

Einfluss von *In-vitro*-Kultivierung auf epigenetische Muster am Modellsystem Petunie

Die Ergebnisse – kurzgefasst

In mehreren Studien wurden phänotypische Veränderungen nach der *In-vitro*-Passage festgestellt. Oft gehen diese Veränderungen auch mit Änderungen epigenetischer Marker, wie einem Verlust von DNA-Methylierung einher. Verlust von DNA-Methylierung korreliert im Allgemeinen mit Chromatin-Auflockerung, wodurch Elemente wie DNA-Transposons aktiviert werden können und eine Reihe von nicht vorhersehbaren Folgeeffekten auslösen können. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu testen ob *In-vitro*-Kultivierung auch in Petunien somaklonale Variabilität auslöst. Zu diesem Zweck wurden die rotblühende *P. exserta* und die weißblühende *P. hybrida* 'Mitchell' gekreuzt, um eine Population zu erzeugen, die sich für die Untersuchung der somaklonalen Variation anhand der Blütenphänotypen eignet. Nach der *In-vitro*-Kultivierung haben wir mehrere Variationen des Blütenphänotyps, wie Größe, Farbe und Muster, festgestellt. Die aus der F2-Generation stammende Linie 266-5-4 produzierte sowohl rote als auch weiße Blüten an verschiedenen Zweigen derselben Pflanze, wobei die roten Blüten einen höheren pH-Wert aufwiesen als die weißen Blüten. Die RM18-Linie aus der F1-Population zeigte eine "sektorierte Blüte", wobei sich das Expressionsniveau der die Blütenfarbe bestimmenden Gene änderte. Weitere Experimente sind geplant, um zu untersuchen, ob den beobachteten Phänotypvariationen eine epigenetische Kontrolle zugrunde liegt.

Versuchsfrage und Versuchshintergrund

Die *In-vitro*-Vermehrung ist eine gängige Methode im Gartenbau. Nach der *In-vitro*-Kultivierung werden jedoch immer wieder Veränderungen des Phänotyps, wie seit langem bereits von Ölpalmen bekannt, beobachtet. So beschrieben ONG-ABDULLAH ET AL. (2015), dass *In-vitro*-vermehrte Ölpalmen veränderte epigenetische Muster am retroviralen Element „karma“ zeigten, v.a. eine DNA-Hypomethylierung. Hervorzuheben ist, dass der Verlust von CG- und CHG-Methylierung mit der Aktivierung von transposablen Elementen (TEs) einhergeht (HIROCHIKA 1993; ONG-ABDULLAH ET AL. 2015), welche daraufhin ungezielt in andere Bereiche des Genoms integrieren und eine Reihe von nicht vorhersehbaren Folgeeffekten auslösen können.

Auch Petunienzüchter berichten von einer Vielzahl von Pflanzen, die nach *In-vitro*-Vermehrung phänotypische Veränderungen zeigten. Ziel dieser Arbeit ist die Quantifizierung der somaklonalen Variabilität, welche während und nach der Kallus-Regeneration von *In-vitro*-kultivierten Petunien auftreten kann. Weiterhin werden Änderungen der Genexpression untersucht und beschrieben sowie blüten-phänotypische Merkmale wie Färbung mit physiologischen Veränderungen wie Blüten-pH-Wert beschrieben.

Einfluss von *In-vitro*-Kultivierung auf epigenetische Muster am Modellsystem Petunie

Ergebnisse im Detail

Wie erwartet, waren wenige Runden der Kallus-Subkultivierung ausreichend, um phänotypische Veränderungen zu beobachten. Zunächst galt es, durch Kreuzung einer Petunien-Wildart (*P. exserta*) und einer in der Züchtung häufig verwendeten Hybridart (*P. hybrida* 'Mitchell') die Verschiebung des Flavonol-Anthocyanin Gleichgewichts auszubalancieren. Neben der rotblühenden *P. exserta* und der weißblühenden *P. hybrida* 'Mitchell' zeigten sowohl die (*P. exserta* ♂ × ♀ *P. hybrida* 'Mitchell') als auch die (*P. hybrida* 'Mitchell' ♂ × ♀ *P. exserta*) Blüten mit weißem Hintergrund und hellrosa Randring (Abbildung 1). Zur weiteren Erhöhung der Variabilität wurden die Nachkommen der F1 Generation erneut miteinander gekreuzt, um Ausgangsphänotypen zu erzeugen, die näher an der Eltern-Pflanzen liegen (Abbildung 1).



