

Katja Herzog

*Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen
Kulturen und Obst in Dresden–Pillnitz*

Etablierung einer Flp/*FRT*-vermittelten
Rekombination des Selektionsmarkers und
Untersuchungen zur RNAi-induzierten
Resistenzhöhung gegenüber
pilzlichen Schaderregern beim Apfel
(*Malus x domestica* BORKH.)



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt:

Katja Herzog
Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof
76833 Siebeldingen

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind oder herausragende eigenständige Arbeiten aus den Forschungsgebieten des JKI darstellen.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.jki.bund.de Bereich Veröffentlichungen.

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-930037-78-0

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2012.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Reinhold Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. Peter Wycisk)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Etablierung einer Flp/*FRT*-vermittelten Rekombination des Selektionsmarkers und
Untersuchungen zur RNAi-induzierten Resistenzerhöhung gegenüber pilzlichen
Schaderregern beim Apfel (*Malus x domestica* BORKH.)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplom-Biologin Katja Herzog

geb. am 12. Juni 1982 in Radebeul

Gutachter: Prof. Dr. Holger B. Deising
Prof. Dr. Magda-Viola Hanke
Prof. Dr. Klaus Pillen

Verteidigung am: 30. Januar 2012

Halle/Saale 2011

für Lilia

Die Arbeiten zu der hier vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen eines Drittmittelprojektes am Julius Kühn-Institut – Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst in Dresden-Pillnitz durchgeführt.

Die Finanzierung erfolgte durch das Sächsische Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie.

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Julius Kühn – Instituts – ZGO in Dresden-Pillnitz für die sehr schöne Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die fachliche sowie private Unterstützung bedanken! Leider reicht diese Seite nicht aus, um jedem Einzelnen zu danken – denn so viele Menschen haben ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Frau Prof. Dr. M.-V. Hanke danke ich für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Unterstützung in den vergangenen Jahren und die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.B. Deising (MLU Halle-Wittenberg) danke ich sehr für die Betreuung, den unbeschreiblichen Ideenreichtum, die vielen Diskussionen aus der Ferne und die Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. Henryk Flachowsky für die vielseitigen Ideen, die Diskussionen und kritischen Worte in all den Jahren, die mich motiviert haben, diese Arbeit hier abzuschließen. Vielen Dank für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit und meiner Manuskripte.

Kerstin Neumann danke ich sehr für die technische Unterstützung im Labor und das stets offene Ohr in der zum Teil nicht ganz so einfachen Zeit. **Uta Hille** danke ich dafür, dass sie mir alles über *in-vitro*-Apfelsprosse, die Kultivierung unserer kleinen Freunde und die Transformation beigebracht hat.

Meiner Tochter Lilia danke ich so sehr, da sie so oft auf mich verzichten musste. Sie hat mir immer Kraft gegeben, die ich brauchte, um durchzuhalten. Ich danke **meiner Familie**, insbesondere Jan, meinen Eltern und Großeltern, die mich stets mit so viel Motivation unterstützt und mir auch in kritischen Situationen den Rücken freigehalten haben.

Meinen Freunden und ganz besonders Lenni und Anett gilt mein Dank, denn in der wenigen Freizeit, die noch blieb, konnten wir stets zusammen in der Sonne liegen und Kraft tanken.

Dr. Thomas Nothnagel (ZGO Qlb) danke ich für die Versuche mit dem LemnaTec-Scanalyzer. Und auch wenn diese nicht mehr Teil dieser Arbeit geworden sind, habe ich sehr viele neue Erkenntnisse durch unsere Zusammenarbeit erfahren und diese für mein neues Projekt nutzen können! **Dr. Fred Eric** (ZGO Qlb) danke ich für die Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop. **Susanne Köllmer** (AG Prof. Deising) danke ich für die Aufnahmen am Konfokalen Mikroskop. Und **Christian Kröling** (AG Prof. Deising) für Isolierung eines *ChsV*-Genfragments, welches ich für den Vergleich meiner eigenen Sequenzen nutzen konnte.

Prof. Dr. Klaus Pillen möchte ich sehr für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis -----	04
II	Abkürzungsverzeichnis -----	07
III	Abbildungsverzeichnis -----	11
IV	Tabellenverzeichnis -----	13
1	Einleitung -----	14
1.1	Einführung und Aufgabenstellung -----	14
1.2	Herkunft und Bedeutung des Apfels -----	15
1.3	Grundlagen der Apfelmehltau -----	16
1.4	Herausforderungen bei der Züchtung resistenter Sorten -----	18
1.5	Gentechnologische Strategien -----	19
1.5.1	Der Gentransfer -----	19
1.5.2	Selektionsstrategien -----	21
1.6	Flp/ <i>FRT</i> -Rekombinationssystem zur <i>nptII</i> -Entfernung -----	22
1.7	Regulierung der Rekombination -----	23
1.8	Biologie der pilzlichen Schaderreger -----	24
1.8.1	Der Apfelmehltau <i>Podosphaera leucotricha</i> -----	24
1.8.2	Der Apfelschorf <i>Venturia inaequalis</i> -----	25
1.9	RNA-Interferenz -----	27
1.10	Induzierte RNA-Interferenz als innovative Strategie zur Resistenz- erhöhung in transgenen Apfelpflanzen -----	29
2	Material und Methoden -----	32
2.1	Biologische Materialien -----	32
2.1.1	<i>In-vitro</i> -Pflanzenmaterial -----	32
2.1.2	Aufbau, Vermehrung und Erhaltung von Pilzkulturen -----	32
2.2	Agrobakteriumstämme und Vektoren -----	32
2.3	Chemikalien und Geräte -----	33
2.4	Transformation von Apfel -----	34
2.5	Molekularbiologische Methoden -----	34
2.5.1	Herstellung von Bakterienkulturen -----	34
2.5.2	DNA Extraktion -----	35
2.5.2.1	Extraktion genomischer DNA aus Pflanzenmaterial -----	35
2.5.2.2	Extraktion genomischer DNA aus Pilzmaterial -----	36
2.5.2.3	Extraktion von Plasmid-DNA -----	36
2.5.2.4	Quantifizierung von DNA -----	37
2.5.3	RNA Isolierung -----	37
2.5.4	Southern Blot Analyse -----	38
2.5.5	PCR basierende Methoden -----	38
2.5.5.1	Standard-PCR -----	38
2.5.5.2	Long-Range-PCR -----	39

2.5.5.3	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) -----	39
2.5.5.4	TAIL-PCR -----	39
2.5.5.5	Rapid Amplification of cDNA ends-PCR (RACE-PCR) -----	40
2.5.6	Klonierung von PCR-Produkten -----	40
2.5.7	DNA Sequenzanalyse -----	41
2.6	GUS-Test -----	41
2.6.1	Ermittlung der GUS-gefärbten Blattflächen -----	41
2.6.2	Statistische Evaluierung -----	42
2.7	Der Aufbau einer Chitinsynthase-Datenbank zur Identifizierung von isolierten Genfragmenten -----	42
2.8	Alignment und phylogenetische Berechnungen -----	42
2.9	Inhibitorversuche mit Nikkomyzin Z -----	43
2.10	Mikroskopische Untersuchungen und Färbetechniken -----	43
2.11	<i>In-vitro</i> -Versuche mit Fluoreszein-markierten siRNAs -----	44
3	Ergebnisse -----	45
3.1	Flp/ <i>FRT</i> -Rekombinationsystem -----	45
3.1.1	Transformation und Selektion von putativ transgenen Pflanzen -----	45
3.1.2	Nachweis der T-DNA Integration mittels Southern Blot-Analyse und molekulare Charakterisierung der transgenen Linien -----	46
3.1.2.1	Bestimmung der T-DNA-Integrationen mittels Southern Blot Analyse -----	46
3.1.2.2	PCR zum Nachweis von Agrobacterium-Kontaminationen -----	46
3.1.2.3	Long-Range-PCR zur Amplifikation des <i>FRT</i> -flankierten Bereichs zwischen 35S-Promotor und Reportergen -----	47
3.1.2.4	Expressionsanalyse der Transgene in den T-Apfellinien -----	48
3.1.3	Etablierung eines Verfahrens zur induzierten Entfernung des nptII-Gens -----	49
3.1.3.1	Bestimmung der optimalen Temperatur zur Induktion des Gmhsp-Promotors -----	49
3.1.3.2	Bestimmung der optimalen Dauer der Hitzestress-Behandlung -----	51
3.1.3.3	Expression der <i>flp</i> -Rekombinase in Abhängigkeit zur Dauer der Hitzestress-Behandlung --	55
3.1.4	Regeneration von nptII-freien transgenen Apfelsprossen -----	56
3.1.5	Untersuchungen zur Auswirkung einer wiederholten Hitzestress-Behandlung auf die Erhöhung der Regenerationsrate von <i>nptII</i> freien Apfelsprossen -----	60
3.1.6	Molekulare Charakterisierung putativ nptII-freier transgener Apfelsprosse -----	63
3.1.7	Biologischer Nachweis der <i>nptII</i> -Entfernung -----	67
3.2	Untersuchungen zur RNAi-induzierten Resistenzerhöhung in transgenen Apfelpflanzen -----	69
3.2.1	Die Aufnahme von Fluoreszein-markierten siRNA aus pflanzlichen Geweben in pilzliche Strukturen -----	69
3.2.2	Inhibitionsversuche von Chitinsynthasen mittels Nikkomyzin Z -----	72
3.2.3	Isolierung von Chitinsynthase Klasse V-Genen aus den pilzlichen Schaderregern <i>P. leucotricha</i> und <i>V. inaequalis</i> -----	74
3.2.3.1	Isolierung von Chitinsynthase Klasse V-Genfragmenten mit degenerierten Primern -----	74
3.2.3.2	Isolierung des vollständigen <i>Chitinsynthase</i> Klasse V-Gens aus <i>V. inaequalis</i> -----	76
3.2.3.3	Untersuchungen zur Isolierung eines <i>Chitinsynthase</i> Klasse V-Gens aus <i>P. leucotricha</i> ---	79

4	Diskussion-----	80
4.1	Flp/ <i>FRT</i> -vermittelte Entfernung des <i>nptII</i> -Gens-----	80
4.1.1	Voruntersuchungen transgener Apfelinien -----	80
4.1.2	Untersuchungen zum Hitzestress-induzierbaren <i>Gmhsp17.5-E</i> -Promotor -----	81
4.1.3	Die Regeneration vollständig <i>nptII</i> -freier Sprossregenerate -----	85
4.1.4	Flp/ <i>FRT</i> -Rekombinationssystem für die effiziente Entfernung des <i>nptII</i> -Gens und die Möglichkeit zur gezielten Integration neuer Zielgene -----	88
4.1.5	Praxisorientierte Verbesserung des Flp/ <i>FRT</i> -Rekombinationssystems -----	89
4.2	HIGS- eine neue Strategie zur RNAi-basierten Verbesserung der Resistenz in transgenen Kulturpflanzen -----	92
4.2.1	Die Aufnahme pflanzlicher siRNA in die pilzlichen Hyphen-----	92
4.2.2	<i>Chitinsynthase</i> Klasse V-Gene als potentielle Targets zur RNAi-basierten Erhöhung der Resistenz in transgenen Apfelpflanzen-----	94
4.2.3	Isolierung des Chitinsynthase Klasse V Gens aus <i>P. leucotricha</i> und <i>V. inaequalis</i> -----	95
4.2.4	Verbesserung der Resistenz gegenüber Apfelschorf <i>V. inaequalis</i> -----	97
5	Zusammenfassung-----	98
6	Summary -----	100
7	Präsentationen und Publikationen-----	102
8	Literaturverzeichnis -----	103
9	Anhang -----	131
9.1	Der transformierte Monitoringvektor zur Erzeugung von <i>nptII</i> -freien Apfelsprossen-----	132
9.2	Verwendete Puffer, Medien und Chemikalien -----	133
9.3	Verwendete Primer -----	137
9.4	Sonstige Daten -----	138
9.4.1	Sequenztraces (Exemplarisch). -----	138
9.4.2	Chitinsynthase-Datenbank-----	138
9.4.3	Sequenzanalyse der isolierten <i>Chs</i> -Genfragmente-----	139
9.4.3.1	BlastX von PCR-Produkt S10-----	139
9.4.3.2	BlastX von PCR-Produkt Mil7-----	139
9.4.3.3	BlastX von PCR-Produkt Mil23 -----	140
9.4.3.4	BlastX von PCR-Produkt Mil30 -----	140
9.4.4	Genomische Sequenz des putativen <i>ChsV</i> -Gens aus <i>V. inaequalis</i> -----	140
9.4.5	Protein-Alignment ViChsV und GgChsV -----	143
9.4.6	Vergleich der Sequenzen Mil30 und CKChsV-----	145
9.4.6.1	Vergleich der Nukleotidsequenzen -----	145
9.4.6.2	Vergleich der putativen Proteinsequenzen-----	145
	Eigenständigkeitserklärung-----	146
	Erklärung -----	147

II Abkürzungsverzeichnis

35S	<i>CaMV 35S-Promotor</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>alcA</i>	Alkohol-induzierbares Promotorsystem aus <i>Aspergillus nidulans</i>
ANOVA	univariate Varianzanalyse (<i>ANalysis Of VARIance</i>)
ATP	Adeninriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
<i>bar</i>	Phosphinothricinacetyltransferase - Gen
BORKH.	Moritz Balthasar Borkhausen (1760-1806)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BlastX	<i>Basic Local Alignment Search Tool X</i>
BlastN	<i>Basic Local Alignment Search Tool N</i>
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
<i>CaMV</i>	<i>Cauliflower mosaic Virus</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Cf	Cefotaxim
Chs	Chitinsynthase
<i>ChsV</i>	Chitinsynthase der Klasse V
<i>dao1</i>	D-Aminosäure-Oxidase 1
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleinacid</i>)
DNase	DNA abbauendes Enzym
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alia</i>)
<i>f. sp.</i>	<i>forma specialis</i>
<i>flp</i>	Flp-Rekombinase – Gen
<i>FRT</i>	Flp-Erkennungssequenz (<i>Flp recognition site</i>)
EVERH.	Everhart
<i>GgChsV</i>	<i>Chitinsynthase Klasse V</i> Gen aus <i>Glomerella graminicola</i>
gm	gentechnisch modifiziert
<i>Gmhsp17.5E</i>	Hitzestress-induzierbarer Promotor des <i>17.5-E</i> -Gens aus <i>Glycine max</i>
<i>gusA</i>	β-Glucoronidase Gen
<i>HcrVf2</i>	apfeleigenes Resistenzgen gegenüber <i>Venturia inaequalis</i>
HIGS	Wirtinduzierte Genstilllegung (<i>Host-Induced Gene Silencing</i>)
HS	Hitzestress
IBA	Indol-3-Buttersäure (<i>Indole-3-Butyric Acid</i>)
IPTG	Isopropyl beta-D-Thiogalactopyranosid
ITS	<i>Internal Transcript Spacer</i>
kbp	Kilobasenpaar
Km	Kanamycin
λ	Lambda-Phage
L	Carl von Linné (1707-1778)
LB	Linke Border
LEDEB.	Carl Friedrich von Ledebour (1786-1851)
LSG	Regenerationsmedium
M	Molar
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
<i>manA</i>	Mannose-6-Phosphat-Isomerase – Gen

MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
MILL.	Phillip Miller (1691-1771)
MOENCH	Conrad Moench (1744-1805)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MT	Apfelmehltau
N	Normal
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>npjII</i>	Neomycinphosphotransferase II-Gen
NTP	Nukleinsäuretriphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
nt	Nukleotid
PAMP.	Renato Pampanini (1875-1949)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert
<i>PII/2</i>	apfeleigenes Resistenzgen gegenüber <i>Podosphaera leucotricha</i>
<i>putPIChsV</i>	putatives <i>Chitinsynthase Klasse V</i> Gen aus <i>Podosphaera leucotricha</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RAF.	Constantine Samuel Rafinesque (1783-1840)
RB	Rechte Bordersequenz
RISC	RNA-induzierter Stilllegungskomplex (<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleinacid</i>)
RNase	RNA-abbauendes Enzym
RNAi	Ribonukleotidsäure-Interferenz
ROEM.	Max Joseph Roemer (1791-1849)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAS	Statistisches Analyse System
SCHNEID.	Camillo Karl Schneider (1876-1951)

SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIEB.	Philipp Franz Balthasar von Siebold (1796-1866)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	Puffer für den Transfer von DNA vom Agarosegel auf die Nylon-Membran
T-DNA	Transfer-DNA
T-Linie	transgene Apfelinie
TAIL	<i>Thermal Asymmetric Interlaced</i>
<i>taq</i>	DNA-Polymeraseenzym aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
<i>tetC</i>	Glukose-induzierbares Promotorsystem aus <i>E. coli</i>
TDZ	Thidiazuron-PASTANAL ®
TE	Tris-EDTA
Ti	Timetin
Ti-Plasmid	tumorinduzierendes Plasmid
T _m	Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
<i>virG</i>	Virulenzgen aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
V	Volt
vHS	vor der Hitzestress-Behandlung
ViChsV	Chitinsynthase Klasse V Gen aus <i>Venturia inaequalis</i>
Vr-ERE	Eutypin-Detoxifying
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Glucuronsäure

III *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1.1	Charakteristische Merkmale einer Infektion mit dem Apfelmehltau-Erreger <i>P. leucotricha</i>	25
Abbildung 1.2	Charakteristische Merkmale einer Infektion mit dem Apfelschorf-Erreger <i>V. inaequalis</i>	26
Abbildung 1.3	Erzeugung von siRNA-Molekülen aus einem Haarnadel-Konstrukt.....	28
Abbildung 2.1	T-DNA des transformierten binären Monitoringvektors.....	33
Abbildung 3.1	PCR-Ergebnisse für die Gene <i>nptII</i> -, <i>flp</i> - und <i>gusA</i> -Gen in den selektierten T-Linien.....	45
Abbildung 3.2	Southern Blot der Flp-Gus-transgenen Linien mit <i>gusA</i> -Sonde vor der Rekombination.....	46
Abbildung 3.3	PCR zur Analyse der transgenen Linien auf die Anwesenheit verbleibender <i>Agrobacterium</i> -Zellen.....	47
Abbildung 3.4	Amplifikation der T-DNA zwischen 35S Promotor und <i>gusA</i> -Gen vor der Rekombination.....	48
Abbildung 3.5	Expression von <i>EF1α</i> -, <i>nptII</i> -, <i>flp</i> - und <i>gusA</i> -Gen in den T-Linien vor der Rekombination.....	48
Abbildung 3.6	GUS-Färbung Hitzestress-behandelter Sprosse der Linie T670. (a).....	50
Abbildung 3.7	RT-PCR von Hitzestress-behandelten Blattproben der Linie T670.....	51
Abbildung 3.8	Auswertung der Effektivität einer Hitzestress-Behandlung anhand der mittleren relativen GUS-positiven Blattfläche in Abhängigkeit zur Dauer der Hitzestress-Behandlung bei 42°C.....	52
Abbildung 3.9	Amplifikation der T-DNA zwischen 35S Promotor und <i>gusA</i> -Gen nach der Hitzestress-Behandlung.....	53
Abbildung 3.10	Sequenzvergleich vor und nach der Flp-vermittelten Rekombination.....	54
Abbildung 3.11	Ergebnisse der RT-PCR mit <i>nptII</i> - bzw. <i>gusA</i> -spezifischen Primern.....	55
Abbildung 3.12	RT-PCR Ergebnis zur Expression des <i>flp</i> -Rekombinasegens in Abhängigkeit unterschiedlich langer Hitzestress-Behandlungen bei 42°C.....	56
Abbildung 3.13	Regenerationsprozess putativ <i>nptII</i> -freier Apfelsprosse.....	57
Abbildung 3.14	Histologische GUS-Färbung nach der Regeneration von Hitzestress-behandelten Sprossen bzw. nach der Hitzestress-Behandlung.....	58
Abbildung 3.15	RT-PCR zur Untersuchung der <i>gusA</i> - bzw. <i>nptII</i> -Expression nach der Regeneration von GUS-positiven Sprossregeneraten.....	59

Abbildung 3.16	Southern Blot mit <i>gusA</i> -Sonde nach der Regeneration.....	60
Abbildung 3.17	Histologische GUS-Färbung von Sprossregeneraten der Linie T782.....	62
Abbildung 3.18	Amplifikation der T-DNA zwischen 35S-Promotor und <i>gusA</i> -Gen.....	64
Abbildung 3.19	PCR-Ergebnis zur Integration von <i>gusA</i> - und <i>nptII</i> -Gen in regenerierten Sprossen.	65
Abbildung 3.20	RT-PCR nach der Regeneration.	66
Abbildung 3.21	Southern Blot mit <i>nptII</i> -Sonde nach der Regeneration Hitzestress-behandelter Sprosse.....	67
Abbildung 3.22	<i>In-vitro</i> -Kultivierung auf M8-Medium mit und ohne toxisches Paromomycin	68
Abbildung 3.23	Aufnahme und Transport von Tinte in pflanzliche Zellen und die Aufnahme dieser Tinte in pilzliche Strukturen.	70
Abbildung 3.24	Aufnahme von siRNAs aus pflanzlichen Zellen in pilzliche Strukturen. ...	71
Abbildung 3.25	Aufnahme von Fluoreszein-markierten, unspezifischen siRNAs aus Apfelzellen in den Pilz.....	72
Abbildung 3.26	Effekt des Chitinsynthase-Inhibitors Nikkomyzin Z auf das Hyphenwachstum von <i>P. leucotricha</i> und <i>V. inaequalis</i>	73
Abbildung 3.27	Wirkung von Nikkomyzin Z auf die Entwicklung des Apfelmehltau-Erregers <i>P. leucotricha</i>	74
Abbildung 3.28	Phylogenetische Distanzen der amplifizierten PCR-Fragmente putativer Chitinsynthasegene aus <i>V. inaequalis</i> und <i>P. leucotricha</i>	75
Abbildung 3.29	Isolierung des <i>ChsV</i> -Gens aus genomischer DNA von <i>V. inaequalis</i>	76
Abbildung 3.30	Phylogenetische Einordnung des vollständig isolierten Chitinsynthasegens aus <i>V. inaequalis</i>	78
Abbildung 3.31	Konservierte Domänen des <i>ChsV</i> -Proteins von <i>V. inaequalis</i>	79
Abbildung 4.1	T-DNA des Monitoringvektors mit einem zweiten Selektionssystem.....	90
Abbildung A.1	Vektorkarte des Monitoringvektors.....	132
Abbildung A.2	Sequenztrace zur Überprüfung der Sequenzqualität.....	138

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Gegenüberstellung von Dauer der Hitzestress-Behandlungen und dem Anteil an putativ <i>nptII</i> -freien Sprossregeneraten der Linie T670.....	57
Tabelle 3.2	Rekombinationshäufigkeiten in Abhängigkeit von den Hitzestress-Behandlungen.	61
Tabelle 3.3	Ergebnisse des GUS-Tests nach der Regeneration von Hitzestress-behandelten Sprossen der <i>single-copy</i> Linien T781, T782 und T793.	63
Tabelle A.1	Verwendete Primer.	137
Tabelle A.2	Zusammenstellung der Referenzsequenzen in der Chitinsynthase-Datenbank	138

1 Einleitung

1.1 Einführung und Aufgabenstellung

In den letzten Jahren haben gentechnologische Methoden für die praktische Obstzüchtung mehr und mehr an Bedeutung gewonnen. Die größte Schwierigkeit bei der Erzeugung gentechnisch modifizierter Pflanzen besteht in einer effizienten Selektion transgener Zellen. Diese erfolgt beim Apfel (*Malus x domestica* BORKH.) in der Regel im Anschluss an einen *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer mit Antibiotikaresistenzgenen, wie dem Neomycinphosphotransferase-II-Gen (*nptII*). Der Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen wird jedoch in der Öffentlichkeit kritisch diskutiert. Das Europäische Parlament hat deshalb im Oktober 2002 eine EU-Freisetzungsrichtlinie (2001/18/EG) erlassen. Diese Richtlinie empfiehlt, dass die Freisetzung gentechnisch modifizierter Pflanzen, die solche Antibiotikaresistenzgene tragen, nach und nach eingestellt werden sollte. Aus diesem Grund ist die Etablierung alternativer Selektionsstrategien zwingend notwendig. Aktuell ist jedoch noch kein vergleichbares Selektionssystem zur Ablösung des *nptII*-/Kanamycin-Systems beim Apfel verfügbar. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Funktionsfähigkeit und Anwendbarkeit des FLP/*FRT*-Rekombinationssystems zur nachträglichen Entfernung des *nptII*-Gens an Apfel untersucht. Hierfür wurde ein Monitoringvektor erstellt. Auf der funktionellen T-DNA wurde das Selektionsmarkergen *nptII* und das *flp*-Rekombinase-Gen zwischen zwei spezifische *flp*-Erkennungssequenzen (*FRT*) platziert und bilden ein *FRT*-flankiertes Fragment. Für die Detektion von Rekombinationsereignissen wurde dieses Fragment zwischen einen *CaMV* 35S-Promotor und ein *gusA*-Reportergen platziert. Dadurch war eine Expression des Reportergens unmöglich. Erst durch eine FLP-vermittelte Rekombination an den beiden *FRT*-Erkennungssequenzen konnte das gesamte *FRT*-flankierte Fragment aus dem Apfelfgenom heraus geschnitten und das *nptII*-Gen entfernt werden. Es sollten transgene Apfellinien hergestellt und anschließend die Möglichkeit einer Hitzestress-induzierbaren Rekombination des *nptII*-Markergens untersucht werden. Ziel dabei war die Selektion transgener Apfelsprosse, die kein *nptII*-Gen mehr enthalten.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte mit der Entwicklung einer innovativen Resistenzstrategie am Apfel begonnen werden. Ziel dabei war es, eine auf RNA-Interferenz basierende Abwehrstrategie gegenüber den pilzlichen Schaderregern des Apfelmehltaus, *Podosphaera leucotricha*, und des Apfelschorfes, *Venturia inaequalis*, zu entwickeln und zu testen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Aufnahme von 19 nt kurzen siRNAs aus pflanzlichen Zellen in pilzliche Infektionsstrukturen analysiert werden. Als mögliches Zielgen

wurde das *Chitinsynthase* Klasse V-Gen ausgewählt. Die Expression des *ChsV*-Gens ist essentiell während der phytopathogenen Entwicklung des Schaderregers (WERNER *et al.* 2007). Die Stilllegung eines solchen Genes könnte möglicherweise die Krankheitsentwicklung verlangsamen oder sogar hemmen. Deshalb wurde mit der Isolierung von diesem Gen aus den pilzlichen Schaderregern begonnen.

1.2 Herkunft und Bedeutung des Apfels

Die Gattung *Malus* (Apfel) ordnet sich in die Familie der Rosaceae ein und umfasst circa 55 Arten. Zu dieser zählt neben einer Reihe von wildtypischen Arten auch der agrarwirtschaftlich bedeutende Kulturapfel *Malus x domestica* BORKH. (PHIPPS *et al.* 1990). Diese Arten sind alle sehr nah verwandt und können miteinander gekreuzt werden (GESSLER UND PATOCCHI 2007). Erste Formen der Gattung *Malus* entstanden bereits am Ende der Kreidezeit. Aus diesen Formen entwickelten sich dann vor etwa zwei Millionen Jahren die heutigen Apfelwildarten, welche unter anderem in China (*Malus baccata* (L.) MOENCH; *Malus sieboldii* SIEB.), in Westasien (*Malus sieversii* (LEDEB.) ROEM) oder Nordamerika (*Malus fusca* (RAF.) SCHNEID.) beheimatet sind (SCHERMAUL 2005; JUNIPER *et al.* 1996). In Europa gibt es nur wenige Wildarten, wie *Malus sylvestris* MILL. oder *Malus floribunda* SIEB. ex VAN HOUTTE (STACE 1991). Die Wildapfelart *Malus sylvestris* MILL. soll nach der letzten Eiszeit in Südrussland entstanden sein und besiedelt heute die gemäßigte Zone Europas bis Westasien (SCHERMAUL 2005). Der Kulturapfel (*Malus x domestica* BORKH.) stammt jedoch nicht von *Malus sylvestris* MILL. ab, vielmehr wird *Malus sieversii* (LEDEB.) ROEM als Vorfahre vermutet (SCHERMAUL 2005). Der Kaukasus, Zentral- und Westasien zählen zu den wichtigsten Ursprungszentren des Kulturapfels (JUNIPER *et al.* 1996). Dort ist eine sehr hohe genetische Diversität innerhalb der Gattung *Malus* zu finden (JIANG 1986; LI 1989; ZHOU 1999). Diese große Variation an *Malus*-Arten und eine Vielzahl wertvoller Eigenschaften waren für die Entstehung des Kulturapfels bedeutsam (VAVILOV 1930; SCHERMAUL 2005) Welche Wildart an der Entstehung des Kulturapfels hauptsächlich beteiligt war, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt (HARRIS *et al.* 2002).

Der Kulturapfel (*Malus x domestica* BORKH.) zählt neben den Bananen (Ertrag von 95 Millionen Tonnen auf 4,8 Millionen Hektar), den Zitrusfrüchten (Ertrag von 78 Millionen Tonnen auf 1,1 Millionen Hektar) und dem Wein (Ertrag von 74 Millionen Tonnen auf 67 Millionen Hektar) zu den wichtigsten Obstarten im Erwerbsanbau (<http://faostat.fao.org>). So wurden im Jahr 2009 weltweit rund 72 Millionen Tonnen Äpfel produziert, welche auf circa

fünf Millionen Hektar erzeugt wurden (<http://faostat.fao.org>). Dabei hat sich die Apfelproduktion in den letzten 20 Jahren fast verdoppelt. In Deutschland ist der Apfel die wichtigste Art im Erwerbsobstbau. Weltweit sind heute über 20.000 Apfelsorten bekannt, von denen rund 1.600 Sorten in Europa vertreten sind. Dennoch favorisieren die Verbraucher und der Markt nur wenige (circa 10) Apfelsorten. Diese Sorten erfüllen die hohen Anforderungen an die Qualität und Lagerfähigkeit. Der intensive Anbau weniger Sorten hat jedoch zur Folge, dass die Resistenz gegen bedeutende pilzliche Schaderreger bei einem Großteil der am Markt etablierten Apfelsorten (z.B. 'Golden Delicious' oder 'Gala') von den Pathogenen durchbrochen wurde (PARISI *et al.* 1993; CAFFIER UND LAURENS 2005).

