von exogenen Wachstumsregulatoren relativ unabhängig ist und dass mit geringen Mengen an Wachstumsregulatoren ausreichend Embryonen erzeugt werden könnten, ohne die unerwünschte somatische Kallusbildung aus Antherenwänden anzuregen. Eine Problematik, auf die später (Kap. 4.4) noch eingegangen werden wird.

Induktionsrate

Wenn über ein Regenerationssystem berichtet wird, ist es üblich, eine Induktionsrate in Prozent anzugeben. Dabei ist es üblich, sich auf die Anzahl inokulierter Antheren zu beziehen. Leider gibt es für die Kallusinduktion keinen Standard. Bei Pappelantherenkulturen wird z.B. die Anzahl der Kallusse nach verschiedenen Zeiten bestimmt. Die Zeiten reichen von 3 Wochen (Kiss *et al.* 2001) bis zu 3 Monaten (Ewald *et al.* 1991) nach Aufsetzen der Antheren. Teilweise wird überhaupt kein Zeitpunkt der Auswertung benannt (Stoehr und Zsuffa 1990a). In allen Fällen ist die Zählung der erhaltenen Kallusse oder Embryonen zeitabhängig und das Produkt nicht genau definiert. In der vorliegenden Arbeit wurde als Verhältnisgröße „Anzahl der Kallusse mit einem Mindestdurchmesser von 1 mm pro responsives Kätzchen“ eingeführt. Diese Verhältnisgröße ist von einem Zeitpunkt und somit von der Geschwindigkeit der Kallusentwicklung unabhängig. Zusätzlich stellte der gewählte Mindestdurchmesser von 1 mm einen Bezug zur Kulturführung her. Er erfasste genau die Kallusse, die vom Flüssig- auf ein Festmedium überführt und weiterkultiviert wurden. Dies führte dazu, dass allerlei kleinere Kallusse, deren Wachstum aufgehört hatte, nicht in die Zählung einbezogen werden.

Im Jahr 2001 wurden 112 Kallusse und im Jahre 2002 1375 Kallusse mit einem Mindestdurchmesser von 1 mm umgesetzt. Die zugehörigen Induktionsraten sind 19 bzw. 72

Kallusse pro responsives Kätzchen. Allerdings war der Probenumfang (6 und 19 responsive Kätzchen) im Verhältnis zur hohen Variation der Ausbeute je responsives Kätzchen (2 bis 296 Kallusse) zu gering, als dass die ersichtlichen Unterschiede zwischen den Kulturzeiträumen statistisch bestätigt wurden. Nichtsdestotrotz deutet das Ergebnis an, dass ein dem Medium zugesetztes Auxin, wie im Jahre 2002 geschehen, für die Kallusinduktion förderlich ist.

Weder die Vitalitätsrate noch die Populationsdichte unreifer Pollenzellen nach deren Isolation korrelierten mit den Kallusausbeuten der responsiven Kätzchen. Die Populationsdichte lag dabei im Bereich zwischen 10^5 und 10^6 unreife Pollenzellen pro ml. Einige wenige Ansätze mit Populationsdichten von 10^3 bis 10^4 brachten keine Kallusse hervor, wohingegen die 1000-fach dichteren Ursprungspopulationen Kallusse regenerierten (unveröffentlichte Daten). Hönicka (2002) beschrieb zwar für Weizen, dass die Regenerationsrate einer geringen Populationsdichte von 75 bis 600 Mikrosporen pro ml gegenüber einer üblichen Dichte von 20000 Mikrosporen pro ml ungefähr doppelt bis dreimal so hoch lag, mit der Tendenz, je geringer die Dichte desto höher die Regenerationsrate. Da die Weizenpollen jedoch mit unreifen Fruchtknoten co-kultiviert wurden, handelt es sich in diesem Fall nicht um einen unabhängigen Populationseffekt.

Allgemein ist bemerkenswert, dass ungefähr die Hälfte der prozessierten Kätzchen nicht responsiv waren. Die Populationen unreifer Pollenzellen dieser Kätzchen waren nicht von denen der responsiven Kätzchen zu unterscheiden. Hinsichtlich der aufgezeichneten Parameter Populationsdichte, Vitalitätsrate und Kätzchenkaltlagerung wurden gleichfalls keine Unterschiede festgestellt. Selbst wenn Fehler bzw. leichte Veränderungen, die die Pollenzellen inaktivierten wie z.B. keine Kühlung oder unterschiedliche Arbeitspausen während des Isolationsprozesses, berücksichtigt werden, hätte dieses nicht zu einem so hohen Anteil nicht-responsiver Kätzchen führen dürfen. Eine kätzchenabhängige Komponente, die die Regenerationsfähigkeit unreifer Pollenzellen beeinflusst, muss hier angenommen werden und sollte in zukünftigen Studien näher untersucht werden. Z.B. wäre es hilfreich Merkmale zu definieren, die ein Kätzchen und dessen Pollenpopulation detailliert beschreiben, außerdem die Kätzchenposition am Zweig und den Zweig selbst zu bonitieren, die Kätzchenernte und das Isolationsverfahren zeitlich zu normieren etc. .

Pflanzenregeneration

In Tab. 9 ist ersichtlich, dass neben der Kallusinduktion insbesondere der letzte Regenerationsschritt, die Ausbildung längerer Sprosse und deren Bewurzelung, eine hohe Hürde in der Pflanzenregeneration darstellte, auch wenn bei diesen Daten berücksichtigt werden muss, dass im Jahre 2002 nur knapp die Hälfte der sich differenzierenden Kallusse weiterkultiviert wurden. Formten im Jahre 2002 noch 17% der erhaltenen Kallusse Organe aus, so entwickelten sich *in vitro* nur 1% der Kallusse zu ganzen Pflanzen. Diese Regenerationsrate entspricht der Regenerationsrate mehrjähriger Experimente von Kiss *et al.* (2001), die die Arbeiten von Mofidabadi *et al.* (1995) fortgesetzt hatten. Die Autoren berichteten, dass bei einer Antherenkultur dreier *P. nigra*-Klone insgesamt 208 Pflanzenlinien aus 23183 acht Wochen alten Kallussen regenerierten. Das ergab eine Regenerationsrate von 0,9% bzw. von 0,1%, 0,7% und 3,7% je Klon. Hierbei waren acht der 208 Linien haploid.

In einer Antherenkultur mit 4000 Antheren von ‚Aue 2‘ im Jahre 2000 (Deutsch *et al.* 2003) bildeten viele Antheren einen Kallus, jedoch ging insgesamt nur ein diploides Regenerat aus ihnen hervor. Ein Vergleich mit der vorliegenden Pollenkultur ist trotz gleichen Genotyps nur bedingt zulässig, da zu einer anderen Zeit und mit anderen Medien experimentiert wurde. Ansonsten ist generell die Leistungsfähigkeit der Regenerationsprotokolle bei Pappeln schwerlich zu vergleichen, weil die Daten in der Literatur auf unterschiedlichen Genotypen basieren. Zusätzlich wurden Begriffe wie ‚Regenerationsfrequenz‘ bzw. ‚kallusproduzierende Anthere‘ [%] bezüglich der Größe oder des Entwicklungsstatus‘ der Kallusse unterschiedlich verwendet.

Die in diesen Experimenten haploid generierten und später spontan diploidisierten Klone weisen zwar einen sehr kleinen und untypischen Pappelphänotyp auf, jedoch ist dieser Phänotyp stabil und kann in einem Vergleich als Kontrolltyp eingesetzt werden. Vielleicht wird sich die Kleinwüchsigkeit als ein Vorteil in der Kulturführung erweisen. Kleine Pflanzen beanspruchen in Klimakammern und Gewächshäusern deutlich weniger Platz, so dass für einen systematischen Tagging-Ansatz mehr Pflanzen regeneriert und kultiviert werden können.