Abbildung 1: Blütenvariation der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen, ausgehend von der Kreuzung der rotblühenden *P. exserta* und der weißblühenden *P. hybrida* 'Mitchell'. Blütenphänotypen der F1 Generation: links, (*P. exserta* ♂ × ♀ *P. hybrida* 'Mitchell'), mitte, (*P. hybrida* 'Mitchell' ♂ × ♀ *P. exserta*) sowie rechts, F2 Generation (*P. exserta* ♂ × ♀ *P. hybrida* 'Mitchell') × (*P. hybrida* 'Mitchell' ♂ × ♀ *P. exserta*).

Für beide Populationen erschien das Kriterium des Ausbalancierens des Flavonol-Anthocyanin Gleichgewichts erfüllt, so dass beide Populationen der F1 und acht ausgewählte Individuen der F2 Generation (hauptsächlich weiß, hauptsächlich rot oder z.B. geadert) in *In-vitro*-Kultur genommen wurden. Nach der Kultivierung mit dem RM-Medium über mehrere Runden zeigte eine Linie (RM18) aus unserer F1-Sammlung den Phänotyp sektorierter Blüten (Abbildung 2). Die Blüte entwickelte eine gestreifte oder sektorierte Region mit dunklerer roter Farbe, obwohl die Größe oder Anzahl der Sektoren von Blüte zu Blüte variiert (Abbildung 2). Wir haben weitere Untersuchungen zur Genexpression mit mehreren Kandidatengenen, die an der Ausprägung der Blütenfarbe beteiligt sind, durchgeführt. Neben der Expression bereits bekannter *P. exserta* und *P. hybrida* 'Mitchell' typischer Gene (MYB-FL als Treiber der Flavonol-Synthese und AN2 als Treiber der Blütenfarbe) unterschied sich das Expressionsniveau eines Kandidatengens (MT) zwischen der sektorierten und der nicht-sektorierten Blütenblattregion deutlich (Abbildung 2). Hervorzuheben ist, dass das Gen MT am 3'-Ende direkt an ein Transposon grenzt (BOMBARELY et al, 2016). Die unterschiedliche Expression von MT im farbigen bzw. farblosen Teil der gleichen Blüte gibt einen Hinweis auf veränderte Transposon Aktivität nach *In-vitro*-Kultivierung.

Einfluss von *In-vitro*-Kultivierung auf epigenetische Muster am Modellsystem Petunie