1.3 Grundlagen der Apfelzüchtung

Im Mitteleuropäischen Raum wurde der Wildapfel bereits in der Jungsteinzeit durch die gezielte Auslese besonders wertvoller Früchte gefördert, was allmählich zu einer Höherentwicklung führte (SCHERMAUL 2005). Die Anfänge der Apfelzüchtung reichen bis ins erste Jahrhundert n.Chr. zurück. Zu dieser Zeit übernahmen die Römer den Obstbau von den Griechen und entwickelten ihn zu einer Hochkultur. So hatten die Römer durch die Selektion und Vermehrung von Apfelgenotypen mit besonderen Eigenschaften bereits 23 Apfelsorten gezüchtet (SCHERMAUL 2005). Mit der Ausbreitung des Christentums wurde der Obstanbau besonders durch die Klöster gefördert. Durch Kreuzzüge und Pilgerfahrten wurde die genetische Vielfalt erweitert und die Sortenentwicklung gefördert wurde (SCHERMAUL 2005). Im 16. Jahrhundert wurden der Anbau und die Pflege umfangreicher Obstpflanzungen dann auch gesetzlich geschützt. DIEL etablierte 1796 in Deutschland Kreuzungstechniken, wie die Blütenkastration, die Sammlung von Pollen und den Transfer jener Pollen auf die Narbe (WILLIAMS UND KUC 1969). Durch die Verbreitung erster Schriften über obstbauliche Maßnahmen durch CHRIST und DIEL erlebte der Obstbau in Europa gegen Ende des 18. Jahrhunderts einen starken Aufschwung (FRIEDRICH 1993). Seit 1880 wurden gezielte Kreuzungen an staatlichen Institutionen Deutschlands durchgeführt (WILLIAMS UND KUC 1969). Eine systematische Züchtung existiert jedoch erst seit Beginn des 20. Jahrhunderts. Im Fokus der Züchtung standen nun nicht mehr nur der Geschmack und die Größe der Früchte, sondern auch die Verbesserung von Wachstumseigenschaften des Baumes sowie die Erhöhung von Krankheitsresistenzen (SILBEREISEN *et al.* 1996). Bis heute hat sich das Spektrum angestrebter Eigenschaften stark erweitert und beinhaltet eine Kombination aus Fruchtqualität (u. a. Geschmack, Saftigkeit, Lagerfähigkeit), Ertrags- und Wuchsmerkmalen

(u. a. Widerstandsfähigkeit des Baumes gegen abiotische Stressfaktoren) sowie die Resistenz gegenüber einer Vielzahl biotischer Schaderreger (FISCHER UND FISCHER 2002; PEIL UND HANKE 2005). Die Resistenzzüchtung zielt vor allem auf eine Erhöhung der Widerstandsfähigkeit des Apfels gegen pilzliche, bakterielle und tierische Schaderreger. Eine weltweit bedeutende bakterielle Krankheit ist der Feuerbrand (*Erwinia amylovora*). Der Apfelmehltau (*Podosphaera leucotricha*) und der Apfelschorf (*Venturia inaequalis*) zählen zu den wirtschaftlich bedeutenden pilzlichen Schaderregern im Erwerbsapfelanbau. In deutschen Apfelanlagen sind allein bis zu 22 Fungizid-Behandlungen im Jahr notwendig, um die genannten pilzlichen Krankheiten zu kontrollieren (ROßBERG 2007). Der Apfel hat somit – mit Abstand zu anderen Kulturpflanzen und Pflanzenschutzmitteln – einen wesentlich höheren Bedarf an Fungizid-Behandlungen (ROßBERG 2007). Eine Alternative zum Einsatz solcher chemischen Pflanzenschutzmittel ist der Anbau resistenter Apfelsorten. Der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln könnte so auf ein Minimum herabgesetzt, der Arbeits- und Kostenaufwand erheblich reduziert und somit die Apfelproduktion für Verbraucher und Umwelt deutlich verbessert werden (FISCHER UND FISCHER 2002). Bereits am Markt etablierte Apfelsorten können jedoch nicht mit Hilfe klassischer Apfelzüchtungsverfahren verbessert werden. Dies wird durch die bestehende Selbstinkompatibilität, das hohe Maß an Heterozygotie und die enormen Qualitätsunterschiede zwischen dem Kulturapfel und den Wildapfelarten der Gattung *Malus* verhindert (GESSLER UND PATOCCHI 2007). In der klassischen Apfelzüchtung wird die sogenannte Kombinationszüchtung angewendet. Die Auswahl der Elternsorten ist hier abhängig von den gewünschten Zuchtzielen. Für die Einkreuzung von Resistenzgenen kommen überwiegend Wildarten und –hybride, wie die mehlttauresistente Wildapfelhybride *Malus x robusta* in Frage (FISCHER UND FISCHER 1999). Bei einer solchen Kreuzung werden neben dem Resistenzgen jedoch auch eine Reihe unerwünschter Eigenschaften der Wildart an die Nachkommen vererbt. Diese müssen in den kommenden Jahren durch mehrere Rückkreuzungen nach und nach wieder verdrängt werden. Durch die hohe Heterozygotie und die lange Generationszeit des Apfels ist die Züchtung einer neuen Apfelsorte sehr zeitaufwendig (PUITE UND SCHAART 1996). Sie dauert wenigstens 20 Jahre und kostet circa 400.000 € (FENNING UND GERSHENZON 2002). Zusätzlich ist auch die Etablierung einer neuen Sorte auf dem Verbrauchermarkt sehr zeitaufwendig. So hat die Züchtung und Etablierung der Pillnitzer Sorte 'Pinova' mehr als 40 Jahre gedauert (PEIL UND HANKE 2005).

1.4 Herausforderungen bei der Züchtung resistenter Sorten

Bei phytopathogenen Schaderregern dominieren oft einzelne aggressive Rassen (BRASIER 1991). Die Entstehung solcher Rassen ist auf Mutationen zurückzuführen (LESEMANN *et al.* 2006) und wird beispielsweise durch klimatische Veränderungen begünstigt (MILUS *et al.* 2009). Reduzierte Pflanzenschutzmaßnahmen können nur durch den Anbau von ertragsreichen, resistenten Apfelsorten umgesetzt werden. Bereits vor 1910 wurde festgestellt, dass beispielsweise kleinfrüchtige *Malus*-Wildarten schorfresistent sind (CRANDALL 1926; MACHARDY 1996). Deshalb wurde für die Züchtung schorfresistenter Apfelsorten in klassischen Züchtungsprogrammen vor allem das *Rvi6* (alte Nomenklatur *Vf*)-Gen aus dem Sämling 821 von *Malus floribunda* SIEB. ex VAN HOUTTE verwendet (PARISI *et al.* 1993; FISCHER UND FISCHER 1999). Zwischen 1970 und 1989 entstanden durch die Einkreuzung von *Malus floribunda* bereits über 30 monogen, schorfresistente Apfelsorten. Diese Sorten wurden zu diesem Zeitpunkt jedoch nie großflächig kultiviert (PARISI *et al.* 1993). Schon wenige Jahre später wurde eine neue Rasse (Rasse 6) des Apfelschorf-Erregers beschrieben, welcher die monogene *Rvi6* Resistenz dieser Pflanzen bereits durchbrochen hatte (PARISI *et al.* 1993). Und auch gegenüber dem Apfelmehltau existieren verschiedene Resistenzquellen, welche für die Züchtung mehлтаuresistenter Apfelsorten genutzt werden (LESEMANN UND DUNEMANN 2006). Diese Resistenzen stammen beispielsweise aus *Malus x robusta* (Resistenz *Pl1*) bzw. *Malus x zumi* (Resistenz *Pl2*) und wurden von KNIGHT UND ALSTON (1968) beschrieben. Aber auch die Resistenz von Apfelsorten, die das *Pl2*-Gen monogen tragen, wurde ebenfalls bereits durchbrochen (CAFFIER UND LAURENS 2005). Deshalb ist eine Pyramidisierung von Resistenzgenen für eine langfristige Verbesserung der Resistenz unumgänglich (CAFFIER UND PARISI 2007; KELLERHALS *et al.* 2009). Um in der klassischen Apfelzüchtung Eigenschaften des Apfels zu optimieren und eine Pyramidisierung von Resistenzgenen zu realisieren, ist ein sehr hoher Kosten- und Zeitaufwand notwendig. Deshalb spielen vor allem gentechnologische Methoden eine wichtige Rolle, wenn es um eine gezielte Integration einzelner Gene in eine etablierte Sorte geht (SCORZA 1991). Entscheidender Vorteil gentechnologischer Lösungen ist der Erhalt sortentypischer Merkmale. Für die Verbesserung der Resistenzen transgener Apfelsorten gegenüber verschiedenen Schaderregern wurden in der Vergangenheit verschiedene Strategien untersucht. Dafür wurden Gene aus Bakteriophagen (HANKE *et al.* 1998), Bakterien (JAMES *et al.* 1992), Pilzen (BOLAR *et al.* 2000) oder Pflanzen (SZANKOWSKI *et al.* 2003) für die Erzeugung resistenter Apfelsorten eingesetzt. Da in den letzten Jahren auch einzelne apfeleigene Resistenzgene identifiziert und sequenziert werden konnten, wurden diese für die

Transformation anfälliger Apfelsorten eingesetzt. So wurde beispielsweise die schorfanfällige Apfelsorte 'Gala' mit einem Konstrukt transformiert, welches das sehr gut untersuchte Resistenzgen *HcrVf2* aus *Malus floribunda* enthielt (BELFANTI *et al.* 2004; JOSHI *et al.* 2008; PARIS *et al.* 2009; SZANKOWSKI *et al.* 2009). In sich anschließenden Infektionstests waren die *HcrVf2*-transgenen Linien schorfresistent. Apfeleigene Resistenzmechanismen werden jedoch häufig durch ein Gencluster codiert. Diese Gencluster bestehen aus einer Vielzahl von Genen, deren kodierende Sequenzen oder Funktionen bis jetzt jedoch noch weitgehend unbekannt ist (BELFANTI *et al.* 2004). Aus diesem Grund ist die Transformation apfeleigener Resistenzgene bisher kaum möglich.

1.5 Gentechnologische Strategien

Die Transformation von Apfel wird in der Regel mittels eines *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers realisiert. Dabei erfolgt die Selektion transgener Gewebe unter der Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen, wie dem Neomycinphosphotransferase-II-Gen (*nptII*).

1.5.1 Der Gentransfer

Die erste Transformation von Apfel wurde von JAMES *et al.* 1989 publiziert. Seither wurde eine Vielzahl an Transformations- und Regenerationsprotokollen für unterschiedliche Apfelsorten, Apfelunterlagensorten sowie drei Wildarten beschrieben und stetig verbessert (DOLGOV UND HANKE 2006; SZANKOWSKI *et al.* 2009). Für den Transfer der T-DNA wurden dabei drei Transformationsstrategien untersucht: (1) Der Partikelbeschuss (GERCHEVA *et al.* 1994), (2) der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Gentransfer mit einem binären Ti-Plasmid (JAMES *et al.* 1989) und (3) der *Agrobacterium rhizogenes*-vermittelte Gentransfer (LAMBERT UND TEPFER 1991, 1992). Anfängliche Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss verschiedener Antibiotika auf die Regeneration und Vermehrung transgener Zellen und Gewebe (NORELLI UND ALDWINCKLE 1993; YEPES UND ALDWINCKLE 1994). Andere untersuchten den Einfluss des Ausgangsmaterials auf eine optimale Regenerationsfähigkeit (LIU *et al.* 1998; CABONI *et al.* 2000). So haben beispielsweise BOLAR *et al.* (1999) ausschließlich bewurzelte *in-vitro*-Apfelsprosse für die Transformation verwendet. Neben all diesen Strategien und Faktoren ist der Transformationserfolg auch ganz stark vom Genotyp des Apfels abhängig (DE BONDT *et al.* 1994; PUITE UND SCHAART 1996).

Während bei den Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* oder *Nicotiana tabacum* eine Protoplastentransformation mittels Elektroporation oder Polyethylen-Glycol (PEG) sehr effizient eingesetzt wird (AN 1985; DOELLING UND PIKAARD 1993, KOVTUN *et al.* 2000), ist diese Transformationsstrategie beim Apfel weitgehend ineffizient (MADDUMAGE *et al.* 2002). Im Verlauf der letzten Jahre hat sich deshalb die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von verwundeten *in-vitro*-Apfelblättern durchgesetzt (NORELLI *et al.* 1996). Als Transformationsvektoren werden dafür binäre Vektorsysteme verwendet (HOEKEMA *et al.* 1983; HELLENS *et al.* 2000; LEE UND GELVIN 2008). Bei dem *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer wird die T-DNA des binären Vektors in das Zielgenom integriert. Auf dieser T-DNA liegen alle genetischen Elemente (Promotoren, Gene, Terminatoren), welche in das Pflanzengenom eingebaut werden sollen. Natürlicherweise ist diese T-DNA Bestandteil des Ti-Plasmids und enthält für die Übertragung essentielle Onkogene, die sogenannten *vir*-Gene (VAN LAREBEKE *et al.* 1974; WATSON *et al.* 1975; CHILTON *et al.* 1982). Bei der Verwundung der Pflanze werden Acetosyringon und andere Zellwandphenole produziert (MUBMANN *et al.* 2006), welche von dem chemotaktisch aktiven *Agrobacterium* erkannt werden und die Expression der *vir*-Gene (*virG*) induzieren (STACHEL *et al.* 1986; STACHEL UND ZAMBRYSKI 1986; LOAKE *ET AL.* 1989). Diese *vir*-Gene erfüllen ganz wesentliche Funktionen bei der Übertragung und der Integration der T-DNA. Dazu gehört beispielsweise eine Endonuklease-Aktivität des Vir-Proteins zur Aufspaltung der T-DNA an den Bordersequenzen (WANG *et al.* 1987), sowie die Bildung einer Pore in der bakteriellen Membran für den Transport einzelsträngiger T-DNA und von Vir-Proteinen aus der Bakterien- in die Pflanzenzelle und den pflanzlichen Zellkern (WARD UND BARNES 1988; HOWARD *et al.* 1992; CHRISTIE *et al.* 2005; LEE UND GELVIN 2008). Die Vir-Proteine sind zudem an Zellvorgängen in der Wirtszelle beteiligt. Dazu gehören der Transport der T-DNA im Zytoplasma und die Integration ins Wirtsgenom (LEE UND GELVIN 2008). Bereits 1983 wurde erkannt, dass die *vir*-Gene und die T-DNA des Ti-Plasmids auf zwei unabhängige Replikons aufgeteilt werden können (HOEKEMA *et al.* 1983; FRAMOND *et al.* 1983). Die Gene können innerhalb der Agrobakteriumzelle interagieren. Während der Transformation eines solchen binären Vektors wird die T-DNA mittels *vir*-Helfer ins pflanzliche Genom übertragen, wobei die *vir*-Gene selbst nicht in das pflanzliche Genom integriert werden.

