

# Entwicklung eines *Agrobacterium tumefaciens*-basierten Transformationssystems für *Cyclamen persicum* über somatische Embryogenese

Svenja Ratjens, Traud Winkelmann, Melanie Bartsch

Abteilung für Gehölz- und Vermehrungsphysiologie, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Leibniz Universität Hannover

*Cyclamen persicum* entwickeln sich derzeit zu einem „angewandten Modellorganismus“, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Entwicklungsprogrammen der zygotischen und somatischen Embryogenese zu untersuchen. Als Basis für die zukünftige Charakterisierung wichtiger Schlüsselgene der somatischen Embryogenese bei *Cyclamen persicum* ist ein effizientes Transformationsprotokoll notwendig. Bisher veröffentlichte Transformationsstudien an *Cyclamen* verwendeten vor allem Sämlinge oder somatische Embryonen als Ausgangsmaterial. Im Gegensatz dazu war das Ziel dieser Arbeit, ein Transformationsprotokoll mit genetisch homogenem Ausgangsmaterial und geringem Risiko der Chimärenbildung zu etablieren.

Es wurde ein Transformationsprotokoll entwickelt, bei dem die Einflussfaktoren Genotyp des Ausgangsmaterials und *Agrobacterium tumefaciens* Stamm getestet wurden. Embryogene Kalluskulturen (100 mg Portionen) zweier Genotypen nach 10 Tagen Vorkultur ließen sich erfolgreich mit den Agrobakterienstämmen EHA105 (33% GUS-positive Kallusse 6 Wochen nach Selektionsbeginn) und GV2260 (78% GUS-positive Kallusse 6 Wochen nach Selektionsbeginn) transformieren. Dabei schien die Embryogenität des Ausgangsmaterials einen großen Einfluss auf den Transformationserfolg zu haben.

Aus hygromycinresistenten ( $\text{Hyg}^{\text{R}}$ ) Kalluszellen differenzierten  $\text{Hyg}^{\text{R}}$  somatische Embryonen, welche sich nach Vereinzeln zu  $\text{Hyg}^{\text{R}}$  In-vitro-Pflanzen weiterentwickelten. Die Regeneration transgener Pflanzen war innerhalb von 38 Wochen nach der Transformation möglich. Aus dieser Arbeit gingen bisher insgesamt 217  $\text{Hyg}^{\text{R}}$  In-vitro-Pflanzen hervor. Der erfolgreiche Einbau der T-DNA konnte in 38 ausgewählten Pflanzen mittels PCR Nachweis des *hptII*-Gens und des *gusA*-Gens nachgewiesen werden. Der Nachweis der Reportergenaktivität erfolgte über den GUS-Test. In 29 der Pflanzen (76%) fielen die Nachweise GUS-Test, *hptII*-spezifische PCR und *gusA*-spezifische PCR positiv aus.

Das in dieser Arbeit entwickelte Transformationsprotokoll kann in Zukunft als effizient durchführbares Routineprotokoll eingesetzt werden. Es wird empfohlen pro Konstrukt 10 x 100 mg Kallus zu transformieren.

Auf Basis dieses Protokolls sollen Schlüsselgene der somatischen Embryogenese entweder aus anderen Pflanzenarten oder noch zu identifizierende homologe Gene aus *Cyclamen persicum* funktionell charakterisiert werden.