Ploidieanalyse

Blackburn und Harrison (1924) benannten zum ersten Mal die Chromosomenzahl von *P. nigra* in diploidem Zustand mit $2n = 38$. Generell sind die Chromosomen einer Pappel wegen ihrer geringen Größe in Metaphaseplatten nicht einfach zu zählen, geschweige in eine

Ebene für eine gute Fotografie zu bringen (Fotografien, auf der die Chromosomen zählbar sind, findet man in Gallego *et al.* (1987)). Sogar gravierende Bestimmungsfehler wurden von Stettler und Bawa (1971) diskutiert. Sie nahmen an, dass das Bild eines haploiden Chromosomensatzes in Kopeczky (1960) deutlich einen diploiden Chromosomensatz darstellt, dessen Chromosomen sich nicht klar getrennt hätten. Folglich war die mikroskopische Bestimmung in größerem Umfang bzw. eine saubere Differenzierung zwischen haploid, aneuploid, mixoploid und diploid schwierig und äußerst zeitaufwendig. Hier hat seit den 90er Jahren die Durchflusscytometrie Abhilfe geschaffen und sich als schnelle und genaue Messmethode etabliert. Sie vermag den DNA-Gehalt tausender Zellkerne einer präparierten Gewebeprobe innerhalb weniger Minuten zu erfassen. Es gibt zwei verbreitete DNA-Farbstoffe, die für die Flowcytometrie eingesetzt werden: Das Fluorochrom DAPI, das in AT-reiche Regionen der DNA interkaliert und den Intercalator Propidiumiodid. Die DAPI-Färbemethode ist einfacher und schneller durchzuführen als die Propidiumiodid-Färbemethode, welche ihrerseits exaktere DNA-Gehalte bestimmt, wie ein Methodenvergleich von Doležel *et al.* (1998) demonstrierte. Für eine relative Bestimmung, wie im vorliegenden Fall die Bestimmung des Verhältnisses der Ploidiestufe untersuchter Proben zum diploiden Standard derselben Pflanzenart, ist die DAPI basierende Färbung vorzüglich einsetzbar.

Um haploide regenerative Kallusse zu erzeugen und ihre Ploidiestufe zu erhalten, galt es, entsprechend frühzeitig die Ploidiestufe zu analysieren. Anhand 103 untersuchter Kallusse, stellte sich heraus, dass nur 18% von ihnen zu diesem frühen Zeitpunkt haploid waren. Ein Kallus zeigte gleichzeitig einen haploiden und einen diploiden Peak, was auf eine Diploidisierung hinweisen könnte. Vorausgesetzt, dass die untersuchten Kallusse haploiden unreifen Pollen entsprungen waren, mussten sich ihre Chromosomensätze sehr früh, vermutlich innerhalb der ersten Zellteilungen, verdoppelt haben. Flowcytometrisch nachgewiesen diploidisierten sieben der 18 haploiden Kallusse innerhalb von 4-16 Wochen in einem Ausmaß, dass ihr haploider Anteil nicht mehr detektiert wurde. Bis auf die Linie FD25 neigten alle haploiden Linien mehr oder weniger dazu, diploides Gewebe zu bilden, welches oft die Basis für eine Sprossbildung war.

Zusätzlich wurden eine triploide und fünf tetraploide Kalluslinien entdeckt, die jedoch keine Sprosse formten. Bei der haploiden regenerativen Kalluslinie M22-1c5 wurde im Laufe der Kultur außerdem triploides und tetraploides Gewebe gefunden. Einerseits begünstigte sicherlich eine relativ hohe Anzahl von mehr als 80 Plodiemessungen über einen langen Zeitraum von 20 Monaten das Aufspüren der Polyploidisierung in dieser Kalluslinie. Andererseits wurde in cytogenetischen und molekularbiologischen Studien über somaklonale

Variationen während der somatischen Embryogenese von Laub- und Nadelbäumen (Son *et al.* 1993, DeVerno 1995, Nkongolo und Klimazewska 1995, Isabel *et al.* 1996, Fourré *et al.* 1997, Roth *et al.* 1997, Ahuja 1998, Endemann *et al.* 2001) eine veränderte Chromosomenzahl und die Autopolyploidisierung als chromosomale Veränderungen am häufigsten erwähnt.

In der vorliegenden Studie erwiesen sich *in vitro*-Pflanzen von zwei der 7 haploiden regenerativen Kalluslinien als haploid. Diese Zahlen bestätigen das von Baldursson und Ahuja (1996a, b) zusammengefasste Ergebnis mehrerer Arbeiten, wonach die Generierung haploider Pappelpflanzen nur wenig effizient war. Dort, wo auch über die Entwicklung von Haploiden *ex vitro* berichtet wurde (Illies 1976, Wu und Nagarajan 1990, Baldursson *et al.* 1993, Kiss *et al.* 2001), starben haploide Pappeln entweder ab oder diploidisierten. Dies deutet an, warum eine Recherche von Fladung (pers. Mitt.) nach haploiden Pappeln keinen Erfolg hatte und warum für diese Arbeit gefordert wurde, nicht nur haploide Pappeln respektive haploide regenerative Kallusse für Transformationszwecke zu erzeugen, sondern sie und ihren haploiden Status auch in einer *in-vitro* Kultur langfristig zu erhalten.

Für die eingesetzten Pappeldonortypen und sicherlich auch als Orientierung für andere Pappel-Genotypen und Pappelarten lässt sich folgendes **Zwischenergebnis** festhalten:

Die hier vorgelegte Pollenkultur ist eine vielversprechende Alternative zur Antherenkultur im Modellbaum *Populus*. Sie hat die Vorteile, die gametophytische und androgenetische Pollenentwicklung beobachten zu können, frühzeitig die Responsivität eines Genotyps erkennen zu lassen und die Regeneration somatischen Gewebes weitgehend auszuschließen. Mit Blick auf eine langfristige Kultur haploider regenerativer Pappellinien sollte zu deren Erzeugung keine spezielle Behandlung vor und während der Kultur angewendet werden. Eine Behandlung hingegen sollte erfolgen, wenn eine höhere Ausbeute doppelhaploider Regenerate erwünscht ist. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen tendieren in diesem Fall zu einer kombinierten Initialbehandlung von Wärme und Hunger.

In dieser Kultur bildeten sich drei haploide regenerative Kalluslinien, aus denen auch haploide Pflanzen regenerierten. Sie sind klein, schwachwüchsig und in ihrem Habitus pappeluntypisch.

4.2. Bestätigung des haploiden Ursprungs

In Antheren- und Mikrosporenkulturen bei Kulturpflanzen wie Weizen, Reis, Gerste, Tabak oder Tomate werden diploide Regenerate als Doppelhaploide bezeichnet, obgleich sie nicht auf einen haploiden Ursprung hin untersucht wurden. Selbst wenn die Regeneration somatischer Zellen, z. B. in Mikrosporenkulturen, aufgrund einer vollständigen Mikrosporenisolation ausgeschlossen werden kann, bleiben doch einige Optionen wie unreduzierte Mikrosporen, chromosomale Rekonstitutionen (rearrangements) oder zusammengewachsene Kallusse zweier unreifer Pollenzellen (Chimäre), die eine Regeneration von heterozygoten Diploiden, also Nicht-Doppelhaploiden, bewirken können.

Regenerationssysteme zur Produktion Haploider in der Forstbiotechnologie brachten meist Diploide hervor, nur wenige haploide Pflanzen wurden regeneriert (Baldursson und Ahuja 1996b). Die Bestimmung der Ploidiestufen in dieser Studie bekräftigte erneut diesen Sachverhalt. Über 80% regenerativer Kallusse besaßen ein Vielfaches des einfachen Chromosomensatzes, so dass unklar war, ob deren Ursprung in haploiden Pollenzellen lag.

Ab Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden Regenerate von Antherenkulturen bei Bäumen mittels Isoenzymanalysen untersucht (Stoehr und Zsuffa 1990b (*Populus*), Müller-Starck und Jörgensen 1991 (*Quercus*), Baldursson *et al.* 1993 (*Populus*)), um die Frage nach dem haploiden Ursprung bzw. dem doppelhaploiden Status der Regenerate zu beantworten. Vor der Einführung der Isoenzymanalyse existierte keine Methode, die eine Diskriminierung zwischen homozygoten Doppelhaploiden und heterozygoten Diploiden erlaubte. Mittlerweile entwickelten sich Mikrosatelliten (SSR) zu einem eleganten Werkzeug für individuelle Identifizierungen, Vaterschaftsanalysen, Genomkartierungen und viele weitere Anwendungen (Vendramin *et al.* 2003). Sie sind nicht nur aufgrund ihres höheren Polymorphismus den Allozymen als Marker überlegen, sondern auch wegen des geringeren Materialeinsatzes, was eine frühzeitigere Analyse im *in vitro*-Regenerationsprozess ermöglicht. Mikrosatelliten wurden in den letzten Jahren erfolgreich bei Eiche und Obstgehölzen zum Nachweis des haploiden Ursprungs genutzt. Gomez *et al.* (2001) setzten 3 SSR-Marker bei *Quercus suber* ein. Höfer *et al.* (2002) testeten sechs Mikrosatelliten bei *Malus*, von denen zwei für eine Homozygotiebewertung geeignet waren. Bouvier *et al.* (2002) prüften 20 Mikrosatelliten bei drei Genotypen von *Pyrus*; vier bis sechs SSR-Marker je Genotyp spiegelten die Heterozygotie der Donorpflanze wieder.