1.5.2 Selektionsstrategien

Für die Transformation von Apfelpflanzen wurden schon zahlreiche Selektionsmarkergene und Selektionsstrategien evaluiert. Das Neomycinphosphotransferase II-Gen (*nptII*-Gen) ist das einzige Selektionssystem, welches sich weltweit seit Mitte der 1990er Jahre sehr gut beim Apfel etabliert hat (JAMES *et al.* 1989; HANKE *et al.* 1999; NORELLI *et al.* 1999, FLACHOWSKY *et al.* 2007, 2008) und bisher auch kaum durch alternative Selektionsstrategien ersetzt werden konnte (DEGENHARDT *et al.* 2006; CHEVREAU *et al.* 2007; HÄTTASCH *et al.* 2009). In den letzten Jahren hat jedoch die Suche nach solchen alternativen Strategien erheblich zugenommen. Ursachen hierfür sind beispielsweise die weltweiten, kritischen Diskussionen, welche sich insbesondere gegen den Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen richtet. Vor allem bei landwirtschaftlich genutzten Pflanzen und Obstgehölzen, wie den Apfel, und bei Tieren werden unvorhersehbare Gefahren für die menschliche Gesundheit und Umwelt befürchtet (FLAVELL *et al.* 1992, KAEPLER 2000; KUIPER *et al.* 2001, PUCHTA 2003; DEGENHARDT *et al.* 2006). Für den vorsorglichen Schutz von Gesundheit und Umwelt wurde die Erzeugung von gentechnisch modifizierten Pflanzen ohne den Selektionsmarker *nptII* zu einem der wichtigsten Ziele im Bereich der Gentechnologie, insbesondere beim Apfel (GESSLER UND PATOCCI 2007). Der einfachste Weg schien zunächst, eine Apfeltransformation ohne den Einsatz von Selektionsmarkern durchzuführen (MALNOY *et al.* 2007, 2010). Bei dieser Methode regenerieren neben transgenen jedoch auch nicht-transgene und chimäre Sprosse. Der Aufwand, transgene Regenerate zu detektieren, wäre dabei enorm arbeits- und kostenintensiv (SCHEID 2004). Deshalb wurde nach Strategien gesucht, mit denen ausschließlich transgene Apfelzellen selektiert werden können. Verschiedene Arbeitsgruppen haben hierfür unterschiedliche Methoden untersucht. So wurde die Funktionsfähigkeit des Phosphinothricinacetyltransferase-Resistenz (*bar*)-Gens aus *Streptomyces hygroscopicus* (DE BONDT *et al.* 1996; DOLGOV AND SKRYABIN 2004; SZANKOWSKI *et al.* 2003; LEBEDEV UND DOLGOV 2007), des Mannose-6-Phosphat-Isomerase (*manA*)-Gens aus *Escherichia coli* (DEGENHARDT *et al.* 2006, 2007; FLACHOWSKY *et al.* 2003; ZHU *et al.* 2005), des Eutypin-Detoxifying (*Vr-ERE*)-Gens aus *Vigna radiata* (LEGRAND *et al.* 2003; CHEVREAU *et al.* 2007) oder des D-Aminosäure-Oxidase 1 (*dao1*)-Gens aus *Rhodotorula gracilis* (HÄTTASCH *et al.* 2009) analysiert. Die Anwendung all dieser Technologien hat jedoch gezeigt, dass damit (noch) keine effektive Erzeugung markergenfrier Apfelpflanzen möglich ist. Eine Alternative zu den *nptII*-freien Technologien eröffnet die nachträgliche Entfernung des *nptII*-Gens. Die Entfernung erfolgt dabei im Anschluss an die Selektion gentechnisch modifizierter Zellen. Dies hat den

entscheidenden Vorteil, dass die sehr gut etablierten Transformationsprotokolle des Apfels fortlaufend genutzt werden könnten. Zurzeit existieren zwei unterschiedliche Wege für die Eliminierung des selektiven Markergens aus transgenen Pflanzen (PUCHTA 2003). Die erste Möglichkeit ist die Co-Transformation von Selektionsmarker und Zielgen. Die Integration beider erfolgt dabei an unterschiedlichen Loci des pflanzlichen Genoms, wobei das Selektionsmarkergen im Nachhinein segregiert werden kann. Diese Methode wurde vor allem bei krautigen Kulturpflanzen wie *Brassica napus* oder *Nicotiana tabacum* sehr gut etabliert (DEPICKER *et al.* 1985; BLOCK UND DEBROUWER 1991; DALEY *et al.* 1998). Eine zweite Möglichkeit ist die Entfernung von Selektionsmarkern durch eine intrachromosomale und sequenzspezifische Rekombination. Das System der sequenzspezifischen Rekombination ist für den Apfel besser geeignet, da dieser vegetativ vermehrt werden kann. Vor allem aber ist der Apfel selbstinkompatibel und hat eine sehr lange juvenile Phase und ist deshalb für die Co-Transformation ungeeignet. Die Verwendung eines Rekombinationssystems bewirkt die vollständige Eliminierung des *nptII*-Selektionsmarkergens, wobei dieses innerhalb von zwei spezifischen Rekombinationssequenzen platziert werden muss. An diese beiden Erkennungssequenzen findet eine gezielte Rekombination statt, die eine Entfernung des *nptII*-Gens ermöglicht. Das erste effektive System zur Markergen-Entfernung wurde durch das Cre/*lox* System aus der P1 Bakteriophage ins Leben gerufen. Dabei katalysiert das Cre-Protein die Rekombination zwischen den beiden *lox*-Erkennungssequenzen (DALE UND OW 1991). Eine bedeutende Verbesserung von diesem frühen System erfolgte durch SCHAART *et al.* 2004. Dabei wurde ein chemisch-induzierbares Rekombinationssystem R/*Rs* aus *Zygosaccharomyces rouxii* (ONOUCHI *et al.* 1991) genutzt und die markergenfreien Erdbeerpflanzen mit einem bifunktionalen Selektionsmarker selektiert. Diese beiden Systeme arbeiten sehr effektiv und zuverlässig, sind jedoch nicht frei verfügbar. Mit dem Flp/*FRT*-Rekombinationssystem aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* existiert jedoch noch ein weiteres, nicht-patentiertes System (SORRELL AND KOLB 2005).

1.6 Flp/*FRT*-Rekombinationssystem zur *nptII*-Entfernung

Das Flp/*FRT*-Rekombinationssystem ist ein vielfach eingesetztes System zur Markergen-Entfernung (VETTER *et al.* 1983; LYZNIK *et al.* 1993; LLOYD UND DAVIS 1994; LYZNIK *et al.* 1995; KILBY *et al.* 1995; KERBACH *et al.* 2005; SHAN *et al.* 2006; LYZNIK *et al.* 2007; WOO *et al.* 2009; FLADUNG *et al.* 2010). Das Flp/*FRT*-Rekombinationssystem stammt ursprünglich aus dem 2 µm Plasmid der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (VETTER *et al.* 1983;

FUTCHER 1988). Das System ist im Gegensatz zum bereits beschriebenen *Cre/lox*-System patentfrei zugänglich und arbeitet genauso spezifisch und effektiv (LYZNIK *et al.* 2007). Beide Technologien sind einfach und uneingeschränkt einsetzbar. Es werden keine zusätzlichen Ko-Faktoren benötigt, um ein Rekombinationsereignis zu katalysieren. Die Rekombination erfolgt gezielt an spezifischen *FRT*-Erkennungssequenzen, welche paarweise als Wiederholungssequenzen (ATGC-ATGC) in der übertragbaren T-DNA vorliegen. Innerhalb dieser beiden *FRT*-Sequenzen müssen all jene Gene und Promotoren liegen, welche mit der Rekombination aus dem pflanzlichen Genom wieder entfernt werden sollen. Die Reaktion ist reversibel, da eine *FRT*-Sequenz im Genom verbleibt. An dieser Stelle kann ein *FRT*-flankierendes Fragment auch wieder ins Genom integrieren.

1.7 Regulierung der Rekombination

Um die Flp-vermittelte Rekombination des *nptII*-Gens gezielt auszulösen, wurde ein induzierbarer Promotor ausgewählt. Es existiert eine Vielzahl chemisch-induzierbarer Promotoren, die entweder aus Prokaryoten (*tetC*) oder Pilzen (*alcA*) stammen (WARD *et al.* 1993) und für die kontrollierte Genexpression eingesetzt werden (BAILEY UND ARST 1975; ADAMS *et al.* 1988; WARING *et al.* 1989; WILDE *et al.* 1992; RÖDER *et al.* 1994; KUMAR *et al.* 1996; KENNEDY UND TURNER 1996; MASGRAU *et al.* 1997; THOMPSON UND MYATT 1997; CADDICK *et al.* 1998; GATZ UND LENK 1998; SWEETMAN *et al.* 2002; CHEN *et al.* 2003; DEVEAUX *et al.* 2003; JUNKER *et al.* 2003; NAYAK *et al.* 2006). Ein wesentlicher Aspekt bei der gentechnologischen Veränderung agrarwirtschaftlich bedeutender Kulturarten, wie dem Apfel, ist, dass der Einsatz nicht-pflanzlicher Gene bzw. Genelementen möglichst eingeschränkt werden soll. Auch die Übertragung von Fremdgenen sollte auf ein Minimum reduziert werden. In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Regulierung des *flp*-Rekombinase-Gens mit dem Hitzestress-induzierbaren *Gmhsp17.5E*-Promotor aus der Sojabohne *Glycine max* (CZARNECKA *et al.* 1989). Der *Gmhsp17.5E*-Promotor ist sehr gut untersucht und erfüllt verschiedene Kriterien für eine gezielte Induktion (GATZ UND LENK 1998). Dazu gehört unter anderem eine Hitzestress-abhängige Promotoraktivität, die einfache Handhabung ohne die Notwendigkeit zusätzlicher Substanzen, und die Effektivität (PELHAM 1982; SPENA *et al.* 1985; ROCHESTER *et al.* 1986; SCHMÜLLING *et al.* 1989; TAKAHASHI UND KOMEDA 1989; GOLIC UND LINDQUIST 1995; YOSHIDA *et al.* 1995; NAVARRE *et al.* 2010). Deshalb werden Hitzestress-induzierbare Promotoren auch sehr weitläufig eingesetzt (CUELLAR *et al.* 2006).

1.8 Biologie der pilzlichen Schaderreger

1.8.1 Der Apfelmehltau *Podosphaera leucotricha*

Der Apfelmehltau wird durch den Pilz *Podosphaera leucotricha* (ELLIS und EVERH.) E. S. SALMON verursacht. *P. leucotricha* gehört zu den Ascomyceten innerhalb der Ordnung der *Erysiphales*. Der Apfelmehltau-Erreger ist ein obligat biotropher Pilz und wurde 1888 erstmalig als Schaderreger am Apfel beschrieben (BRAUN 1995).

P. leucotricha überlebt die kalten Wintermonate als Myzel in den infizierten Blattknospen der Apfelbäume. Sobald im Frühjahr die ersten Triebe auskeimen, beginnt der Primärbefall der noch sehr jungen Blätter. Dabei dringt eine 2 µm dünne Penetrationshyph in die Epidermalzellen von jungen Blättern ein (ZEYEN *et al.* 2002) und bildet dort ein Haustorium (Abbildung 1.1a). Bei der Bildung des Haustoriums wird die Plasmamembran der Wirtszelle eingestülpt, aber nicht durchbrochen. Dieses Haustorium ist für die Assimilation von Wasser und Nährstoffen aus der Wirtszelle notwendig. Bereits nach sehr kurzer Zeit werden die Sporenträger (Konidiophoren) ausgebildet. Die für den Mehltau charakteristische Bepuderung der Blätter (siehe Abbildung 1.1b) wird bereits nach wenigen Tagen sichtbar. Die pilzlichen Konidiophoren mit den Konidien sowie das Myzel überwachsen dabei einen Großteil der Blattfläche (siehe Abbildung 1.1c). Die Konidien dienen der asexuellen Vermehrung des Schaderregers und werden durch Wind auf angrenzende Bäume übertragen (XU 1999). Mit der Infektion und Erkrankung weiterer Bäume beginnt die Sekundärinfektion (XU 1999). Die stärkste Sporenentwicklung erfolgt meist im Juni und kann bis in den September andauern (BURCHILL 1965). Während der gesamten Entwicklung verbleibt *P. leucotricha* auf der Oberfläche des Wirtes und in den besiedelten Epidermiszellen. Dabei dringt er nie in die tiefergelegenen Zellschichten (z.B. das Mesophyll) vor. Der Apfelmehltau-Erreger befällt ausschließlich alle oberirdischen, vegetativen Pflanzenteile. Die Infektion neu angelegter Blattknospen erfolgt noch bevor die schützenden Knospenschuppen ausgebildet werden können. Diese Knospen sind dann oftmals weniger kompakt und wesentlich frostempfindlicher (SPOTTS *et al.* 1981). Charakteristisch für einen starken Befall sind eine herabgesetzte Photosyntheseleistung und eine verringerte Transpiration, die vor allem in den jungen Blättern auftritt (ELLIS *et al.* 1981). Dabei werden 90 Prozent der Blattoberfläche mit pilzlichem Myzel bedeckt, wodurch die Assimilation von Kohlenstoff um 85 Prozent reduziert wird. Dies hat zur Folge, dass das Wachstum der Pflanze gestoppt und die Produktion neuer Blätter eingestellt wird (ELLIS *et al.* 1981). Der daraus resultierende Vitalitätsverlust und Schädigungen in Folge einer Primärinfektion von Blütenknospen können

zu hohen Ertragseinbußen führen (SCHANDER 1958). Sobald ein starker Befall auftritt und die Umweltbedingungen günstig sind, können Kleistothecien beobachtet werden. Kleistothecien stellen die Hauptfruchtform dar und dienen der sexuellen Vermehrung des Pilzes. Die Rolle der dabei gebildeten Ascosporen bei Entwicklung und Verbreitung des Erregers ist jedoch unklar (LESEMANN UND DUNEMANN 2006). Jedoch nehmen GESSLER *et al.* (2000) an, dass die sexuelle Phase des Apfelmehltaus wichtiger ist als bisher vermutet wurde.

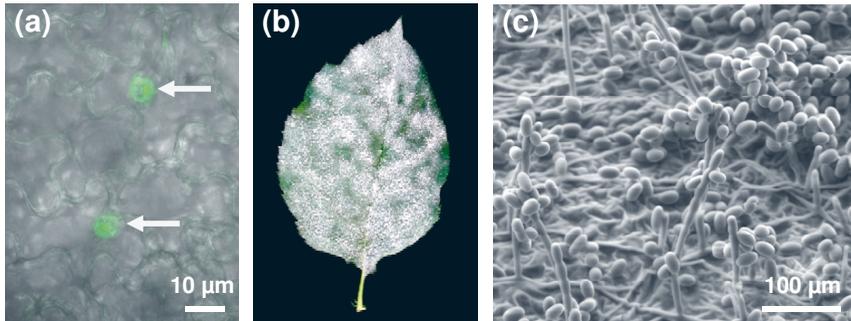


Abbildung 1.1 Charakteristische Merkmale einer Infektion mit dem Apfelmehltau-Erreger *P. leucotricha*. (a) Nach wenigen Stunden keimen die Konidiosporen von *P. leucotricha* aus. Mit einem Appressorium dringt die Keimhyphye in die Epidermiszelle des Apfelblattes ein und entwickelt dort ein Haustorium (Pfeil). Alexa Fluor WGA 488-Färbung der Haustorien und mikroskopische Aufnahme. (b) Die Bepuderung der jungen Apfelblätter ist ein typisches Symptom für eine Infektion mit Apfelmehltau. (c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines erkrankten Blattes. Erkennbar sind Hyphen und die sich entwickelnden Konidiophoren mit den asexuellen Konidien.

1.8.2 Der Apfelschorf *Venturia inaequalis*

Der Apfelschorf wird durch den Pilz *Venturia inaequalis* (COOKE) WINTER verursacht und gehört zu den Ascomyceten innerhalb der Ordnung der *Pleosporales*. Der Apfelschorf-Erreger überwintert als saprophytischer Pilz im infizierten, abgefallenen Laub und besiedelt während der Wachstumsperiode als fakultativ biotropher Pilz lebende Blätter und Früchte (MACHARDY 1996).

Direkt nach dem Austrieb im Frühjahr erfolgt die Primärinfektion durch Ascosporen, welche bei hoher Luftfeuchtigkeit mit dem Wind auf junge Apfelblätter transportiert werden. Für eine Infektion sind feuchte Blätter essentiell. Neben der Feuchtigkeit der Blätter korreliert auch die

Umgebungstemperatur mit der Infektionsrate von *V. inaequalis* (MILLS 1944; MACHARDY UND GADOURY 1989; AYLOR 1998). Auf den Blättern keimen die Ascosporen aus, wobei sich erst eine kurze Keimhyphye entwickelt und anschließend ein Appressorium für die mechanische Penetration ausgebildet wird (WILLIAMS UND KUC 1969). Im Gegensatz zu vielen obligat biotrophen Pilzen wächst *V. inaequalis* subkutikular. Er entwickelt dort aber kein Haustorium, welches in die Pflanzenzelle eindringt. Bei einem Befall des passenden Wirts entwickelt sich das Myzel weiter und bildet ein Stroma, welches zwischen der Kutikula und der Epidermiszelle liegt (WILLIAMS UND KUC 1969). Dort werden nach circa 14 Tagen asexuelle Konidien entwickelt (Abbildung 1.2a), wodurch die Kutikula aufbricht. Zu diesem Zeitpunkt werden die Symptome makroskopisch erkennbar und die kleinen, olivenartigen Areale vergrößern sich sehr schnell. Diese asexuellen Konidien dienen dem Schaderreger vor allem im Sommer der Sekundärinfektion. Die Verbreitung dieser Sporen erfolgt dabei vorwiegend durch den Regen. Innerhalb von zwei bis drei Wochen stirbt das befallene Blattgewebe ab. Typische Krankheitssymptome sind die braunen Flecken auf Blättern (Abbildung 1.2b) und Früchten. Dennoch können die Apfelbäume auch bei einem starken Befall mit *V. inaequalis* Früchte produzieren. Der Apfelschorf verursacht dann jedoch deutlich sichtbare Läsionen an den Früchten, welche erheblich an Marktwert verlieren.