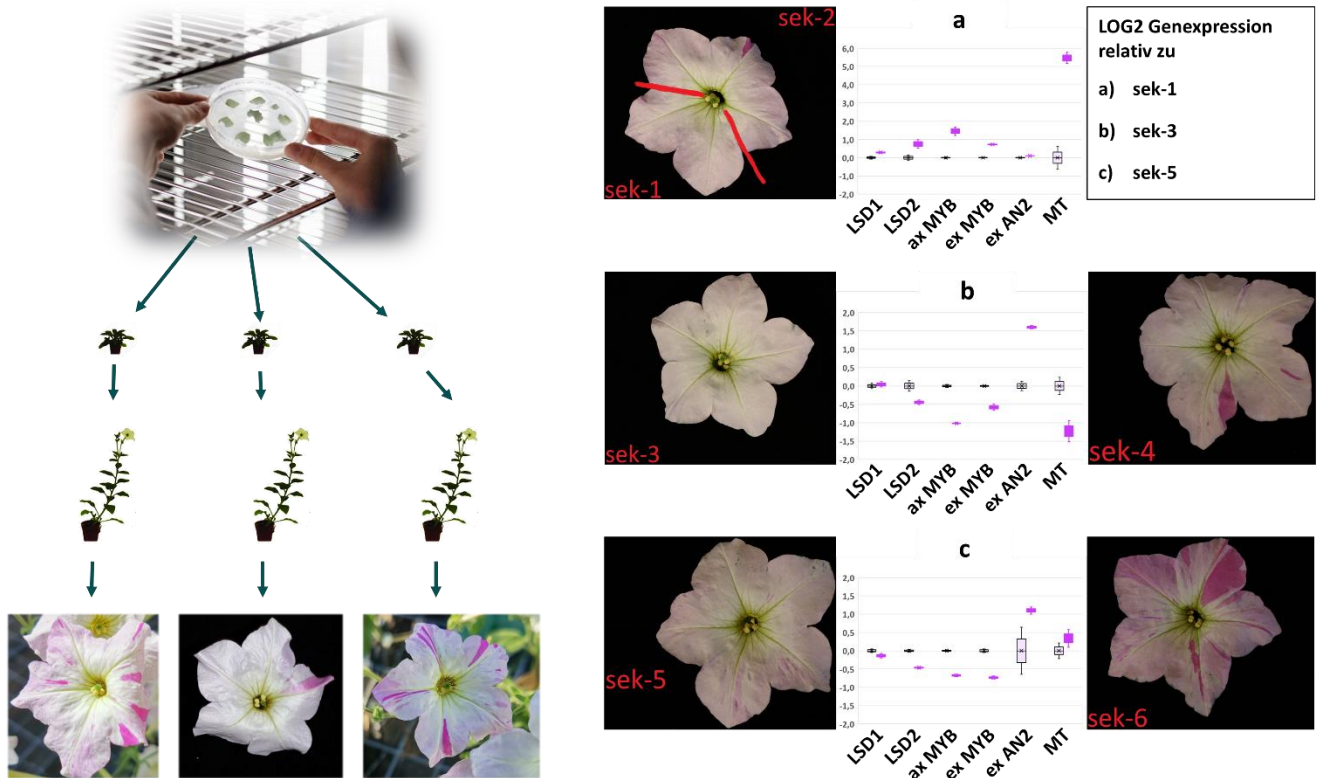


Abbildung 2: Schematische Darstellung durchgeführter Experimente. Oberflächsterilisierte Blattstücken wurden zur Erzeugung von Kallus-Kulturen *In-vitro* inkubiert, nach mehreren Runden der Kallus-Subkultivierung differenziert und akklimatisiert, anschließend zur Blüte herangezogen und bonitiert. Blütenphänotypen der *In-vitro*-vermehrten F1 Generation (links). Im rechten Panel wurde mittels RT-qPCR die Genexpression von Schlüsselgenen der Blütenfarbensynthese gemessen, wobei sektorierte Blütenblätter (sek-2) direkt mit nicht-sektorierten Teilen der gleichen Blüte verglichen wurden, bzw. zwei gleichmäßig leicht gefärbte Blüten mit farbigen, sektorierten Blüten der gleichen Pflanze verglichen wurden. Die nicht-sektorierten Bereiche dienen jeweils als Referenz.

In unserer F2-Sammlung [\uparrow (*P. exserta* \uparrow \times \uparrow *P. hybrida* 'Mitchell') \times \uparrow (*P. hybrida* 'Mitchell' \uparrow \times \uparrow *P. exserta*)] erhielten wir Linien mit unterschiedlichen Blütenfarbintensitäten. Ausgewählte F2-Linien wurden dann in mehreren Runden *In-vitro* kultiviert und anschließend zu Sublinien regeneriert. Aus einer der weißblütigen Linien (266-5) erhielten wir Unterlinien mit unterschiedlicher Blütengröße und -gewicht (266-5-4 große Blüte, 266-5-3 kleine Blüte – Abbildung 3). In der Zwischenzeit produzierte die Linie 266-5-4 sowohl rote als auch weiße Blüten auf verschiedenen Zweigen derselben Pflanze. Wir beschlossen, diese beiden Linien hinsichtlich der Farb-/Größenvariationen genauer zu untersuchen. Es wurde berichtet, dass der pH-Wert bei Petunien mit der Blütenfarbe in Verbindung steht. Daher haben wir die Blütenblätter mit verschiedenen Farben aus diesen Linien einer pH-Wert-Messung unterzogen. Der pH-Wert der roten Blüte wurde signifikant höher gemessen als der der weißen Blüte (Abbildung 3).