In der vorliegenden Studie erwiesen sich fünf der sieben untersuchten SSR-Loci (WPMS 9, 13, 14, 18, 20, entwickelt aus *Populus nigra* (Van der Schoot *et al.* 2000, Smulders *et al.* 2001)) bei den Donorgenotypen ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ als polymorph und damit als geeignete Genorte zur Überprüfung auf Homozygotie. Diese fünf SSR-Loci waren bei 68 von 77 analysierten Kallussen durchgehend homozygot, wobei ein Kallus am Mikrosatellitenort WPMS 20 überhaupt kein Allel aufwies. Für diese 68 Kallusse konnte ein haploider Ursprung angenommen werden, obgleich nicht alle 19 Chromosomen mit diesen Markern abgedeckt wurden. Unter der Annahme, dass sich die Meiosen in den Pollenmutterzellen regulär vollzogen, wäre ein Marker allein für eine Aussage zur haploiden Herkunft ausreichend gewesen. Der Einsatz mehrerer co-dominanter SSR-Marker (hier fünf) erlaubt auch irreguläre Meiose-Ereignisse zu erfassen. Die Mikrosatellitenanalyse enthüllte so ein Nullallel am SSR-Locus WPMS 20 von einem diploiden Kallus, d.h. wahrscheinlich konnte ein Allel aufgrund einer Mutation in einer Zielfrequenz für die PCR-Primer nicht amplifiziert werden. Ferner wurden irreguläre Meiose-Ereignisse an sechs diploiden Kallussen, die sowohl homo- als auch heterozygote Loci trugen, festgestellt. Die Ursachen für dieses Phänomen könnten chromosomale Rekonstitutionen (rearrangements) während der Diploidisierung (Weiss und Maluszynska 2000), ein Zusammenwachsen zweier oder mehrerer Kallusse oder unreduzierte Mikrosporen sein. Hervorzuheben ist die letzte Option des unreduzierten Gameten. In ihrem Review über Polyploidie stellten Ramsey und Schemske (1998) fest, dass in den von ihnen gefundenen Studien das durchschnittliche Vorkommen unreduzierter Gameten bei Nichthybriden 0,56% und bei Hybriden 27% betrug. Unter Berücksichtigung des Entwicklungsvorteils von Geweben dieses Ursprungs gegenüber haploidem Gewebe, ist ein Auftreten heterozygoter Regenerate selbst bei deutlich geringerem Anteil unreduzierter Mikrosporen zu erwarten.

Für die Kalluslinien, die in jedem untersuchten Mikrosatellitenort die gleiche Allelkombination wie die Donorbäume aufwiesen, wäre eine Regeneration aus somatischem Restgewebe denkbar; gegen diese Annahme spricht jedoch, dass sich aus den drei Kalluslinien keine Pflanzen entwickelten, obgleich ihr heterozygoten Erbgut einen erweiterten Genpool und folglich bessere Voraussetzungen für eine Regeneration bot als der einfache Chromosomensatz der Haploiden. Außerdem sind die *in vitro*-Pflanzen, die aus Blättern der Donorpflanze ‚Aue 2‘ regenerierten, ein Beleg dafür, dass generell ein Regenerationspotential somatischer Zellen besteht. Daher sollte auch hier als Grund für das heterozygote Bild dieser drei Kallusse ein chimärer Zustand oder das Vorliegen unreduzierter, d.h. genetisch rekombinierter Mikrosporen angeführt werden.

In die Analyse wurden ebenfalls acht Haploide einbezogen, um ihre allelische Kombination zu bestimmen. Zusätzlich wurde so ansatzweise ihre ‚echte‘, d.h. nicht-chimäre Herkunft und ihre numerisch korrekte Chromosomenzahl überprüft. Kallusse mit einem Chromosom mehr oder weniger als dem haploiden Satz von 19 Chromosomen können mit der verwendeten Durchflusscytometrie-Methode (DAPI-Färbung) in Form eines schnellen Screenings nicht von Hapliden unterschieden werden. Die Überprüfung erbrachte nichts Auffälliges. Weder fehlte ein Allel als Hinweis auf ein Nullallel oder fehlendes Chromosom noch erwies sich ein SSR-Locus als heterozygot, was auf eine Chimäre, eine genetische Rekonstitution oder ein zusätzliches Chromosom hätte hinweisen können. Ein zusätzliches doppelt vorliegendes Chromosom wäre allerdings nicht mit der Mikrosatellitenanalyse detektierbar gewesen.

Ein jahrzehntelanger Anbau von Hybridpappeln, insbesondere Kreuzungen der heimischen Schwarzpappel mit den amerikanischen Pappelarten *P. deltoides* Marsh. und *P. trichocarpa* Torr & Gray, bewirkte eine weite Verbreitung von Hybridpappeln mit verwirrender Formenvielfalt (Heinze 1999). Verbliebene heimische Schwarzpappelreste sind möglicherweise von Hybridpappeln genetisch beeinflusst. Zur Bestimmung des Hybridcharakters von ‚Aue 1‘ und ‚Aue 2‘ konnte ein SSR-Marker genutzt werden. Nach Van der Schoot *et al* (2000) wird WPMS 4 nur bei *P. nigra* amplifiziert und nicht bei den typischen Kreuzungspartnern *P. deltoides* und *P. trichocarpa*. Demzufolge bestätigte die Analyse am SSR-Locus WPMS 4 (Abb. 14) den morphologisch bestimmten Hybridcharakter der Donorbäume.

Cervera *et al.* (2001) gaben genetische Kopplungskarten für *P. nigra*, *P. deltoides* und *P. trichocarpa* heraus. In der Kopplungskarte für *P. nigra* befindet sich WPMS 9 auf der Kopplungsgruppe VI und WPMS 13 auf der Kopplungsgruppe VIII. WPMS 6, 14, 18, und 20 sind dort noch nicht aufgeführt. Die voranschreitenden Arbeiten am Pappelgenomprojekt (International Poplar Sequencing Project; <http://www.ornl.gov/ipgc/>) werden gewiss die Zuordnung aller Mikrosatelliten in naher Zukunft ermöglichen. Wenn einmal die Kopplungsgruppen den Chromosomen zugeordnet werden können und 19 jeweils ein anderes Chromosom markierende SSR-Marker bekannt sein werden, wird jedes Chromosom auf Vorhandensein und Homozygotie hin überprüft und eine sehr genaue Aussage zum haploiden Ursprung getroffen werden können.

Zusammenfassend wird festgehalten, dass bereits entwickelte Mikrosatelliten sich hervorragend für die Zygotieanalyse bei *Populus* eignen. Immerhin wurden neun von 69 analysierten nicht-haploiden Kallussen als heterozygot bestimmt, wobei eine somatische Regeneration weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Außerdem markierte im

vorliegenden Fall der Mikrosatellit WPMS 9 einen Chromosomenabschnitt, der für die Kallus- und Pflanzenregeneration bedeutsam war.

4.3. Transformation haploider regenerativer Kallusse

Durch die vorliegende Arbeit wurde die Transformierbarkeit der haploiden regenerativen Kalluslinien M22-1c5 und FD25 bestätigt. In 10 von 15 auf kanamycinsulfathaltigem Medium wachsenden Linien wurde ein Transgen nachgewiesen. Von diesen transgenen Linien regenerierten mit M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#1, FD25:35S-*Ac-rolC*#2, #3 und #5 vier Linien, die haploid waren und in denen sowohl *Ac* als auch *rolC* amplifiziert wurden.

Für ein Transposon-Tagging werden im Gegensatz zum T-DNA-Tagging nur wenige transgene Linien benötigt, in denen erst durch viele Transpositionen die benötigte hohe Zahl an Insertionen im Genom erreicht werden. Mit dem hier genutzten *Ac/rolC*-System könnten aus den auffälligen hellgrünen Blattbereichen, welche eine putative Transposition markieren, Pflanzen regeneriert und auf eine Mutation hin gemustert werden. In Transformationsstudien unter Verwendung des 35S-*Ac-rolC*-Konstruktes an diploiden *Zitterpappeln* (*P. tremula* × *tremuloides*) bildeten die Hälfte der transgenen Linien hellgrüne Flecken in sonst dunkelgrünen Blättern aus und zeigten damit eine *Ac*-Transposition an (Fladung *et al.* 1997, eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

In den Blättern transgener Pflanzen der haploiden regenerativen Kalluslinien M22-1c5:35S-*Ac-rolC* und FD25:35S-*Ac-rolC* waren hellgrüne Sektoren bisher nicht auffindbar, was jedoch nicht bedeutet, dass keine Transpositionen stattfanden. Während der Verfertigung der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass das *Ac*-Element in Pflanzen der transgenen Kalluslinien FD25:35S-*Ac-rolC*#2 und #3 transponierte (Fladung *et al.* pers. Mitteilung). Vielleicht behinderte die helle grüne Grundfarbe insbesondere bei den Hapliden das Aufspüren dieser hellgrünen Segmente.