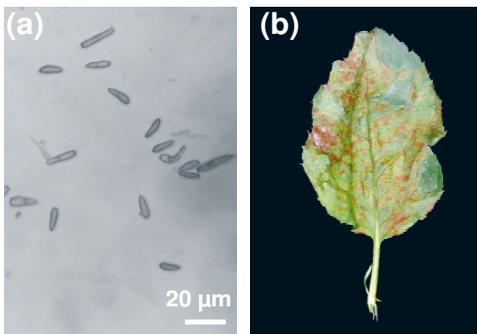


Abbildung 1.2 **Charakteristische Merkmale einer Infektion mit dem Apfelschorf-Erreger *V. inaequalis*.** (a) Asexuelle Konidien, welche eine Sekundärinfektion auf demselben oder an benachbarten Bäumen verursachen. (b) Die braunen Flecken auf den Apfelblättern sind ein typisches Symptom für eine Infektion mit Apfelschorf.

1.9 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi)-vermittelte Stilllegung von Genen wurde bereits bei Pflanzen (WATERHOUSE *et al.* 1998) und Pilzen (ROMANO UND MACINO 1992) sowie bei *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.* 1998), Insekten (MISQUITTA UND PATERSON 1999), Tieren (MCCAFFREY *et al.* 2002) und Menschen (GITLIN *et al.* 2002) untersucht. Dieses weitverbreitete Vorkommen und die verschiedenen Mechanismen zur Genstilllegung weisen auf die große Bedeutung der RNA-Interferenz hin (FARGARD *et al.* 2000; BRODERSEN UND VOINNET 2006). Die RNAi-vermittelte Stilllegung von Genen spielt beispielsweise eine Rolle bei der Genregulation und bei der Abwehr von Viren (VOINNET 2001; TUSTERMAN *et al.* 2002; BAULCOMBE 2004). In der Forschung wird die RNAi-vermittelte Stilllegung von Genen für Funktionsanalysen in einer Vielzahl von Organismen eingesetzt. Auf diese Weise wurden zahlreiche Gene in den Organismen *Caenorhabditis elegans* (KAMATH *et al.* 2003), *Drosophila melanogaster* (ELBASHIR *et al.* 2001), aber auch bei Pflanzen (WESLEY *et al.* 2001; MATTHEW 2004; MIKI UND SHIMAMOTO 2004, MCGINNIS *et al.* 2007) und Säugetieren (SUI *et al.* 2002; JACKSON *et al.* 2003) analysiert. Vor allem bei pilzlichen Organismen erlangt die RNAi-vermittelte Genstillung zunehmend an Bedeutung. Bis vor wenigen Jahren war für genetische Analysen pilzlicher Organismen die Erzeugung von *Knock-Out*-Stämmen erforderlich. Dies erfolgte durch eine sequenzspezifische Rekombination. Die Erzeugung solcher *Knock-Out*-Stämmen ist sehr schwierig, da die Rekombinationsrate nur bei circa einem Prozent liegt (NAKAYASHIKI 2005; NAKAYASHIKI UND NGUYEN 2008). Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz erfolgt die Funktionsanalyse von Genen auch in Pilzen mit Hilfe der Transformation genspezifischer Haarnadel-Konstrukte (NAKAYASHIKI *et al.* 2005; NOWARA *et al.* 2010; SALAME *et al.* 2011; YIN *et al.* 2011). Die dabei entstehenden *Knock-Down*-Transformanten tragen dann noch ein funktionsfähiges Zielgen, das Transkriptionslevel kann in manchen Fällen aber bis auf null herabgesetzt werden (KÜCK UND HOFF 2010). Der allgemeine Mechanismus der RNA-Interferenz ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt (Bezugsquellen: ZAMORE *et al.* 2000; MEISTER UND TUSCHL 2004; JARONCZYK ET AL. 2005; BRODERSEN UND VOINNET 2006). Lebende Zellen sind darauf programmiert, doppelsträngige RNA (dsRNA) abzubauen. Dabei werden dsRNA-Moleküle von einem RNase III-ähnlichen *DICER* Protein erkannt (BERNSTEIN *et al.* 2001). Die komplementären mRNA-Stränge eines Haarnadel-Konstrukts lagern sich zu einer solchen dsRNA zusammen. Die Helikase-Aktivität des *DICER* Proteins katalysiert die Spaltung des RNA Doppelstranges in 21 nt kurze RNA-Moleküle – die *small interfering RNA* (siRNA – Abbildung 1.3, (4)). Die siRNA-Moleküle werden von einem RNA-induzierten

Stilllegungskomplex (RISC) erkannt und gebunden. Mit Hilfe der gebundenen siRNA erfolgt schließlich die Bindung an komplementäre Einzelstrang-mRNA (Abbildung 1.3, (6)). Die Einzelstrang-mRNA wird daraufhin zu weiteren 21 nt kleinen siRNA-Molekülen abgebaut (Abbildung 1.3, (7)).

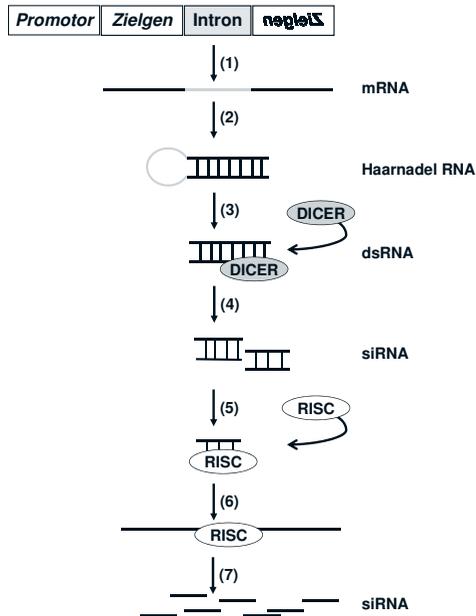


Abbildung 1.3 Erzeugung von siRNA-Molekülen aus einem Haarnadel-Konstrukt.

Ein Haarnadel-Konstrukt enthält eine Haarnadel-Sequenz des Zielgens. Eine solche Haarnadel-Sequenz besteht aus etwa 400 bp kurzen Sequenzabschnitt des Zielgens. Der codierende Sequenzabschnitt wird in 5'-3'-und in 3'-5'-Orientierung eingebaut. Die beiden komplementären Sequenzabschnitte werden von einem Intron (grau) getrennt. (1) Nach der Transkription entsteht eine mRNA mit den zwei komplementären Sequenzabschnitten. (2) Diese beiden komplementären mRNA-Stränge schließen sich zu einem Doppelstrang zusammen und bilden eine Haarnadel-RNA. Das Intron bildet eine Schleife am 3'-Ende. (3) Das Intron wird durch *Splicing* entfernt (SMITH *et al.* 2000) und ein DICER-Enzym bindet an die entstandene doppelsträngige RNA (dsRNA). (4) Das DICER-Enzym ist ein Ribonuklease (RNase) III Enzym und spaltet die dsRNA in kurze, doppelsträngige siRNA (TIJSTERMAN UND PLASTERK 2004). (5) Diese kleinen siRNA-Moleküle werden von einem RNAi-Induzierenden-Stilllegungs-Komplex (RISC) erkannt, gebunden und in einzelsträngige siRNA zerlegt (PREALL UND SONTHEIMER 2005; FILIPOWICZ 2005). (6) Das komplementäre Gen wird von dem RISC-Enzym detektiert und ebenfalls in kurze, siRNAs abgebaut (7).

1.10 Induzierte RNA-Interferenz als innovative Strategie zur Resistenzerhöhung in transgenen Apfelpflanzen

Die Induktion einer RNA-Interferenz kann durch das Einbringen von dsRNA in einen Organismus erfolgen. Dies erfolgt, beispielsweise bei Insekten, durch die Injektion synthetisierter dsRNA (MEYERING-VOS *et al.* 2006) oder bei Säugetierzellen durch eine direkte siRNA-Transfektion (HOSHIKA *et al.* 2005). In monokotylen Pflanzen, wie Gerste, Mais oder Weizen, wurden dsRNA, aber auch Haarnadel-Konstrukte, durch den Beschuss von Epidermalzellen mit Mikroprojekten übertragen (WATERHOUSE UND HELLIWELL 2003). Darüber hinaus kann die Induktion auch durch die Expression eines Haarnadel-Konstrukts erfolgen. Obligat biotrophe Pilze, wie *P. leucotricha*, können jedoch nicht nach üblichen Transformationsprotokollen transformiert werden, denn die wirtabhängige Lebensweise verhindert die gezielte Selektion transgener Zellen. Es existiert jedoch noch eine weitere Strategie, die wirtinduzierte Genstilllegung (HIGS). Dies ermöglicht erst eine Funktionsanalyse von Genen in obligat biotrophen Pilzen. In verschiedenen Studien wurde die wirtinduzierte Genstilllegung bereits erfolgreich für die Funktionsanalyse von Genen des obligat biotrophen Gerstenmehltau-Erregers *Blumeria graminis* bzw. dem Streifenrost-Erreger *Puccinia striiformis f. sp. tritici* eingesetzt (NOWARA *et al.* 2010; YIN *et al.* 2011). Die Wirtspflanzen wurden mit einem pilzspezifischen Haarnadel-Konstrukt transformiert. Nachdem die transgenen Pflanzen mit dem Schaderreger inokuliert wurden, konnte eine drastische Abnahme der Krankheitsentwicklung im Vergleich zu nicht-transformierten Kontrollpflanzen beobachtet werden (NOWARA *et al.* 2010; YIN *et al.* 2011). Deshalb wird angenommen, dass es während der Infektion zu einer Stilllegung des komplementären Gens im Pathogen kommt. Ein solches Haarnadel-Konstrukt sollte ein etwa 300 bis 800 bp-Nukleotidfragment des Zielgenes enthalten (WATERHOUSE UND HELLIWELL 2003; NOWARA *et al.* 2010). Durch die Expression des Haarnadel-Konstrukts werden in den transgenen Wirtszellen siRNA produziert. Diese sind als RNAi-Signale wirksam (NOWARA *et al.* 2010). Dass die Transformation von Apfelblättern mit einem Haarnadel-Konstrukt zur Produktion von siRNA-Moleküle führt, welche über die Leitbahnen systemisch transportiert werden, wurde von HÄTTASCH *et al.* (2008) gezeigt. Der Einsatz eines solchen RNAi-induzierenden Haarnadel-Konstrukts in Kulturpflanzen könnte die Resistenz gegenüber einem spezifischen Schaderreger erhöhen. Hierfür muss zunächst ein essentielles Pilzgen ausgewählt werden, dessen Deletion bzw. Stilllegung den Pilz abtötet bzw. dessen phytopathogene Lebensweise unmöglich macht. Eine Übersicht über eine Auswahl an pilzlichen Zielgenen, deren Funktion

bereits mittels RNA-Interferenz analysiert worden ist, wurde von SALAME *et al.* (2011) zusammengestellt.

Wie bereits beschrieben, ist die klassische Resistenzzüchtung sehr zeit- und kostenintensiv. Dabei ist es unmöglich am Markt etablierte Sorten zu verbessern. Aus diesem Grund wurden in der hier vorliegenden Arbeit Untersuchungen durchgeführt, welche sich vorbereitend mit der wirtinduzierten Stilllegung eines Pilzgenes beschäftigen. Für eine praxisorientierte Verbesserung der Resistenz transgener Apfelpflanzen gegenüber *P. leucotricha* und *V. inaequalis* wurde die Stabilität der pilzlichen Zellwand als Angriffsziel ausgewählt. Bereits 1895 zeigte MIYOSHI die Fähigkeit von Pilzhypen, pflanzliche Membranen zu durchbohren. Dabei ist das Wachstum der Hyphen, insbesondere an den Hyphenspitzen, für das Eindringen in lebendes oder totes organisches Material essentiell (WESSELS 1993). Pilzliche Zellen sind in der Lage, sich auch bei sehr ungünstigen Umweltbedingungen zu entwickeln. Die Widerstandsfähigkeit liegt vor allem an der pilzlichen Zellwand, deren Hauptbestandteil Chitin ist. Chitin ist ein β -1,4-verknüpftes Polysaccharid aus N-Acetylglucosamin (BARTNICKI-GARCÍA 1968). Der Chitinmetabolismus schließt die Synthese, den Abbau und die Verknüpfung des Polymers mit anderen Zellwandkomponenten ein. Es ist ein essentieller Prozess für das pilzliche Wachstum, die Bildung der Hyphen und die Entwicklung widerstandsfähiger Konidien (AMNUAYKANJANASIN *et al.* 2003; MADRID *et al.* 2003). Da die Hemmung der Chitinsynthese das Überleben des Pilzes deutlich vermindert (RUIZ-HERRERA *et al.* 2002; RUIZ-HERRERA UND SAN-BLAS 2003; RONCERO 2002; MARTÍN-UDÍROZ *et al.* 2004; WALLY *et al.* 2008), zielen beispielsweise antimykotische Substanzen aus *Aspergillus giganteus* zur Behandlung von Patienten auf die pilzliche Chitinsynthese (HAGEN *et al.* 2007). Die Produktion von Chitinasen ist zudem ein effektiver pflanzlicher Abwehrmechanismus gegen pilzliche Pathogene. Diese Enzyme hydrolysieren das Chitin in der pilzlichen Zellwand und hemmen auf diese Weise das Wachstum des Pilzes (FERREIRA *et al.* 2007). Um die Wirkung von Chitinasen bei einer krankheitsanfälligen Apfelsorte zu untersuchen, wurde diese mit einem *Endochitinase*-Gen aus *Trichoderma herzianum* transformiert. Die Endochitinase hydrolysiert die β -1,4-glycosidische Bindung des N-Acetylglucosamin-Polymers in der pilzlichen Zellwand, wodurch die Resistenz der transgenen Pflanzen gegenüber dem Schaderreger *V. inaequalis* deutlich verbessert wurde (BOLAR *et al.* 2000). Bei der pilzlichen Chitinsynthese sind eine Vielzahl von Genen involviert (RONCERO 2002; CHIGIRA *et al.* 2002; TAKESHITA *et al.* 2006). Dazu gehören auch die sogenannten Chitinsynthasen. Basierend auf ihrer Aminosäuresequenz können die Chitinsynthasen inzwischen in acht Klassen eingeteilt werden. Dabei haben die

Aminosäuresequenzen aller Klassen konservierte Chs-Domänen, aber nur die Klassen V und VI eine Myosin-ähnliche Motordomäne (MUNRO UND GOW 2001; WERNER *et al.* 2007). Studien mit unterschiedlichen pilzlichen Organismen haben gezeigt, dass die Deletion der Chitinsynthase, insbesondere der Klasse V, die Zellwandstabilität signifikant herabsetzt. Dabei wurden *Knock-Out*-Mutanten erzeugt, welche nicht mehr fähig waren, eine normale Morphologie von Hyphen bzw. Konidien zu entwickeln (MÜLLER *et al.* 2002; WERNER *et al.* 2002; AMNUAYKANJANASIN *et al.* 2003; MADRID *et al.* 2003; WEBER *et al.* 2006; TAKESHITA *et al.* 2006; WERNER *et al.* 2007). WERNER *et al.* (2007) haben das *ChsV*-Gen in *Glomerella graminicola* deletiert. Anfällige Maisblätter wurden mit *Knock-Out*-Stämmen inokuliert. Dabei wurde festgestellt, dass die verwendeten Stämme nicht mehr fähig waren, die Maisblätter zu infizieren.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollen grundlegende Untersuchungen erfolgen, welche das Ziel haben, die Aufnahme bzw. den Transport synthetischer siRNAs aus Apfelzellen in den Apfelmehltau-Erreger *Podosphaera leucotricha* zu untersuchen. Zudem sollte die Wirkung des Chitinsynthasehemmers Nikkomyzin Z auf die Hyphenmorphologie von Apfelschorf und Apfelmehltau analysiert werden und die Genisolierung der *Chitinsynthase*-Gens der Klasse V von beiden Schaderregern begonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Biologische Materialien

2.1.1 *In-vitro*-Pflanzenmaterial

Für die Transformation von Apfel (*Malus x domestica* BORKH.) und die Kulturerhaltung des Apfelmehltau-Erregers *Podospaera leucotricha* (ELLIS und EVERH.) SALM. wurde eine *in-vitro*-Sprossspitzenkultur eines Sämlings der Apfelsorte 'Pinova' verwendet. Die Sprosse wurden auf M8-Vermehrungsmedium kultiviert und bei einer Temperatur von 22°C und 16 h Licht (3.000-4.000 Lux) angezogen. Zur Erhaltung und Vermehrung der Kultur wurden die Apfelsprosse alle vier Wochen vom Kallus entfernt und auf frisches M8-Vermehrungsmedium überführt.