Einfluss von *In-vitro*-Kultivierung auf epigenetische Muster am Modellsystem Petunie

266-5 Klon 4 (rot, groß & weiß, groß) | Klon 3 (weiß, klein)

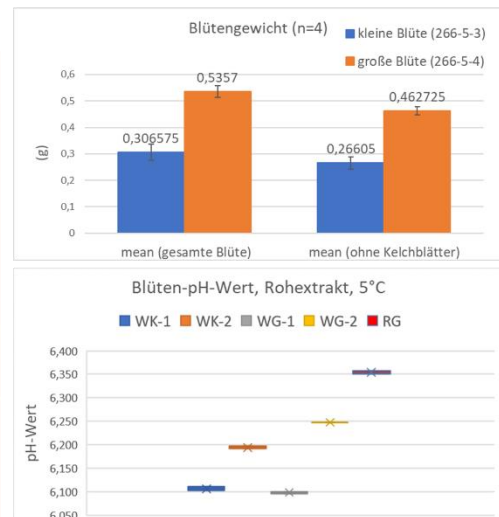
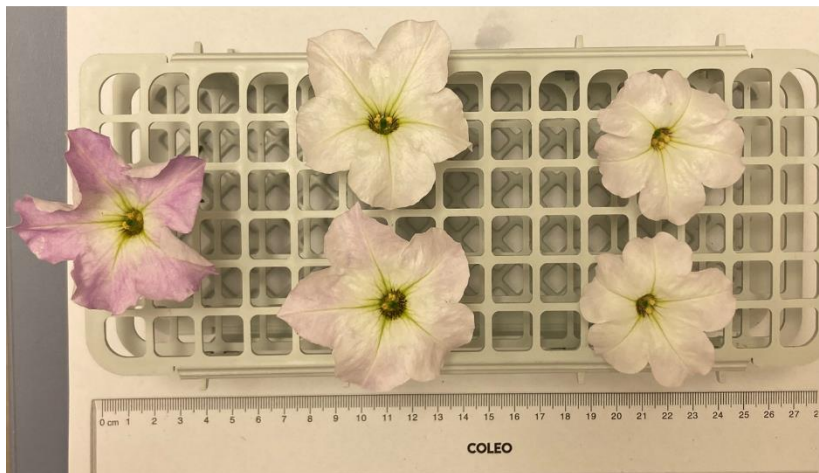


Abbildung 3: (Links) Nach der *In-vitro*-Vermehrung produzierte die Linie 266-5-4 aus der F2-Sammlung sowohl weiße als auch rote Blüten an verschiedenen Zweigen derselben Pflanze. (C) Die Linie 266-5-4 und die Linie 266-5-3 wiesen unterschiedliche Blütengröße/Gewicht auf (rechts oben) sowie unterschiedliche Blüten-pH-Werte (rechts unten). Der Rohextrakt aus den Blütenblättern der Linien 266-5-4 (rot, groß - RG / weiß, groß - WG) und 266-5-3 (weiß, klein - WK) wurde für die pH-Messung verwendet. Rote Blüten wiesen einen höheren pH-Wert auf als weiße Blüten.