Es ist deutlich festzuhalten, dass der Transposon-Tagging-Ansatz so an dieser Stelle nicht fortgesetzt werden kann. Es wäre zu klären, warum die erwartete *rolC*-Aktivität im Blatt, die Reduzierung des Chlorophyllgehaltes, bisher nicht feststellbar war. Fortzuführende Pflanzenregenerationen und Bonituren können hier Aufschluss geben, wie auch weitere Analysen der T-DNA-Insertionsorte. Möglicherweise führten unvollständige T-DNA-Integrationen dazu, dass *rolC* nicht exprimiert werden konnte. Unvollständige

Transformationen traten in 6 von 10 untersuchten transgenen Zitterpappeln auf (Kumar und Fladung 2002).

Ebenso deuten die vier putativ transgenen Linien, M22-1c5:35S-*Ac-rolC*#2, #3, #4 und #5 und die Linie FD25:35S-*Ac-rolC*#6 daraufhin, dass während der T-DNA-Integration eine chromosomale Rekonstitution nahe des Insertionsorts oder die Integration unvollständig stattgefunden haben kann. In den ersten vier Linien wurden trotz der Antibiotikumtoleranz keine Fragmente der zu transferierenden Elemente *Ac* und *rolC* und in der Linie FD25:35S-*Ac-rolC*#6 keine Fragmente von *Ac* amplifiziert.

4.4. Chancen des Transposon-Tagging-Ansatzes mit haploiden regenerativen Kalluslinien – ein Ausblick

Transponierbare Elemente mutagenisieren Gene, wenn sie in deren codierende oder regulierende Regionen springen, was zu einem ‚loss of function‘- oder einem ‚gain of function‘-Phänotyp führen kann, der die Funktion des Gens widerspiegelt. Während Transposon-Tagging-Methoden in der funktionellen Genomforschung von Modell- und krautigen Kulturpflanzen schon effektiv genutzt werden (Long *et al.* 1997, Martienssen 1998, Weigel *et al.* 2000, Koprek *et al.* 2000, Meissner *et al.* 2000), fehlen derartige systematische Studien an Bäumen. Erst kürzlich wurde von Kumar und Fladung (2003) gezeigt, dass das bewegliche Element *Ac* in Pappeln aktiv ist und oft in kodierende oder nahe kodierender Regionen inseriert wird. Damit ist prinzipiell eine Transposon-Tagging-Option im Modellbaum *Populus* gegeben.

Für eine ‚loss-of-function‘-Strategie wurde mit der vorliegenden Arbeit ein Generationssystem etabliert, das das für diese Strategie nötige haploide Ausgangsmaterial bereitzustellen vermag. Es wurde auch gezeigt, dass haploide regenerative Kalluslinien transformierbar und haploid regenerierbar sind. Zusätzlich konnte durch eine selektive Kulturführung der haploide Zustand regenerativer Kalluslinien aufrecht erhalten werden. Eine Diploidisierung haploider transgener Regenerate scheint im weiteren Verlauf erforderlich, denn nur diploidisierte Regenerate entwickelten sich mittelfristig in Erde weiter. Eine kontrollierte Chromosomenverdoppelung nach der Regeneration transgener Linien ist also wünschenswert, um nicht von spontanen Ereignissen abhängig zu sein. Somit ist ein Transposon-Tagging-Ansatz grundsätzlich durchführbar.

Dennoch sind die in diesen Experimenten konkret erhaltenen transgenen und das Transposon *Ac* tragenden haploiden Kalluslinien bisher nicht als Material für den nächsten Schritt im Transposon-Tagging-Ansatz geeignet. An ihnen wurden bis jetzt keine scharf abgegrenzten hellgrünen Blattsegmente gefunden. Ein visuelles Erkennen solcher Segmente zur Feststellung von Transpositionseignissen ist im eingesetzten *Ac/rolC*-System jedoch unerlässlich für die Fortführung des Tagging-Ansatzes. Zudem wäre es wünschenswert, wenn die Regenerate haploider Kalluslinien eine typische Wuchsform der Pappel besäßen. So wäre es überlegenswert alternative Baumarten einzusetzen, wenn diese den Vorteil hätten, als Haploide einen normalen Phänotyp zu besitzen und nicht diploidisiert werden zu müssen. In diesem Jahr veröffentlichten Chaturvedi *et al.* (2003) die Erzeugung von normalwüchsigen haploiden Neempflanzen (*Azadirachta indica* A.Juss.) aus einer Antherenkultur, deren haploider Status auch noch nach drei Jahren bestätigt wurde.

Eine Kalluskultur birgt in sich die Option der somaklonalen Variation (Larkin und Scowcroft 1981). Bei Pappelarten ist vielfach von ihr berichtet worden (Lester und Berbee 1977, Michler und Haissig 1988; Noh und Minocha 1990, Antonetti und Pinon 1993, Son *et al.* 1993, Fry *et al.* 1997). Neben genetischen Mutationen können auch epigenetische Ereignisse, welche nicht die Genstruktur, sondern die Genexpression verändern, eine somaklonale Variation verursachen (Meins 1983). Die haploiden regenerativen Kallusse zeigten bisher einen stabilen Phänotyp. Wenn nach Transformationen bzw. Transposon-Exzisionen eine Variation auftritt, die nicht auf ein Gene-Tagging zurückgeführt werden kann, sollte die somaklonale Variation als mögliche Erklärung herangezogen werden. Die somaklonale Variation wird im Wesentlichen ein Transposon-Tagging nicht beeinträchtigen, sondern höchstens einige Analysen an Regeneraten mit nicht getroffenen Genen mehr erfordern.

Neben diesen spezifischen Schwierigkeiten bestehen z.B. bei der Modellpflanze *Arabidopsis* generell Probleme, mittels Gen-Knockout informative Phänotypen zu finden, die einen direkten Hinweis auf die Genfunktion liefern (Bouché und Bouchez 2001). Diese sogenannte Phänotypenlücke erklären sich Marsch-Martinez *et al.* (2002) durch die Tatsache, dass zwei Drittel des Genoms dupliziert vorliegen (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Ca. 4000 Gene sind doppelt oder mehrfach vorhanden. Von diesen duplizierten Genen ist nicht zu erwarten, dass sie einen Knockout-Mutationsphänotyp erbringen. Dies dürfte natürlich auch für das ungefähr fünfmal größere Pappelgenom gelten.

Innerhalb der Insertionsmutagenese stellt die dominante „gain-of-function“-Strategie eine Alternative zur rezessiven „loss-of-function“-Strategie dar. Das hierzu zählende „activation

tagging“, erstmals als Genisolationsmethode für Pflanzen von Walden *et al.* (1994) vorgeschlagen, inseriert stark aktivierende Sequenzen wie den CaMV 35S Promotor, um ein Gen überzuexprimieren, wenn es in dessen Nähe inseriert wurde. Wichtige Vorteile einer „gain-of-function“-Strategie (Weigel *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2001, Marsch-Martinez *et al.* 2002, Busov *et al.* 2003) gegenüber der ‚loss-of-function‘-Strategie bestehen darin, dass dabei keine letalen Mutationen erzeugt werden und dass diploide Pflanzen verwendet werden können, ohne die langen Generationszyklen berücksichtigen zu müssen (Kumar und Fladung 2003). Basierend auf einem sich selbst stabilisierenden Ac-Derivat und z.B. antibiotikumsensitiven Exzisions-Markern, könnten aus den detektierten Gewebesektoren Pflanzen regenerieren, die anschließend auf einen veränderten dominanten ‚gain-of-function‘-Phänotyp hin gemustert werden.