2.1.2 Aufbau, Vermehrung und Erhaltung von Pilzkulturen

Die Kultivierung und Erhaltung des Apfelmehltau-Erregers *P. leucotricha* (ELLIS und EVERH.) E.S.SALMON erfolgte auf Sprossen einer *in-vitro*-Apfelkultur und wurde, wie bei URBANIETZ UND DUNEMANN (2005) beschrieben, durchgeführt. Für den Aufbau einer Sterilkultur von *P. leucotricha* wurden Konidien von infizierten Apfelblättern aus dem Freiland mit einer Impfnadel abgenommen und auf einzelne *in-vitro*-Blätter eines anfälligen Sämlings der Sorte 'Pinova' übertragen. Diese Blätter wurden anschließend auf einem Sorbitolmedium bei 22°C und 16 h Licht (3.000-4.000 lux Auflicht) für sieben bis 14 Tage kultiviert. Zur Erhaltung der Kultur wurden *in-vitro*-Apfelsprosse des 'Pinova'-Sämlings auf M8-Vermehrungsmedium ohne Hormone übertragen. Sichtbare Konidien wurden von infizierten *in-vitro*-Blättern abgenommen und auf junge Sprosse übertragen.

Die Kultivierung und Erhaltung von *Venturia inaequalis* (COOKE) WINTER erfolgte auf Malzextraktagar bei 18°C im Dunkeln. Für die DNA- bzw. RNA-Isolierung wurde der Pilz auf Cellophane325P-32,5 g m⁻²-Papier (Hintze & Kunick GmbH, Berlin) kultiviert. Dieses wurde direkt nach dem Autoklavieren auf das Nährmedium gelegt.

2.2 Agrobakteriumstämme und Vektoren

Für die Transformation von Apfelblättern wurde ein Monitoringvektor erstellt (vollständige Vektorkarte in Abbildung A.1). Dieser Vektor basiert auf dem binären Plasmid pB-Npt-Hsp-Flp-Gus (DNA Cloning Service, Hamburg). Der Monitoringvektor wurde in den

Agrobacterium tumefaciens-Stamm GV3101-pMP90RK übertragen. Innerhalb der T-DNA (Abbildung 2.1) trägt der Vektor das *nptII*-Gen als Selektionsmarker, das *gusA*-Gen als Reporter und das *flp*-Rekombinase-Gen für die gezielte Rekombination des *FRT*-flankierten Fragments (schwarze Markierung in Abbildung 2.1).

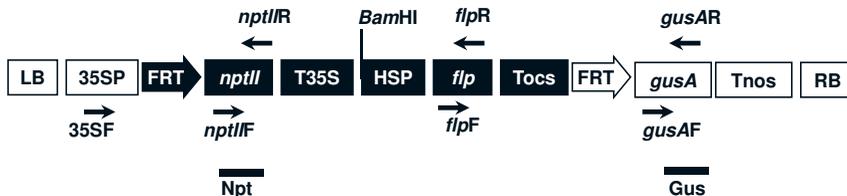


Abbildung 2.1 T-DNA des transformierten binären Monitoringvektors. Die übertragene T-DNA enthält einen *CaMV* 35S-Promotor (35SP), das *FRT*-flankierte Fragment sowie das *gusA*-Reporter-gen. Auf dem *FRT*-flankierten Fragment befindet sich das *nptII*-Gen als Selektionsmarker sowie das *flp*-Rekombinase-Gen. Die Expression des *flp*-Gens wird mittels Hitzstress-induzierbaren Promotor (HSP) reguliert. Dieses *FRT*-flankierte Fragment trennt das Reporter-gen räumlich vom *CaMV* 35S-Promotor. Erst die vollständige Rekombination führt zur Expression des Reporter-gens. Zusätzlich sind die für die PCR-Reaktionen eingesetzten Primer (Pfeile) markiert sowie die Positionen der Southern Blot-Sonden und die Restriktionsschnittstelle. LB – linke Bordersequenz der T-DNA; 35SP – *CaMV* 35S Promotor; *nptII* – Neomycinphosphotransferase II; HSP – Hitzstress-Promotor *Gmhsp17.5E*; *flp* – Rekombinase; *gusA* – β -Glucuronidase; T35S/Tocs/Tnos – Terminatoren; F – Vorwärtsprimer; R – Rückwärtsprimer; RB – rechte Bordersequenz der T-DNA.

2.3 Chemikalien und Geräte

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Auf alle weiteren Bezugsquellen für Enzyme, Kits oder spezielle Reagenzien wird an den entsprechenden Stellen im Text verwiesen. Eine Zusammenstellung aller verwendeten Puffer, Lösungen und Reagenzien findet sich im Anhang (Punkt 9.2). Synthetische Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Primer und die dazugehörigen Schmelztemperaturen (T_m) finden sich in Tabelle A.1. im Anhang (Punkt 9.3).

Sofern nicht anders angegeben, wurde mit der Mikrozentrifuge 5415 R und dem Rotor GE-019 F45-24-11 26451 (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Auf alle weiteren Gerätetypen und Hersteller wird an den entsprechenden Stellen im Text verwiesen.

2.4 Transformation von Apfel

Für die Erzeugung transgener Apfelpflanzen wurden junge Blätter von *in-vitro*-Sprossspitzenkulturen verwendet und diese mit dem *A. tumefaciens*-Stamm GV3101-pMP90RK-pB-Npt-Hsp-Flp-Gus inokuliert. Die Herstellung des Inokulums und die Inokulation junger Apfelblätter erfolgten wie bei NORELLI *et al.* (1996) beschrieben. Die Co-Kultivierung wurde für drei Tage durchgeführt. Die Regeneration erfolgte auf selektivem LSG-Regenerationsmedium mit 500 µg ml⁻¹ Timentin, 500 µg ml⁻¹ Cefotaxim und 100 µg ml⁻¹ Kanamycin. Putativ transgene Regenerate wurden nach 12 bis 15 Wochen abgenommen und zu transgenen Linien vermehrt. Dazu wurden die regenerierten Sprosse zunächst auf M8-Vermehrungsmedium mit 500 µg ml⁻¹ Timentin und 100 µg ml⁻¹ Paromomycin und später auf M8-Vermehrungsmedium mit 500 µg ml⁻¹ Timentin und 100 µg ml⁻¹ Kanamycin vermehrt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung von Bakterienkulturen

Für die Herstellung von Bakterienkulturen wurden 3 ml LB-Medium mit einem selektiven Antibiotika versetzt und über Nacht im Schüttler (GFL[®] 1083, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) bei 28°C (*A. tumefaciens*) bzw. 37°C (pCR[®]-2.1-TOPO[®]-transformierte *E. coli*) mit einer Schüttelfrequenz von 300 Schlägen pro Minute kultiviert. Der transgene *A. tumefaciens*-Stamm GV3101-pMP90RK-pB-Npt-Hsp-Flp-Gus wurde in Medium mit 100 µg ml⁻¹ Streptomycin und 500 µg ml⁻¹ Rifampicin angezogen. Rekombinante *E. coli*-Zellen wurden entweder mit 50 µg ml⁻¹ Ampicillin (pCR[®]-2.1-TOPO[®]) bzw. 50 µg ml⁻¹ Kanamycin (pCR[®]-XL-TOPO[®]) angezogen.

2.5.2 DNA Extraktion

2.5.2.1 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von genomischer DNA aus Blattmaterial erfolgte entweder mit dem DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) oder mittels Microprep und anschließender Ethanol/Natriumacetat-Fällung (Southern Blot).

Bei der Verwendung des DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) wurden 50 mg frisches Blattmaterial entnommen und unter flüssigem Stickstoff mit 5 mm Stahlkugeln und einer Schwingmühle (Retsch® MM300, Retsch GmbH, Haan) mit einer Frequenz von 30 Hz (1400 Schlägen min^{-1}) für 2,5 min zerkleinert. Die sich anschließende DNA-Extraktion erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die genomische DNA wurde in 100 μl ddH₂O gelöst.

Für die DNA-Extraktion mittels Microprep-Methode wurden 100 mg frisches Blattmaterial von den transgenen Pflanzen abgenommen und unter flüssigem Stickstoff mit einer Schwingmühle (Retsch® MM300, Retsch GmbH, Haan) mit einer Frequenz von 30 Hz (1400 Schlägen min^{-1}) für 2,5 min zerkleinert. Im Anschluss wurden 700 μl Microprep-Puffer dazugegeben und für 60 min bei 600 rpm und 65°C im Comfort Thermomixer (Aufsatz 5350005023 für 1,5 ml Eppendorfgefäße, Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit 1x Vol. Isoamyl:Chloroform (1:24) versetzt, für 0,5 min gemischt und anschließend für 5 min bei 10.000 rpm mit der Mikrozentrifuge 5415 R (Rotor GE-019 F45-24-11 26451, Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase ist farblos und enthält die DNA. Diese Phase wurde abgenommen und die DNA mit 500 μl Isopropanol für 5 min im Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach) gefällt und bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 700 μl eiskaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen und für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das Pellet wurde für 10 min mit einer Vakuumzentrifuge (GeneVac SF 50, Biometra®, Göttingen) getrocknet und in 100 μl ddH₂O gelöst. Zur Fällung der DNA aus der wässrigen Lösung wurde 1x Vol. der gelösten DNA mit 1/10x Vol. 3 M NaAc, pH 4,5 und 2,5x Vol. eiskaltem Ethanol (98 % v/v) versetzt und die DNA für 2 h bei -20°C gefällt. Nach einer 45-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 500 μl eiskaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen. Nach dem Aussalzen wurde erneut für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Das DNA-Pellet wurde für 20 min mit einer Vakuum Pumpe (GeneVac SF 50, Biometra®, Göttingen) getrocknet und anschließend in 35 μl TE-Puffer gelöst.

2.5.2.2 Extraktion genomischer DNA aus Pilzmaterial

Da zu Beginn der Arbeiten der Apfelmehltau, jahreszeitlich bedingt, nicht in Kultur genommen werden konnte, wurde zunächst bereits vorhandene genomische DNA von *P. leucotricha* verwendet. Diese wurde von S. Lesemann und F. Dunemann (Julius Kühn Institut, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst) zur Verfügung gestellt. Die genomische DNA wurde als erstes mit dem Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, München) amplifiziert. Dazu wurden 10 ng der genomischen *P. leucotricha*-DNA eingesetzt. Die Durchführung der Amplifikation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Später erfolgte die Isolierung genomischer DNA von *P. leucotricha* aus erkrankten Apfelblättern mit dem DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden). Dazu wurden im Vorfeld 50 mg des Apfelmehltau-Erregers von der Oberfläche infizierter *ex-vitro*-Apfelblätter mit Hilfe einer Vakuum-Blot-Pumpe (Vacu-Aid Plot-Processing-Pump, Hybaid, Ashford, UK) abgesaugt und unter Stickstoff mit dem Precells-glass Kit 0,5 mm (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und einer Retsch-Schwingmühle (Retsch[®] MM300, Retsch GmbH, Haan) mit einer Frequenz von 30 Hz (1400 Schlägen min⁻¹) für 3 min pulverisiert. Die DNA-Extraktion erfolgte anschließend nach Angaben des Herstellers. Die extrahierte DNA wurde mit Apfelmehltau-spezifischen ITS-Primern PIITSF und PIITSR überprüft. Diese Primer wurden von der ITS-Sequenz (NCBI: EU148597) des Apfelmehltaus abgeleitet.

Für die DNA-Extraktion aus *V. inaequalis* wurde der Pilz vom Zellophanpapier abgenommen und ebenfalls mit einer Retch-Schwingmühle (wie beschrieben) pulverisiert. Die DNA-Isolierung erfolgte anschließend mit dem DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden). Gelöst wurde die DNA in 50 µl ddH₂O.

2.5.2.3 Extraktion von Plasmid-DNA

Für die Extraktion von Plasmid-DNA wurde eine 3 ml *E. coli*-Übernachtkultur angezogen. Am nächsten Tag wurde diese mit der Mikrozentrifuge 5415 R (Rotor GE-019 F45-24-11 26451, Eppendorf AG, Hamburg) für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Gene JET[™] Plasmid Miniprep Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Anweisung des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl Eluierungspuffer gelöst.

2.5.2.4 Quantifizierung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration extrahierter DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Die Quantifizierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese. Hierfür wurde 1 μ l der extrahierten Plasmid-DNA zusammen mit 2 μ l Ladepuffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und 7 μ l ddH₂O gegen unterschiedlich konzentrierte λ -DNA-Mengenstandards (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) auf ein Agarosegel (1 % (w/v) Agarose, 1x TAE) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 20 min bei 90 V. Die Konzentrationen wurden im Anschluss mit der Geldokumentationseinheit Fluorimager (BioRad Laboratories GmbH, München) ermittelt.

2.5.3 RNA Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA von Pflanzen und Pilzen erfolgte mit dem Invisorb[®] Spin Plant RNA Mini Kit (Invitek, Berlin). Hierfür wurden 50 mg Pilzmaterial mit den Precellsglass Kit 0,5 mm (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) oder 100 mg Pflanzenmaterial mit 5 mm Stahlkügelchen unter flüssigen Stickstoff und einer Retsch-Schwingmühle (Retsch[®] MM300, Retsch GmbH, Haan) mit einer Frequenz von 30 Hz (1400 Schlägen min⁻¹) für 2,5 min pulverisiert. Die RNA-Isolierung erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers. Für die Zellyse wurde der Lysis Solution RP-Puffer verwendet. Die Gesamt-RNA wurde in 50 μ l Eluierungspuffer gelöst. Für die Entfernung von DNA-Kontaminationen erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolierung ein DNase I-Verdau. Dieser wurde mit dem DNA-free[™] Kit (Applied Biosystems[™], Carlsbad, CA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss folgte die cDNA-Synthese.