Kultur- und Versuchshinweise

Sorten:

Eltern-Linien: *P. exserta*, *P. hybrida* 'Mitchell'

F1 Generation: (*P. exserta* ♂ × ♀ *P. hybrida* 'Mitchell') und (*P. hybrida* 'Mitchell' ♂ × ♀ *P. exserta*)

F2 Generation: [♂ (*P. exserta* (♂ × ♀ *P. hybrida* 'Mitchell')) × ♀ (*P. hybrida* 'Mitchell' (♂ × ♀ *P. exserta*))]

Pflanzung:

Oberflächensterilisierte Blattstückchen wurden auf verschiedenen Medien mit Pflanzenhormonen kultiviert, um die Kallusbildung über mehrere Runden in Klimalichtschränken mit konstantem Licht (50 µmol/(s·m²)) und einer Temperatur von 22°C zu inkubieren. Die Pflänzchen wurden dann in Erde umgesetzt und im Gewächshaus bei Langtag (16 Stunden Licht), 25-22°C (Tag) / 22-20°C (Nacht) und 100 µmol/(s·m²) angezogen. Die etablierten F1- und F2-Linien wurden durch Stecklinge weitervermehrt. Bei den Linien mit variablem Blütenphänotyp wurden die Stecklinge direkt vom phänotypischen Zweig entnommen.

Behandlungen:

Nach der Etablierung der F1- und F2-Populationen wurden die Blütenphänotypen überprüft. Mehrere Linien mit unterschiedlichen Blütenphänotypen wurden für die *In-vitro*-Kultur ausgewählt. Die *In-vitro*-Kultivierung erfolgte durch die Induktion der Kallusbildung aus Blattstücken. Für die optimale Kallus-

Einfluss von *In-vitro*-Kultivierung auf epigenetische Muster am Modellsystem Petunie

Induktion, Erhaltung und anschließende Bewurzelung wurden verschiedene Medientypen und Pflanzenhormonkonzentrationen getestet.

Die Subkultur des Kallus wurde alle 2-4 Wochen mit einem Medium durchgeführt, das NAA und BAP enthielt. Während der Subkultur wurde ein Teil des Kallus auf ein Medium ohne zusätzliche Pflanzenhormone übertragen, um Pflänzchen zu induzieren. Nachdem die Pflänzchen gekeimt waren, wurden sie zur weiteren Regeneration in den Boden gebracht.

Die Genexpressionsanalyse wurde mit RT-qPCR durchgeführt. Die interessierenden Blütenblätter wurden herausgeschnitten und für die RNA-Extraktion und cDNA-Synthese verwendet. Mehrere Kandidatengene für die Bestimmung der Blütenfarbe wurden für die qPCR ausgewählt.

Für die pH-Messung wurden nur die Blütenblätter für die Rohextraktion mit MiniQ-Wasser verwendet. Die pH-Messung wurde entweder unter unkontrollierten Bedingungen (Raumtemperatur) oder unter kontrollierten Bedingungen (auf Eis) durchgeführt.

Kritische Anmerkungen

Die phänotypischen Änderungen in unserem Versuch sind nach der Identifikation stabil auf Folgegenerationen in vegetativer Vermehrung weitergegeben worden, auch wenn die Ausprägung des Phänotyps von Blüte zu Blüte variiert. Interessant aus unserer Sicht ist die genetische Anordnung eines differentiell expremierten Blütenfarbengens unmittelbar neben einem Transposon. Die Weitergabe an mehrere Folgegenerationen lässt einen epigenetischen Effekt zunächst unwahrscheinlich erscheinen, jedoch deutet die unterschiedlich starke Ausprägung des Effekts der farbigen Blütensektoren auf andauernde Transposon-Aktivität. Es sollten sich nun molekularbiologische Analysen von DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und kleinen regulatorischen RNAs anschließen, um die beobachteten Effekte molekular erklären zu können.

Literatur:

BOMBARELY, A., MOSER, M., AMRAD, A., BAO, M., BAPAUME, L., BARRY, C. S., BLIEK, M., BOERSMA, M. R., BORGHI, L., BRUGGMANN, R., ET AL. (2016). Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature plants*, 2(6), 16074. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NPLANTS.2016.74](https://doi.org/10.1038/nplants.2016.74)

HIROCHIKA, H. (1993). Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *The EMBO journal* 12, 2521-2528.

ONG-ABDULLAH, M., ORDWAY, J.M., JIANG, N., OOI, S.-E., KOK, S.-Y., SARPAN, N., AZIMI, N., HASHIM, A.T., ISHAK, Z., AND ROSLI, S.K., ET AL. (2015). Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. *Nature* 525, 533-537.