Von einer erst vor wenigen Jahren eingeführten neuen Methode – der RNA-Interferenz (RNAi), auch RNA-induziertes „gene silencing“ oder post-transkriptionales „gene silencing“ genannt und bei Pflanzen erstmals beschrieben in Waterhouse *et al.* 1998 – versprechen sich Wissenschaftler (z.B. Cerutti 2003, Dawe 2003, Wang *et al.* 2003, Waterhouse und Helliwell 2003) viele neue Erkenntnisse in der funktionellen Genomforschung. Sie gehen davon aus, dass die Insertionsmutagenese bald ihre vorherrschende Stellung in der reversen Genetik an die RNA-Interferenz abgeben wird. So werden z.B. Genduplikationen bei dieser Methode kein Hindernis sein.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass der Transposon-Tagging-Ansatz unter Verwendung haploider regenerativer Kalluslinien durchführbar ist und als ein Werkzeug in der funktionellen Genomforschung von *Populus* eingesetzt werden kann. Umso mehr, wenn haploide Kalluslinien existieren, aus denen haploide oder doppelhaploide Pflanzen mit normalem Phänotyp regenerieren. Dennoch ist deutlich zu unterstreichen, dass jüngere Methoden wie das „activation tagging“ oder die RNA-Interferenz den großen Vorteil haben, auf normales diploides Pflanzenmaterial verschiedenster Genotypen zugreifen zu können. Eine intensive Suche nach Hapliden erscheint unter diesem Licht nicht lohnenswert.

Sollte jedoch im Rahmen anderer Untersuchungen wie der Erzeugung doppelhaploider Pappeln für Züchtungs- und Genomforschung ein geeignetes haploides regeneratives Gewebe gefunden werden, wäre ein Transposon-Tagging-Ansatz durchaus interessant und lohnenswert.

5. Zusammenfassung

In der funktionellen Genomforschung ist die Erzeugung von Knockout-Mutanten ein gängiger Ansatz, um Gene zu isolieren und zu charakterisieren. Die hierfür verwendeten Systeme T-DNA-Tagging und Transposon-Tagging können durch die Insertion einer T-DNA oder eines Transposons in ein Gen dessen Expression stören. Eine anschließende Selbstung hat zum Ziel, in einigen Nachkommen den homozygoten Zustand des defekten Allels zu erreichen und einen darauf basierenden veränderten Phänotyp hervorzubringen, was als Insertionsmutation oder Knockout-Mutation bezeichnet wird. Im Modellbaumsystem *Populus* kann eine Selbstung nicht durchgeführt werden, weil Pappeln diözisch sind. Folglich ist eine Homozygotie eines defekten Gens nicht auf diesem Wege möglich. Die Haploidisierung der Pappel stellt einen Lösungsansatz für die fehlende Homozygotie dar. Im haploiden Genom kann eine Insertion direkt eine Knockout-Mutation bewirken.

Seit mehr als dreißig Jahren wird gelegentlich von der Erzeugung haploider Pappeln berichtet. Hauptsächlich wurde dabei die Antherenkultur eingesetzt. Jedoch erbrachte eine intensive Recherche im Jahre 1999, dass haploide Pappeln weltweit nicht verfügbar waren. Mit der vorliegenden Arbeit wurde in den Jahren 2001 und 2002 eine Pappelpollenkultur etabliert, die regenerierbares haploides und doppelhaploides Pappelgewebe erzeugte.

In Voruntersuchungen wurden bei zwei von sechs getesteten Genotypen erste Zellteilungen in Kulturen isolierter unreifer Pollen beobachtet. Diese beiden Pappelbäume („Aue 1“ und „Aue 2“) wurden als Pollenspender eingesetzt. Die Pollen wurden aus geviertelten unreifen Pappelkätzchen isoliert. Es gelang nicht, verschiedene Pollenentwicklungsstadien mittels Zucker- bzw. Percoll-Gradienten zu trennen. Dem im Jahre 2001 eingesetzten Induktionsmedium K99-4B mit dem Cytokinin BAP ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) als einzigem Wachstumsregulator wurde im Jahre 2002 noch das Auxin NAA ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) zugesetzt. Das Regenerationspotential des Jahres 2002 lag mit insgesamt 1375 Kallussen, die größer als 1 mm waren (72 Kallusse / Kätzchen), deutlich über dem des Jahres 2001 mit 112 Kallussen (19 Kallusse / Kätzchen), was aber aufgrund einer geringen Stichprobenzahl (6 respektive 19 Kätzchen) und einer großen Streuung in der Ausbeute (2-296 Kallusse) statistisch nicht auf das zusätzlich zugesetzte Auxin zurückgeführt werden konnte.

Im Gegensatz dazu ergab ein Vergleich verschiedener Initialbehandlungen an isolierten Pollen, dass eine kombinierte Wärme- und Hungerbehandlung über sechs Tage signifikant die Kallusausbeute erhöhte. Da dies aber auch gleichzeitig die Ausbeute an haploiden Kallussen reduzierte, waren diese Behandlungen nur für die Erzeugung von Doppelhaploiden vorteilhaft.

Von 103 durchflusscytometrisch untersuchten Kalluslinien waren 72% diploid und 17% haploid. Aber auch eine triploide und fünf tetraploide Linien befanden sich darunter. Letztendlich regenerierten *in-vitro*-Pflanzen aus sieben haploiden Kalluslinien. Von drei Linien wurden erfolgreich diploidisierte Pflanzen in Erde überführt. Haploide Pflanzen entwickelten sich nach der Bildung weniger Blätter nicht weiter.

Mittels fünf Mikrosatelliten wurde der haploide Ursprung 66 diploider und drei tetraploider Kalluslinien überprüft. Die Donorbäume, deren Allelkombinationen identisch waren, dienten als heterozygote Kontrollen. Die drei Tetraploiden und 57 Diploide waren in allen Mikrosatellitenorten homozygot. Hier wurde von einem haploiden Ursprung ausgegangen. Sechs Diploide zeigten sowohl homozygote als auch heterozygote Mikrosatellitenorte. Bei ihnen wurden chimäre Strukturen, chromosomale Rekonstitutionen oder unreduzierte Mikrosporen als Ursprung angenommen. Drei diploide Kalluslinien waren heterozygot wie die Donorbäume. Die Ableitung, dass sie aus somatischen Zellen regenerierten, wurde bezweifelt, weil nicht wie bei den Donorbäumen Pflanzen regeneriert werden konnten. Stattdessen wurde daraus geschlossen, dass für diese Kalluslinien weitere genetische Marker nötig gewesen wären, um die somatische Regeneration auszuschließen.

Die Mikrosatellitenanalyse brachte zudem hervor, dass am Mikrosatellitenort WPMS 9 die Allelverteilung gegenüber einer erwarteten 1:1-Segregation signifikant verschieden war (für $p < 0,01$). Somit markierte WPMS 9 einen Chromosomenabschnitt, der für die Kallusbildung und Pflanzenregeneration bedeutsam war.

Mit dem hier erarbeiteten Protokoll für eine Kultur isolierter unreifer Pollen wird dem Modellbaumsystem *Populus* eine vielversprechende Alternative in der Erzeugung haploider und doppelhaploider Gewebe und Pflanzen angeboten.

Ferner wurde die Transformierbarkeit haploider Gewebe mit anschließender haploider Regeneration nachgewiesen. Ein *Agrobacterium*-vermittelter Transfer des Genkonstruktes 35S-*Ac-roIC* bei den haploiden Linien M22-1c5 und FD25 erzeugte mindestens 10 transgene regenerative Kalluslinien, unter ihnen vier haploide, von denen auch Pflanzen in Erde überführt werden konnten. PCR-Analysen bestätigten die Transposition des *Ac*-Elementes. Jedoch wurden die im *roIC/Ac*-System eine Transposition anzeigenden hellgrünen Blattsegmente bisher nicht beobachtet. Sie sind für das schnelle Auffinden von Transpositionseignissen notwendig.

Somit bleibt festzuhalten, dass ein Transposon-Tagging-Ansatz prinzipiell mit haploiden regenerativen Kalluslinien in *Populus* durchführbar ist, auch wenn die erzeugten transgenen haploiden Kalluslinien im Rahmen der vorliegenden Arbeit für solch einen Ansatz weniger geeignet waren, da die Transpositionseignisse nicht visuell, d.h. schnell und einfach detektiert werden konnten.