Zur Herstellung von cDNA aus isolierter Gesamt-RNA wurde das RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mit 1 μ g Gesamt-RNA, 1 μ l Oligo(dT)₁₈-Primer, 5x Reaktions-Puffer und 1 μ l der RevertAid[™]M-MULV RT (Transkriptase) nach Anleitung des Herstellers. Im Anschluss wurde die cDNA-Synthese auf DNA-Kontaminationen hin überprüft. Dies erfolgte mit einer Standard-PCR und den *EF1 α* -spezifischen Primern (*EF1 α F* und *EF1 α R*). Amplifiziert wurde ein Teil des Apfel-*housekeeping* Gens *EF1 α* (NCBI: DQ341381). In diesem Bereich enthält das Gen ein Intron, wodurch PCR-Fragmente mit unterschiedlichen Größen bei DNA bzw. cDNA vervielfältigt werden (FLACHOWSKY *et al.* 2005, 2007).

2.5.4 Southern Blot Analyse

Für die Herstellung der Hybridisierungssonden wurden ca. 400 bp große Sequenzabschnitte aus den kodierenden Bereichen des *nptII*- bzw. *gusA*-Gens ausgewählt. Für diese wurden spezifische Primer abgeleitet (*nptII*F1/R1 bzw. *gusA*F/R) und für die Synthese genspezifischer Sonden eingesetzt. Diese wurde mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Der Southern Blot wurde wie bei FLACHOWSKY *et al.* (2008) beschrieben durchgeführt. 10 µg genomische DNA wurden mit je 100 Units Restriktionsenzym (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) bei 37°C über Nacht verdaut. Die verdaute DNA wurde am Folgetag mittels Ethanol/Natriumacetat-Fällung gefällt und in 35 µl ddH₂O gelöst. Anschließend wurde die restringierte DNA auf einem Agarose-TAE-Gel (1 % (w/v) Agarose, 1x TAE) bei 90 V aufgetrennt und mittels Southern Blot (SOUTHERN 1975) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) übertragen. Nach der Prähybridisierung wurden 250 ng der genspezifischen DIG-markierten Sonde für die Hybridisierungsreaktion für 10 min bei 96°C denaturiert, in 5 ml Hybridisierungspuffer gelöst und der Membran zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte anschließend über Nacht bei 42°C im Wärmeschrank (Hero cool, Heraeus Holding GmbH, Hanau). Am Folgetag wurde die Membran jeweils zweimal mit 2x SSC + 0,1 % (w/v) SDS bei Raumtemperatur sowie mit 0,1 % (w/v) SSC + 0,1 % (w/v) SDS bei 68°C gewaschen, mit Maleinsäurepuffer gespült und für 45 min in Blockierungspuffer equilibriert. Zur Bindung des Anti-DIG-Konjugates an die Membran wurde das Konjugat in einem Verhältnis von 1:20.000 in Blockierungspuffer verdünnt und die Membran für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran zweimal für 20 min in Waschpuffer gewaschen und für 10 min in Blockierungspuffer equilibriert. Die Detektion der hybridisierten DIG-markierten Sonden erfolgte mittels ECF-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Für die Auswertung wurde die Membran nun stündlich mit dem Molecular-Imager[®]-FX Pro Plus (BioRad Laboratories GmbH, München) gescannt.

2.5.5 PCR basierende Methoden

2.5.5.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR erfolgte in 25 µl-Ansätzen, bestehend aus 50 ng genomischer DNA sowie 1x DreamTaq[™] Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,5 µM Primer F/R und 0,5 Units DreamTaq[™] DNA Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Die PCR-Reaktion startete

mit einer fünfminütigen Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 29 (*nptIIIF/R*), 30 (*EF1 α F/R*, *virGF/R*) oder 35 (*flpF/R*, *gusAF/R*) Zyklen von je 0,5 min Denaturierung bei 94°C, 0,5 min Annealing bei 58°C (*nptIII*, *EF1 α* , *flp* bzw. *virG*) bzw. 65°C (*gusA*) und 0,5 bis 1 min Elongation bei 72°C. Am Ende fand noch für 5 min eine abschließende Elongation bei 72°C statt.

Die Ausgangs- bzw. Startfragmente putativer *ChsV*-Gene aus *V. inaequalis* und *P. leucotricha* wurden, wie bei WERNER *et al.* (2002) beschrieben, mit den degenerierten Primern prCHSIV-V.1 und prCHSIV-V.2 in einer Standard-PCR amplifiziert.

2.5.5.2 Long-Range-PCR

Die Long-Range-PCR wurde in einem 50 μ l PCR-Ansatz durchgeführt. Dieser enthielt 1 μ g genomische DNA, 1x Long PCR Puffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μ M von jedem Primer sowie 1,25 Units Long PCR Enzym Mix (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Die Long-Range-PCR begann mit einer Denaturierung bei 94°C für 2 min, gefolgt von 10 Zyklen mit je 0,5 min Denaturierung bei 94°C, 0,5 min Annealing bei 65°C (*35SF-gusAR*) bzw. 60°C (*ViChsVFR*) und 5 min Elongation bei 68°C. Die nächsten 25 Zyklen erfolgten mit 0,5 min Denaturierung bei 94°C, 0,5 min Annealing bei 65°C (*35SF-gusAR*) bzw. 60°C (*ViChsVFR*) und 5 min + 2 s/Zyklus Elongation bei 68°C. Abschließend erfolgte eine zehn-minütige Elongation.

2.5.5.3 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) erfolgte in 25 μ l-Ansätzen. PCR-Ansatz und PCR-Bedingungen wurden wie bei einer Standard-PCR durchgeführt. Anstatt genomischer DNA wurden 50 ng Einzelstrang-cDNA (cDNA) eingesetzt.

2.5.5.4 TAIL-PCR

Für die Isolierung des *ChsV*-Gens aus *Venturia inaequalis* wurde die Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL)-PCR verwendet. Diese von LIU UND WHITTIER (1995) beschriebene Methode basiert auf der Kombination von degenerierten AD-Primern genspezifischen *Nested*-Primern. In der vorliegenden Arbeit wurden die spezifischen Primer (S10T(1-4)-1-3F oder S10T(1-2)-1-3R) in drei aufeinanderfolgenden PCR-Schritten mit den AD-Primern AD1,

AD2.1-2.5 (Tabelle A.1 im Anhang, Punkt 9.3) kombiniert. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie die PCR-Konditionen wurden wie bei LIU UND HUANG (1998) durchgeführt. Die Annealing-Temperatur lag 2°C unter der angegebenen Schmelztemperatur der genspezifischen Primer (Primerübersicht in Tabelle A.1 im Anhang, Punkt 9.3).

2.5.5.5 Rapid Amplification of cDNA ends-PCR (RACE-PCR)

Die Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)-PCR wurde benutzt, um unbekanntes 5'- und 3'-Enden der *ChsV*-mRNA von *V. inaequalis* zu amplifizieren und zu klonieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das FirstChoice® RLM-RACE PCR Kit (Applied Biosystems – Ambion, Darmstadt) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Nach der Adapter-Ligation wurde eine Standard-PCR mit Adapter- und den sequenzspezifischen Primern durchgeführt. Die erste Standard-PCR erfolgte mit den außenliegenden Primern Adapter-Primer 1 und ViRACE1F (für das 3'-Ende) bzw. ViRACE1R (für das 5'-Ende). Die PCR-Produkte wurden dann in einer zweiten PCR als Template eingesetzt. Die PCR erfolgte mit den weiter innen liegenden Primern Adapter-Primer 2 und ViRACE2F bzw. ViRACE2R. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. Alle PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR 2.1 TOPO® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) kloniert und anschließend sequenziert.

2.5.6 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten bis zu einer Größe von 3,5 kbp erfolgte nach Herstellerangaben mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in den Vektor pCR®2.1-TOPO®. Dieser wurde anschließend in die One Shot® TOP10 kompetenten *E. coli* Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert. Longe-Range-PCR-Produkte bis zu einer Größe von 3,5 kbp wurden ebenfalls mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) kloniert. Für die Klonierung wurden die Enden der Long-Range-PCR-Produkte durch die Erzeugung von A-Überhängen modifiziert. Dies erfolgte durch eine zehnmünütige Behandlung mit 0,5 Units Taq-Polymerase und 2 mM dNTPs bei 72°C.

Long-Range-PCR-Produkte, die größer als 3,5 kbp waren, wurden mit dem TOPO® XL Cloning Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers in One Shot® TOP10 kompetente *E. coli* Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transformiert. Dazu wurden 40 µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel (0,8 % (w/v) Agarose, 1x TAE) aufgetragen und unter Verwendung der S.N.A.P.™ Säulen und den Gel-Purification-Reagenzien des

TOPO® XL-Cloning Kits (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Herstellerangaben extrahiert. Die sich anschließende Klonierung erfolgte nach der vom Hersteller beschriebenen Anleitung.

2.5.7 DNA Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte als Auftragsarbeit bei der Firma MWG Operon. Hierfür wurden die PCR-Produkte zunächst mit dem TOPO TA Cloning® Kit bzw. TOPO® XL Cloning Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in *E. coli* transformiert. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA ausgewählter Einzelkolonien wurde je 1 µg der Plasmid-DNA zur Sequenzierung geschickt. Die Qualität der Sequenz wurde anhand der Sequenz-Traces überprüft (Abbildung A.2 im Anhang, Punkt 9.4.1).

2.6 GUS-Test

Der histologische GUS-Test wurde wie bei JEFFERSON *et al.* (1987) mit einem modifizierten GUS-Färbepuffer durchgeführt. Die *in-vitro*-Blätter bzw. -Sprosse wurden in einer 12-Multiwell™ Platte (Sigma-Aldrich Co.LLC, München) mit 3 ml GUS-Färbepuffer platziert und für 30 min Vakuum infiltriert. Im Anschluss wurden die Platten über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (Hero cool, Heraeus Holding GmbH, Hanau) inkubiert. Die Blätter wurden am Folgetag mit Ethanol:Eisessig (3:1) entfärbt und anschließend analysiert. Als Positivkontrolle diente die *gusA* transgene Apfelinie T355 (FLACHOWSKY *et al.* 2008). Als Negativkontrolle wurde der nicht-transformierte 'Pinova'-Sämling mitgeführt.

2.6.1 Ermittlung der GUS-gefärbten Blattflächen

Für die prozentuale Ermittlung GUS-gefärbter (GUS-positiver) Blattflächen wurde das Bildverarbeitungsprogramm Corel® PHOTO-PAINT® X3 Version 13.0.0.739 (Corel Corporation Deutschland, Unterschleißheim) verwendet. Hierfür wurden zwei verschiedene Farbbereiche betrachtet. Als erstes wurden die weißen Farbpixel als Hintergrund und anschließend die blauen Farbpixel als GUS-positiv definiert. Die erste Farbmaske wurde erstellt, um den Hintergrund zu markieren. Die Anzahl an „Hintergrund“-Pixeln konnte dann über die Schaltfläche [Histogramm] angezeigt werden und wurde von der Gesamtanzahl der Pixel des Bildes subtrahiert. Die Differenz dieser beiden Flächen ergab die Gesamt-Fläche des Apfelsprosses. Eine zweite Farbmaske wurde erstellt, um alle blauen Pixel im Bild zu

markieren. Nun konnte wieder über die Schaltfläche [Histogramm] die Anzahl an blauen Pixeln ermittelt werden. Die blauen Pixel wurden abschließend ins Verhältnis zu der Gesamtfläche des Apfelsprosses gesetzt und daraus der prozentuale Anteil der GUS-gefärbten Blattflächen berechnet.

2.6.2 Statistische Evaluierung

Die statistische Überprüfung von Ergebnissen erfolgte stets unter Verwendung des Statistik-Programmes **Statistical Analysis System SAS-Enterprise-guide-4.2** (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Als erstes wurden die quantitativen Daten auf eine Normalverteilung geprüft. Waren die Daten normal verteilt, folgte eine Varianzanalyse (*one-way-ANOVA*). Dabei wurde der Einfluss einer unabhängigen Variablen berücksichtigt. Der **DUNCAN-Multiple-Range-Test** diente dem Vergleich der Daten untereinander (DUNCAN 1955). Dabei wurden stets drei Wahrscheinlichkeitswerte betrachtet: 95 %, 99% und 99,99 %.

2.7 Der Aufbau einer Chitinsynthese-Datenbank zur Identifizierung von isolierten Genfragmenten

Es wurde eine Chitinsynthese-Datenbank zusammengestellt. Diese Chitinsynthese-Datenbank enthielt die kodierenden Sequenzen bzw. Proteinsequenzen von Chitinsynthasegenen unterschiedlicher Klassen von verschiedenen Ascomyceten und vereinzelt auch Basidiomyceten. Die Sequenzen wurden der NCBI-Genbank entnommen (Tabelle A.2 im Anhang, Punkt 9.4.2).

2.8 Alignment und phylogenetische Berechnungen

Für die Erstellung eines Proteinalignments wurden die isolierten Gensequenzen mit der BlastX-Funktion (*Basic Local Alignment Search Tool X* der NCBI-Genbank) in Proteinsequenzen umgeschrieben. Diese wurden mit den Sequenzen aus der Chitinsynthese-Datenbank mit der **Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA 4.1** Software (KUMAR *et al.* 2008) verglichen. Das Alignment wurde mit einem optimierten Clustal-Algorithmus von GONNET durchgeführt (AIYAR 1999).

Die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes der Chitinsynthasegene erfolgte ebenfalls mit der MEGA 4.1 Software. Verwendet wurde die *Neighbor-Joining*-Methode

(SAITOU UND NEI 1987) und ein *Poisson-Correction*-Algorithmus (NEI *et al.* 2001) mit 1.000 Bootstrap-Wiederholungen.

2.9 Inhibitorversuche mit Nikkomyzin Z

Für die Versuche mit dem Chitinsynthase-Hemmer Nikkomyzin Z (GAUGHRAM *et al.* 1994) wurden *in-vitro*-Blätter eines 'Pinova'-Sämlings mit *P. leucotricha* inokuliert. Einen Tag nach der Inokulation wurde der Pilz mit einer 500 μM Nikkomyzin Z-Lösung (Sigma-Aldrich Co.LLC, München) in 0,01 % (v/v) Tween 20 für 24 h behandelt. Am nächsten Tag wurden die Blätter mikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurden *in-vitro*-Apfelsprosse mit *P. leucotricha* inokuliert. Die Sprosse wurden entweder mit ddH₂O oder mit einer 500 μM Nikkomyzin Z-Lösung behandelt. Drei Wochen nach der Inokulation wurde der Befall untersucht.

Für die Inhibitorversuche mit Nikkomyzin Z bei *V. inaequalis* wurde eine Sporensuspension (durchschnittlich 300 Konidien pro μl) auf Malzextraktagar mit Cellophane325P-32,5 g m⁻²-Papier (Hintze & Kunick GmbH, Berlin) übertragen. Die Platten wurden bei 18°C im Dunkeln für zwei Tage inkubiert und anschließend mit ddH₂O oder einer 10 μM bzw. 500 μM Nikkomyzin Z-Lösung behandelt. Hierfür wurden zwei bis drei Tropfen der Nikkomyzin Z-Lösung bzw. ddH₂O auf die Kolonie pipettiert und die Kultur am nächsten Tag mit dem Mikroskop analysiert.

2.10 Mikroskopische Untersuchungen und Färbetechniken

Für die Färbung pilzlicher Infektionsstrukturen auf und in Blattgeweben wurden zunächst infizierte *in-vitro*-Apfelblätter in Ethanol:Essigsäure (3:1) über Nacht vollständig entfärbt. Die Färbung der Pilzstrukturen erfolgte modifiziert nach PHILLIPS UND HAYMAN (1970) mit 0,1 % (v/v) Anilinblau-Lactophenol. Gefärbt wurde für 15 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Blätter für 5 min in Lactophenol und für 5 min in Leitungswasser gewaschen. Die anschließende mikroskopische Analyse erfolgte mit einem Durchlicht-Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena). Die Pilz- und Blattstrukturen wurden mit einer Universal-Mikroskopkamera (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) aufgenommen.