6. Literatur

- Ahuja MR (1998) Somaclonal genetics of forest trees. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, pp 105-121
- Andersen SB, Olesen A, Halberg N, Madsen S (1991) Haploids in grasses based on knowledge from cereals. In: Nijs APM, Elgersma E (eds) Fodder crop breeding: achievements, novel strategies and biotechnology. Pudoc, Wageningen, NL, pp 129-134
- Antonetti PLE, Pinon J (1993) Somaclonal variation within poplars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 35: 99-106
- Ashford AE, Knox RB (1980) Characteristics of pollen diffusates and pollen wall cytochemistry in poplars. *J Cell Sci* 44: 1-17
- Baker B, Schell J, Lörz H, Fedoroff N (1986) Transposition of the maize controlling element 'Activator' in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4844-4848
- Baldursson S, Krogstrup P, Norgaard JV, Andersen SB (1993) Microspore embryogenesis in anther culture of three species of *Populus* and regeneration of dihaploid plants of *Populus trichocarpa*. *Can J For Res* 239: 1821-1825
- Baldursson S, Ahuja MR (1996a) Cytogenetics and potential of haploidy in forest tree genetics and improvement. In: Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, vol. 1, pp 49-66
- Baldursson S, Ahuja MR (1996b) Haploidy in forest trees. In: Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, vol. 3, pp 297-336
- Barnabas B, Fransz PF, Schel JHN (1987) Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* 6: 212-215
- Baucher M, Monties B, van Montagu M, Boerjan W (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev Plant Sci* 17: 125-197
- Beaujean A, Sangwan RS, Hodges M, Sangwan-Norreel BS (1998) Effect of ploidy and homozygosity on transgene expression in primary tobacco transformants and their androgenetic progenies. *Mol Gen Genet* 260: 362-371
- Bedinger P (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887
- Belzile F, Yoder JI (1992) Pattern of somatic transposition in a high copy *Ac* tomato line. *Plant J* 2: 173-179
- Blackburn KB, Harrison JWH (1924) A preliminary account of the chromosomes and chromosome behaviour in the Salicaceae. *Ann Bot* 38: 361-378
- Blakeslee AF, Belling J, Farnham ME, Bergner AD (1922) A haploid mutant in the jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55: 646-647
- Bouche N, Bouchez D (2001) Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Plant Biol* 4: 111-117
- Bouvier L, Guerif P, Djulbic M, Durel CE, Chevreau E, Lespinasse Y (2002) Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica* 1232: 255-262

- Bradshaw HD, Ceulemans R, Davis J, Stettler R (2000) Emerging model systems in plant biology: Poplar (*Populus*) as a model forest tree. *J Plant Growth Regul* 193: 306-313
- Brunner A, Rottmann WH, Sheppard LA, Krutovskii K, DiFazio S, Leonardi S, Strauss SH (2000) Structure and expression of duplicate *agamous* orthologues in poplar. *Plant Mol Biol* 445: 619-634
- Bueno MA, Gomez A, Boscaiu M, Manzanera JA, Vicente O (1997) Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (*Quercus suber*). *Physiol Plant* 992: 335-341
- Busov VB, Meilan R, Pearce DW, Ma C, Rood SB, Strauss SH (2003) Activation tagging of a dominant gibberellin catabolism gene (*GA2-oxidase*) from poplar that regulates tree stature. *Plant Physiol* 132: 1283-1291
- Castillo AM, Cistue L, Valles MP, Sanz JM, Romagosa I, Molinacano JL (2001) Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. *Plant Cell Rep* 202: 105-111
- Cerrutti H (2003) RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* 19: 39-46
- Cervera M-T, Storme V, Ivens B, Gusmao J, Liu BH, Hostyn V, Slycken JV, Van Montagu M, Boerjan W (2001) Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellites. *Genet* 158: 787-809
- Chaffey N (1999) Wood formation in forest trees: from *Arabidopsis* to *Zinnia*. *Trends Plant Sci* 46: 203-204
- Chaturvedi R, Razdan MK, Bhojwani SS (2003) Production of haploids of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by anther culture. *Plant Cell Rep* 21: 531-537
- Chen Z, Qian C, Qin M, Xu X, Xiao Y (1982) Recent advances in anther culture of *Hevea brasiliensis* (Muell.-Arg.). *Theor Appl Genet* 62: 103-108
- Chen Z (1987) Induction of androgenesis in hardwood trees. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds) *Cell and tissue culture in forest trees*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, NL, vol. 2, pp 247-268
- Chen C, Baucher M, Christensen JH, Boerjan W (2001) Biotechnology in trees: towards improved paper pulping by lignin engineering. *Euphytica* 118: 185-195
- Chuck J, Robbins T, Nijjar C, Ralston E, Courtney-Gutterson N, Dooner HK (1993) tagging and cloning of a petuniaflower color gene with the maize transposable element *Activator*. *Plant Cell* 5: 371-378
- Cloutier S, Cappadocia M, Landry BS (1995) Study of microspore culture responsiveness in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by comparative RFLP mapping of a F2 population and two microspore-derived populations. *Theor Appl Genet* 916-7: 841-847
- Confalonieri M, Balestrazzi A, Bisoffi S, Carbonra D (2003) *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 72: 109-138
- Cordewener JHG, Custers JBM, van Lookeren Campagne MM (1998) Microspore culture: a model for investigating the role of stress in the induction of embryogenesis. In: Chupeau Y, Caboche M, Henry Y (eds) *Androgenesis and haploid plants*. Springer, Heidelberg, chapt. 5, 121pp

- Custers JBM, Cordewener JHG, Fiers MA, Maassen BTH, van Lookeren Campagne MM, Liu CM (2000) Androgenesis in *Brassica*: A model system to study the initiation of plant embryogenesis. In: Bhojwani SS, Soh WY (eds) Current trends in the embryology of angiosperm. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, pp 451-470
- da Silva Dias JC (2001) Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. *Euphytica* 119: 389-394
- Davies PA, Morton S (1998) A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. *Plant Cell Rep* 173: 206-210
- Dawe, RK (2003) RNA interference, transposons, and the centromere. *Plant Cell* 15: 297-301
- Degen B, Streiff R, Ziegenhagen B (1999) Comparative study of genetic variation and differentiation of two pedunculate oak (*Quercus robur*) stands using microsatellite and allozyme loci. *Heredity* 83: 597-603
- Deutsch F, Kumlehn J, Kumar S, Fladung M (2003) Induction of haploid poplar through microspore culture. In: Proceedings of BIOFOR 2002, 11-14 Nov 2002, Vitoria-Gasteiz, E, (in press)
- DeVerno LL (1995) An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis. In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, vol. 1, pp 361-375
- Dinus RJ (2001) Genetic improvement of poplar feedstock quality for ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol* 91-93: 23-34
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysak MA, Nardi L, Obermayer R (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Ann Bot* 82: 17-26
- Dumolin S, Demesure B, Petit RJ (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theor Appl Genet* 918: 1253-1256
- Eady C, Lindsey K, Twell D (1995) The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. *Plant Cell* 7: 65-74
- Eckenwalder JE (1996) Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler RF, Bradshaw HDJr, Heilman PE, Hinckley TM (eds) Biology of *Populus* and its implication for management and conservation. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada, pp 7-32
- Endemann M, Hristoforoglu K, Stauber T, Wilhelm E (2001) Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. *Biol Plant* 44: 339-345
- Ewald D, Naujoks G, Matschke J (1991) Regeneration von Pappelpflanzen aus Antheren. *Beitr. Forstwirtschaft* 251: 16-18
- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissig B, Comai L (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol Gen Genet* 206: 192-199
- Fladung M, Ahuja MR (1995) "Sandwich" method for nonradioactive hybridization. *BioTechniques* 185: 800-802
- Fladung M, Kumar S, Ahuja MR (1997) Genetic Transformation of *Populus* genotypes with different chimaeric gene constructs: transformation efficiency and molecular analysis. *Transgenic Research* 6: 111-121

- Fladung M (1999) Prospects for the isolation of genes controlling tree-specific traits by using a transposon tagging approach. In: Altman A, Ziv M, Izhar S (eds) Plant biotechnology and *in vitro* biology in the 21st century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, pp 139-142
- Fourré JL, Berger P, Niquet L, André P (1997) Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor Appl Genet* 94: 159-169
- Franke R, McMichael CM, Shirley AM, Meyer K, Cusumano JC, Chapple C (2000) Modified lignin in tobacco and poplar plants overexpressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J* 22: 223-234
- Fry JD, Douglas GC, Saieed NT (1997) Somaclonal variation in *Populus*: an evaluation. In: Klopfenstein NB, Chun YW, Kim M, Ahuja MR (eds) Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of *Populus*. Rocky Mountain Research Station, Fort Collins, Colorado, pp 33-43
- Gallego Martin F, Sánchez Anta MA, Navarro Andrés F (1987) Datos cariológicos de algunas Salicaceas. *Studia Botanica* 6: 163-167
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang RL, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchinson D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong JP, Miguel T, Paszkowski U, Zhang SP, Colbert M, Sun WL, Chen LL, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu YS, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296: 92-100
- Gomez A, Pintos B, Aguiriano E, Manzanera JA, Bueno MA (2001) SSR markers for *Quercus suber* tree identification and embryo analysis. *J Hered* 923: 292-295
- Greco R, Ouwerkerk PBF, Taal AJC, Favalli C, Begiristain T, Puigdom'enech P, Colombo L, Hoge JHC, Pereira A (2001) Early and multiple *Ac* transpositions in rice suitable for efficient insertional mutagenesis. *Plant Mol Biol* 46: 215-227
- Guha S, Maheshwari S (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497
- Guo YD, Pulli S (2000) Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Rep* 199: 875-880
- Halberg N, Olesen A, Tuveson IKD, Andersen SB (1990) Genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) with high anther-culture response through hybridization. *Plant Breed* 105: 89-94
- Heinze B (1999) Erhaltung der Schwarzpappel in Österreich - forstwirtschaftliche, genetische und ökologische Aspekte. In: Forstliche Bundesversuchsanstalt (ed) FBVA-Berichte, Wien, vol. 106
- Ho RH, Raj Y (1985) Haploid plant production through anther culture in poplars. *Forest Ecol Manag* 13: 133-142
- Hoekstra S, Van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, Van der Mark F (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv Igri. *Plant Sci* 861: 89-96
- Höfer M, Touraev A, Heberle-Bors E (1999) Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Plant Cell Rep* 1812: 1012-1017

- Höfer M, Gomez A, Aguriano E, Manzanera JA, Bueno MA (2002) Analysis of simple sequence repeat markers in homozygous lines of apple. *Plant Breeding* 1212: 159-162
- Hofmann M (1999) Modellvorhaben Schnellwachsende Baumarten. Zusammenfassender Abschlußbericht. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe 13: Münster
- Holme IB, Olesen A, Hansen NJP, Andersen SB (1999) Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breed* 118: 111-117
- Hönicka H (2002) Microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) and genetic transformation of wheat and barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores using the gfp marker gene. Diss., Univ. Hamburg, 123 pp
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
- Howe GT, Strauss SH, Goldfarb B (1991) Insertion of the maize transposable element *Ac* into poplar. In: Ahuja MR (ed) *Woody plant biotechnology*. Plenum Press, New York, pp 283-294
- Howe GT, Goldfarb B, Strauss SH (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants. *Plant Cell Tiss Org Cult*: 59-71
- Hu TC, Kasha KJ (1999) A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome* 423: 432-441
- Illies ZM (1974) Induction of haploid parthenogenesis in aspen by post-pollination treatment with toluidine-blue. *Silvae Genet* 23: 221-226
- Illies ZM (1976) Experiences in doubling and reducing chromosome numbers in woody species for further breeding programmes. In: *Proceedings XVI. IUFRO World Congress, Oslo*, pp 267-271
- Indrianto A, Heberle-Bors E, Touraev A (1999) Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. *Plant Science* 1431: 71-79
- Isabel N, Boivin R, Lefasseur C, Charest PM, Bousquet J, Tremblay FM (1996) Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). *Am J Bot* 83: 1121-1130
- Jähne A, Becker D, Brettschneider R, Lörz H (1994) Regeneration of transgenic, microspore derived, fertile barley. *Theor Appl Genet* 89: 525-533
- Jähne A, Lörz H (1995) Cereal microspore culture. *Plant Sci* 1091: 1-12
- James DW Jr, Lim E, Keller J, Plooy I, Ralston E, Dooner HK (1995) Directed tagging of the *Arabidopsis fatty acid elongation 1* (FAE1) gene with the maize transposon *Activator*. *Plant Cell* 7: 309-319
- Jansson S, Bhalerao R, Karlsson J, Gustafsson P, Bhalerao R, Nilsson O, Sandberg G, Lundeberg J, Sterky F, Uhlen M, Unneberg P (2003) A glimpse into a tree genome - a *Populus* EST inventory. In: *Tree Biotechnology*, 7-12. Juni 2003, Umea, Schweden, http://www.treebiotech2003.norrnod.se/s6_o.htm
- Keller ERJ, Korzun L (1996) Ovary and Ovule Culture for Haploid Production. In: Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, vol. 1
- Khaleel TF, Dillman R, Gretch D (2003) Estradiol distribution during the development and expression of reproductive structures in *Populus tremuloides* Michx.. *Sex Plant Reprod* 16: 35-42

- Kiss J, Kondrak M, Törjek O, Kiss E, Gyulai G, Mazik-Tökei K, Heszky LE (2001) Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. *Euphytica* 1182: 213-221
- Knox RB, Willing RR, Ashford AE (1972) Role of pollen-wall proteins as recognition substances in interspecific incompatibility in poplars. *Nature* 237: 381-383
- Kopecky F (1960) Experimentelle Erzeugung von haploiden Weißpappeln (*Populus alba* L.). *Silvae Genet* 9: 102-109
- Koprek T, McElroy D, Louwerse J, Williams-Carrier R, Lemaux PG (2000) An efficient method for dispersing Ds elements in the barley genome as a tool for determining gene function. *Plant J* 24: 253-263
- Kumar S, Fladung M (2002) Transgene integration in aspen: structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J* 31: 543-551
- Kumar S, Fladung M (2003) Somatic mobility of the maize element *Ac* and its usability for gene tagging in aspen. *Plant Mol Biol* 51: 643-650
- Kumlehn J, Lörz H (1999) Monitoring sporophytic development of individual microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Clement X, Pacini E, Audran J-C (eds) Anther and pollen. Springer, Berlin Heidelberg, pp 183-190
- Kumlehn J, Lörz H, Kranz E (1999) Monitoring individual development of isolated wheat zygotes: a novel approach to study early embryogenesis. *Protoplasma* 2081-4: 156-162
- Kunz C, Islam SMS, Berberat J, Peter SO, Buter B, Stamp P, Schmid JE (2000) Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *J Plant Physiol* 1562: 190-196
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60: 197-214
- Laurain D, Trémouillaux-Guiller J, Chénieux JC (1993) Embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species. *Plant Cell Rep* 129: 501-505
- Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliff MA, Ellis JG (1995) The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell* 7: 1195-1206
- Lefèvre F, Barsoum N, Heinze B, Kajba D, Rotach P, de Vries SMG, Turok J (2001) EUFORGEN Technical Bulletin: In situ conservation of *Populus nigra*. International Plant Genetic Resources Institute, Rom, pp 58
- Lester DT, Berbee JG (1977) Within-clonal variation among black poplar trees derived from callus culture. *For Sci* 23: 122-131
- Lionneton E, Beuret W, Delaitre C, Ochatt S, Rancillac M (2001) Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). *Plant Cell Rep* 202: 126-130
- Liu W, Zheng MY, Konzak CF (2002) Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 209: 821-824
- Lloyd G, McCown B (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latiflora*) by use of shoot tip culture. *Int Plant Prop Soc Proc* 30: 421-27
- Long D, Goodrich J, Wilson K, Sundberg E, Martin M, Puangsomlee P, Coupland G (1997) Ds elements on all five *Arabidopsis* chromosomes and assessment of their utility for transposon tagging. *Plant J* 11: 145-148

- Lönneborg A, Jansson C (1993) Isolation of plant genes by T-DNA and transposon mutagenesis - gene tagging. In: Progress in Botany. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, vol. 54
- Maes T, De Keukeleire P, Gerats T (1999) Plant tagology. Trends in Plant Science 43: 90-96
- Maluszynski M, Szarejko I, Barriga P, Balcerzyk A (2002) Heterosis in crop mutant crosses and production of high yielding lines using doubled haploid system. In: Maluszynski M, Kasha KJ (eds) Mutations, *in vitro* and molecular techniques for environmentally sustainable crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, pp 55-74
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York
- Martienssen RA (1998) Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. Proc Natl Acad Sci USA 95: 2021-2026
- Meins FJ (1983) Heritable variation in plant cell culture. Annu Rev Plant Physiol 34: 327-346
- Meissner R, Chague V, Zhu QH, Emmanuel E, Elkind Y, Levy AA (2000) A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. Plant J 22: 265-274
- Michler CH, Haissig BE (1988) Increased herbicide resistance of *in vitro* selected hybrid poplar. In: Ahuja MR (ed) Somatic cell genetics of woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, pp 183-189
- Mofidabadi A, Kiss J, Mazik-Tokey K, Gergacz E, Heszky LE (1995) Callus induction and haploid plant regeneration from anther culture of two poplar species. Silvae Genet 44: 141-145
- Müller-Starck G, Jörgensen J (1991) Enzyme gene markers as indicators of the initial ploidy in anther cultures of trees. Can J For Res 21: 1141-1144
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Nagaraj M (1952) Floral morphology of *Populus deltoides* an *P. tremuloides*. Bot Gaz 114: 222-243
- Neuhaus-Url G, Neuhaus G (1993) The use of nonradioactive chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization: a comparison with radioactivity. Transgenic Res 2: 115-120
- Niemirowicz-Szczytt K, Faris NM, Rucinska M, Nikolova V (2000) Conservation and storage of a haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) collection under *in vitro* conditions. Plant Cell Rep 193: 311-314
- Nitzsche W, Wenzel G (1977) Haploids in plant breeding. Paul Parey-Verlag, Berlin, pp101
- Nkongolo KK, Klimazewska K (1995) Cytological and molecular relationships between *Larix decidua*, *L. leptolepis* and *L. x eurolepis*. Theor Appl Genet 90: 827-834
- Noh EW, Minocha SC (1990) Pigment and isozyme variation in aspen shoots regenerated from callus culture. Plant Cell Tiss Org Cult 23: 39-44
- Obert B, Pretova A, Büter B, Schmid JE (2000) Effect of different saccharides on viability of isolated microspores and androgenic induction in *Zea mays*. Biol Plant 431: 125-128
- Osborne BI, Baker B (1995) Movers and shakers: maize transposons as tools for analyzing other plant genomes. Curr Opin Cell Biol 7: 406-413
- Pacini E (2000) From anther and pollen ripening to pollen presentation. Plant Syst Evol 222: 19-43

- Parsons TJ, Sinkar VP, Stettler RF, Nester EW, Gordon MP (1986) Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *BioTechnol* 4: 533-536
- Pechan PM, Keller WA (1989) Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. by gamma irradiation and ethanol stress. *In vitro Cell Dev Biol* 25: 1073-1074
- Pechan PM, Smykal P (2001) Androgenesis: Affecting the fate of the male gametophyte. *Physiol Plant* 111: 1-8
- Radojevic L, Djordjevic N, Tucic B (1989) *In vitro* induction of pollen embryos and plantlets in *Aesculus carnea* Hayne through anther culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 17: 21-26
- Radojevic L, Marinkovic N, Jevremovic S, Calic D (1999) Plant regeneration from uninuclear microspore suspension cultures of *Aesculus hippocastanum* L.. In: Altman A, Ziv M, Izhar S (eds) *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st century*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp 201-204
- Ramsey J, Schemske DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* 29: 467-501
- Reynolds TL (1997) Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 33: 1-10
- Reynolds TL (1993) A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (Poaceae) during normal ontogeny and induced embryogenic development. *Am J Bot* 80: 569-576
- Robinson C (1999) Making forest biotechnology a commercial reality. Do we need a tree genome project, or will *Arabidopsis* point the way?. *Nat Biotechnol* 17: 27-30
- Roth R, Ebert I, Schmidt J (1997) Trisomy associated with loss of maturation capacity in a long-term embryogenic culture of *Abies alba*. *Theor Appl Genet* 95: 353-358
- Rottmann WH, Meilan R, Sheppard LA, Brunner AM, Skinner JS, Ma C, Cheng S, Jouanin L, Pilate G, Strauss SH (2000) Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant J* 22: 235-245
- Rougier M, Jnoud N, Said C, Russell S, Dumas C (1991) Male gametophyte development and formation of the male germ unit in *Populus deltoides* following compatible pollination. *Protoplasma* 162: 140-150
- Sato S, Kato N, Iwai S, Hagimori M (2002) Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). *Breed. Sci.* 52: 23-26
- Scholz SC, Lörz H, Lütticke S (2001) Transposition of the maize transposable element *Ac* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Gen Genet* 264: 653-661
- Siebel J, Pauls KP (1989) A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 78: 473-479
- Smulders MJM, van der Schoot J, Arens P, Vosman B (2001) Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Mol Ecol Notes* 1: 188-190
- Son SH, Moon HK, Hall RB (1993) Somaclonal variation in plants regenerated from callus culture of hybrid aspen (*Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx.). *Plant Sci* 90: 89-94
- Stettler RF, Bawa KS (1971) Experimental induction of haploid parthenogenesis in black cottonwood. *Silvae Genet* 20: 15-25
- Stevens PF (2001 fortlaufend) Angiosperm Phylogeny Website. Version 4, May 2003 . <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Stoehr M, Zsuffa L (1990a) Induction of haploids in *Populus maximowiczii* via embryogenic callus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 23: 49-58

- Stoehr M, Zsuffa L (1990b) Genetic evaluation of haploid clonal lines of a single donor plant of *Populus maximowiczii*. *Theor Appl Genet* 80: 470-474
- Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkellner H, Glossl J, Kremer A (1998) Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Mol Ecol* 73: 317-328
- Sun F, Zhu T, Wang FH (1988) The association of the generative cell and vegetative nucleus in mature pollen of *Populus deltoides*. In: Knox RB, Singh MB, Troiani LF (eds) *Pollination* 88. School of Botany, University of Melbourne, Parkville, pp 128-132
- Sundaresan V (1996) Horizontal spread of transposon mutagenesis: new uses for old elements. *Trends Plant Sci* 6: 184-190
- Sunderland N, Wicks F (1973) Embryoid formation in pollen grains of *Nicotianum tabacum*. *J Exp Bot* 22: 213-226
- Suzuki Y, Uemura S, Saito Y, Murofushi N, Schmitz G, Theres K, Yamaguchi I (2001) A novel transposon tagging element for obtaining gain-of-function mutants based on a self-stabilizing *Ac* derivative. *Plant Mol Biol* 45: 123-131
- Taylor G (2002) *Populus: Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree?. *Ann Bot* 90: 681-689
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Toojinda T, Broers LH, Chen XM, Hayes PM, Kleinhofs A, Korte J, Kudrna D, Leung H, Line RF, Powell W, Ramsay L, Vivar H, Waugh R (2000) Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* 1014: 580-589
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. *Sex Plant Reprod* 9: 209-215
- Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep* 158: 561-565
- Tralau H (1957) A haploid form of *Populus tremula* from Uppland. *Bot Notiser* 110: 481-483
- Tulecke W (1953) A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. *Science* 117: 599-600
- van der Schoot J, Pospiskova M, Vosman B, Smulders MJM (2000) Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theor Appl Genet* 1011-2: 317-322
- van Raemdonck D, Jaziri M, Boerjan W, Baucher M (2001) Advances in the improvement of forest trees through biotechnology. *Belg J Bot* 134: 64-78
- Vendramin GG, Scotti I, Ziegenhagen B (2003) Microsatellite DNA markers in forest trees. In: Kumar S, Fladung M (eds) *Molecular genetics and breeding of forest trees*. The Haworth Press, Inc., Bringhamton, NY, USA
- Villar M, Gaget M, Said C, Rougier M, Dumas C (1993) Pollen-pistil interaction in *Populus*: β -galactosidase activity associated with pollen-tube growth in the crosses *P. nigra* x *P. nigra* and *P. nigra* x *P. alba*. *Sex Plant Rep* 6: 249-256
- Walbot V (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 49-82

- Walden R, Fritze K, Hayashi H, Miklashevichs E, Harling H, Schell J (1994) Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 26: 1521-1528
- Wang C, Chu Z, Sun C (1975) Induction of pollen plants of *Populus*. *Acta Bot Sin* 17: 56-62
- Waterhouse PM, Helliwell CA (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 4: 29-38
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF, Chory J (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1224: 1003-1013
- Weiss H, Maluszynska J (2000) Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas* 133: 255-261
- Widholm JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Techn* 47: 189-194
- Winton L, Einspahr D (1968) The use of heat-treated pollen for aspen haploid induction. *Forest Sci* 14: 406-407
- Winton LL, Stettler RF (1974) Utilization of haploidy in tree breeding. Proceedings of the international Symposium on haploids in higher plants 10-14 Jun 1974, University of Guelph: Guelph, Ontario, Kanada
- Wu K, Nagarajan P (1990) Poplars (*Populus* spp.): *In vitro* production of haploids. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer-Verlag, Berlin, vol. 12, pp 237-249
- Wu K, Xu M (1984) Induction of maternal haploid plants from unpollinated ovaries of poplar *in vitro*. *Acta Genet Sin* 111: 47-51
- Wullschleger SD, Jansson S, Taylor G (2002) Genomics and forest biology: *Populus* emerges as the perennial favorite. *Plant Cell* 14: 2651-2655
- Zheng MY, Liu W, Weng Y, Polle E, Konzak CF (2001) Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. *Plant Cell Reports* 208: 685-690
- Zhu X, Wang R, Liang Y (1980) Induction of poplar pollen plantlets. *Sci For* 4: 49-54