2.11 *In-vitro*-Versuche mit Fluoreszein-markierten siRNAs

Verwendet wurden unspezifische, 19 nt kleine und mit Fluoreszein-markierte siRNAs (MWG-Biotech AG, Ebersberg). Es wurde eine 50 μ M siRNA-Lösung hergestellt. Es wurden mit *P. leucotricha*-inokulierte Blätter von jungen *in-vitro*-Apfelsprossen eines Sämlings der Sorte 'Pinova' drei Tage nach der Inokulation unter Wasser abgeschnitten und direkt im Anschluss in der siRNA-Lösung bzw. handelsüblicher Tinte platziert. Am nächsten Tag erfolgte die Evaluierung der (inokulierten) Blätter mit einem Durchlicht- (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) bzw. Konfokalen Mikroskop (Nikon Instruments Europe B.V., Kingston, U.K.) unter UV-Licht-Anregung und dem Filtersatz 09 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) bzw. UV-2a (Nikon Instruments Europe B.V., Kingston, U.K.).

3 Ergebnisse

3.1 Flp/ FRT-Rekombinationssystem

3.1.1 Transformation und Selektion von putativ transgenen Pflanzen

Für die Etablierung einer sequenzspezifischen Entfernung des *nptII*-Markergens wurden insgesamt 17 Transformationsexperimente mit dem *A. tumefaciens* Stamm GV3101-pMP90RK-Npt-Hsp-Flp-Gus an einem Sämling der Apfelsorte 'Pinova' ('Pinova'-Sämling) durchgeführt. Im Ergebnis dieser Experimente konnten von den 4.080 inokulierten *in-vitro*-Blättern 36 putativ transgene Regenerate selektiert werden. Diese Regenerate wurden auf M8-Vermehrungsmedium mit 500 µg ml⁻¹ Timetin und 100 µg ml⁻¹ Kanamycin bzw. 100 µg ml⁻¹ Paramomycin vermehrt, bis genügend Blattmaterial für eine molekulare Charakterisierung der Regenerate abgenommen werden konnte. Aus dem Blattmaterial von neun vitalen Regeneraten wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR auf die Anwesenheit der übertragenen Gene *nptII*, *flp* und *gusA* getestet. Dabei war es für alle neun Regenerate möglich, Fragmente der erwarteten Größe für alle drei Gene zu amplifizieren (Abbildung 3.1). Das *nptII*-PCR-Fragment hatte eine Größe von 800 bp, das *flp*-PCR-Fragment war 350 bp, und das *gusA*-PCR-Fragment war 450 bp groß. Basierend auf den Ergebnissen der PCR-Analyse wurden diese neun Regenerate ausgewählt und weiter auf M8-Vermehrungsmedium mit 500 µg ml⁻¹ Timetin und 100 µg ml⁻¹ Kanamycin vermehrt, um daraus Linien aufzubauen. Diese putativ transgenen Linien wurden als T670, T781, T782, T789, T790, T791, T792, T793 und T794 bezeichnet.

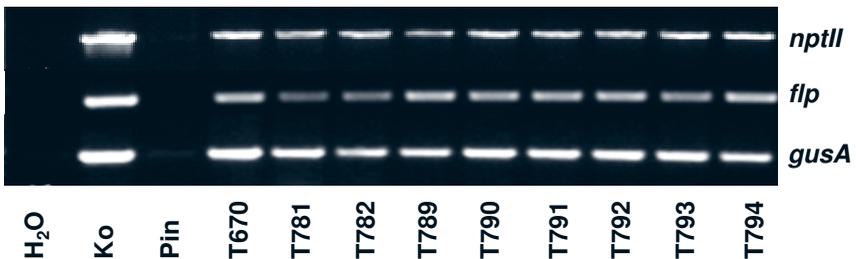


Abbildung 3.1 PCR-Ergebnisse für die Gene *nptII*-, *flp*- und *gusA*-Gen in den selektierten T-Linien. Die genomische DNA der T-Linien wurde isoliert und mit Hilfe einer Standard-PCR auf die Integration der Fremdgene überprüft. In den T-Linien wurden Fragmente der erwarteten Größe für alle drei Gene amplifiziert. H₂O - Wasser, Ko – Positivkontrolle: genomische DNA T781, Pin – Negativkontrolle 'PinS'-DNA.

3.1.2 Nachweis der T-DNA Integration mittels Southern Blot-Analyse und molekulare Charakterisierung der transgenen Linien

3.1.2.1 Bestimmung der T-DNA-Integrationen mittels Southern Blot Analyse

Im Anschluss an die PCR-Analyse wurden alle neun Linien mittels Southern Blot auf Integration der T-DNA getestet. Auf diese Weise wurde die Anzahl der T-DNA Integrationen bestimmt. Die genomische DNA der transgenen Linien wurde hierfür mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut. Die restringierte DNA wurde im Agarose-TAE-Gel aufgetrennt und wie beschrieben auf eine Nylon Membran gebロットet. Anschließend wurde die Membran mit einer *nptII*- bzw. *gusA*-spezifischen Sonde hybridisiert (Abbildung 3.2). In acht von neun transgenen Linien konnte jeweils nur eine T-DNA-Kopie detektiert werden. Die einzige Ausnahme bildet die Apfelflinie T670, welche vier T-DNA-Integrationen aufwies.

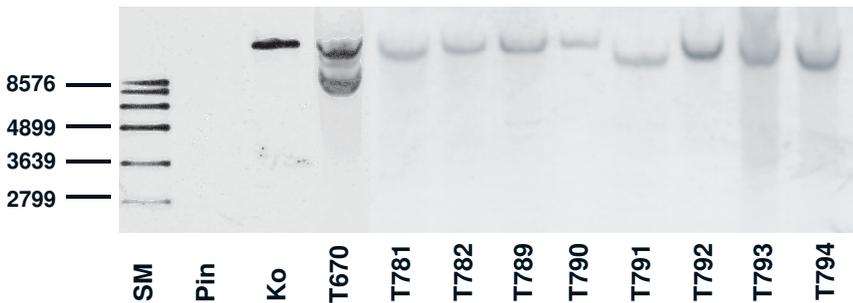


Abbildung 3.2 Southern Blot der Flp-Gus-transgenen Linien mit *gusA*-Sonde vor der Rekombination. Die genomische DNA der selektierten T-Linien wurde isoliert und mit *Bam*HI vollständig verdaut. Hybridisiert wurden die dargestellten Proben mit einer *gusA*-Sonde. Die Linie T670 zeigte, als einzige transgene Linie, insgesamt vier T-DNA-Integrationen. In allen anderen Linien wurde nur eine einzige T-DNA-Integration nachgewiesen. SM – Standardmarker; Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA; Ko – Positivkontrolle: Plasmid-DNA pB-Npt-Hsp-Flp-Gus.

3.1.2.2 PCR zum Nachweis von *Agrobacterium*-Kontaminationen

Um Kontaminationen mit rekombinanten *Agrobacterien* auszuschließen, wurde die genomische DNA junger *in-vitro*-Blätter der transgenen Linien isoliert und mittels Standard-PCR mit den *virG*-spezifischen Primern auf die Anwesenheit des bakteriellen Virulenzgens *virG* getestet (Abbildung 3.3). Eine spezifische Bande für *virG* mit einer Größe von 700 bp

wurde nur bei der Positivkontrolle (*Agrobacterium*-Kolonie) nachgewiesen. Die transgenen Linien waren nicht mit *Agrobacterium tumefaciens* kontaminiert.



Abbildung 3.3 PCR zur Analyse der transgenen Linien auf die Anwesenheit verbleibender *Agrobacterium*-Zellen. Nur in der Kontroll-DNA (Ko) wurde eine *VirG*-Bande detektiert. In den Sprossen der transgenen Linien wurde kein *virG*-Gen amplifiziert. SM – 100 bp Standardmarker, H₂O - Wasser, Ko – Positivkontrolle: *Agrobacterium*-Kolonie GV3101pMP90RK-Npt-Hsp-Flp-Gus; Pin – Negativkontrolle: 'Pinova'-Sämling DNA.

3.1.2.3 Long-Range-PCR zur Amplifikation des FRT-flankierten Bereichs zwischen 35S-Promotor und Reportergen

Im Anschluss an die PCR mit *virG*-spezifischen Primern wurden die transgenen Linien mittels Long-Range-PCR getestet, um den Bereich zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen zu amplifizieren. Dabei sollte geprüft werden, ob die T-DNA-Integration vollständig vorliegt. Als Positivkontrolle diente die Plasmid-DNA, welche zuvor aus dem *A. tumefaciens* Stamm GV3101-pMP90RK-pB-Npt-Hsp-Flp-Gus isoliert worden war. Parallel dazu wurde die genomische DNA des nicht-transformierten 'Pinova'-Sämlings als Negativkontrolle eingesetzt. In allen T-Linien wurde ein 4,5 kbp großes PCR-Fragment amplifiziert. Dieses wurde ebenfalls in der Positivkontrolle detektiert (Abbildung 3.4). Jede transgene Linie enthält somit wenigstens eine vollständige Kopie der T-DNA.

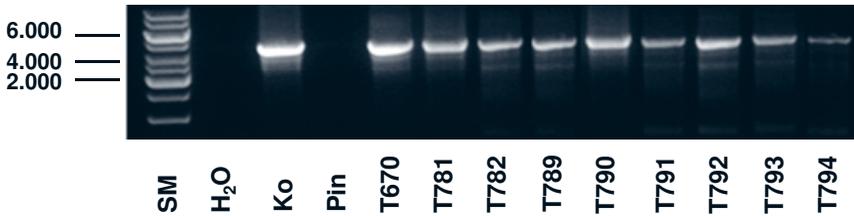


Abbildung 3.4 Amplifikation der T-DNA zwischen 35S Promotor und *gusA*-Gen vor der Rekombination. Die genomische DNA der T-Linien wurde isoliert und mit einer Long-Range-PCR der Bereich zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen amplifiziert. In der Positivkontrolle wurde ein 4,5 kbp PCR-Fragment vervielfältigt. Dieses wurde ebenfalls in allen selektierten Linien nachgewiesen. Die T-DNA liegt somit vollständig vor. SM – 1 kbp Standardmarker; H₂O – Wasser; Ko – Positivkontrolle: Plasmid-DNA pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA.

3.1.2.4 Expressionsanalyse der Transgene in den T-Apfellinien

Um die Expression der übertragenen Gene in den T-Linien zu prüfen, wurde die mRNA aus jungen Blättern jeder T-Linie isoliert und in Einzelstrang cDNA umgeschrieben. Für die Expressionsanalyse wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern für das *EF1 α* -Gen und die drei Transgene *nptII*-, *flp*- bzw. *gusA* durchgeführt. In jeder T-Linie wurde die Expression des *EF1 α* - sowie des *nptII*-Gens nachgewiesen. Weder das *flp*- noch das *gusA*-Transgen wurden in den unbehandelten T-Linien exprimiert (Abbildung 3.5).

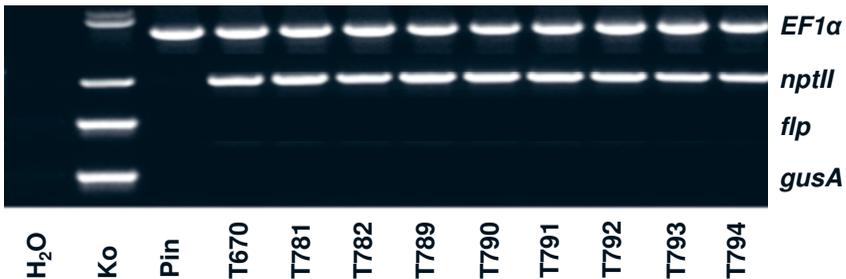


Abbildung 3.5 Expression von *EF1 α* -, *nptII*-, *flp*- und *gusA*-Gen in den T-Linien vor der Rekombination. Die RT-PCR mit den *EF1 α* -Primern zeigte, dass in allen Proben eine vergleichbare cDNA-Konzentration vorlag. In den T-Linien wurden die mRNA-Transkripte des *nptII*-Gens nachgewiesen. RT-PCR-Produkte des *flp*- bzw. *gusA*-Gens wurden nicht detektiert. H₂O - Wasser, Ko – Positivkontrolle DNA T781, Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA (*EF1 α* :cDNA).

3.1.3 Etablierung eines Verfahrens zur induzierten Entfernung des *nptII*-Gens

Bei dem zur Transformation verwendeten Genkonstrukt wird die Expression des *flp*-Rekombinase-Gens durch den Hitzestress-induzierbaren Promotor *Gmhsp17.5E* aus der Sojabohne *Glycine max* (CZARNECKA *et al.* 1989) reguliert. Da in der Literatur nur sehr wenig über Induktion des Promoters in ganzen Pflanzen beschrieben wird, wurden als erstes Untersuchungen zur induzierten Rekombination des *nptII*-Gens mit der T-Linie T670 durchgeführt. Diese Linie war die erste Apfellinie, von der genügend Sprosse für solche Untersuchungen zur Verfügung standen.

3.1.3.1 Bestimmung der optimalen Temperatur zur Induktion des *Gmhsp17.5E*-Promotors

Für eine gezielte Induktion des *Gmhsp17.5E*-Promotors wurden Sprosse einer drei Wochen alten *in-vitro*-Sprossspitzenkultur der T-Linie T670 verwendet. Die Sprosse dieser Linie wurden nun benutzt, um die Auswirkung unterschiedlicher Temperatur- und Zeitregime auf die Expression der Rekombinase und die Häufigkeit des Auftretens von Rekombinationsereignissen zu untersuchen.

Als erstes wurde geprüft, in welchem Entwicklungsstadium eine Hitzestress-Behandlung besonders effektiv ist. Hierfür wurden die Sprosse der Linie T670 mit bzw. ohne Kallus verwendet. Erfolgte eine Hitzestress-Behandlung an Sprossen ohne Kallus, so wurde dieser zwei Tage vor der Behandlung abgeschnitten und die Sprosse auf frisches M8-Vermehrungsmedium übertragen. Die Hitzestress-Behandlung erfolgte bei drei verschiedenen Temperaturen (37°C, 40°C und 42°C) für jeweils acht Stunden. Dafür wurden jeweils zwei dünnwandige 300 ml Weck®-Gläser mit je fünf Sprossen besetzt. Nach der Inkubation wurden die Gläser für 24 h in den Kulturenraum gestellt und die Sprosse am darauffolgenden Tag mittels GUS-Test überprüft. Als Negativkontrollen wurden Blätter von nicht-behandelten Sprossen der Linie T670 bzw. des nicht-transformierten 'Pinova'-Sämlings mitgeführt. Bei diesen beiden Kontrollen war zu keinem Zeitpunkt eine GUS-Färbung nachweisbar. Außerdem wurde festgestellt, dass auch die Apfelsprosse mit Kallus keine GUS-Färbung zeigten. Somit konnte unter den gegebenen Bedingungen keine Induktion des *Gmhsp17.5E*-Promotors erzielt werden. Andere Ergebnisse wurden erhalten, wenn die *in-vitro*-Apfelsprosse zwei Tage vor der Behandlung vom Kallus abgeschnitten wurden. Dabei waren

die kallusfreien Sprosse, die für acht Stunden bei 37°C behandelt wurden, im anschließenden GUS-Test ebenfalls negativ (Abbildung 3.6a). An den bei 40°C behandelten Apfelsprossen konnten erstmalig einzelne hellblaue Areale beobachtet werden. Diese befanden sich häufig an den Blatträndern (Abbildung 3.6b, Pfeile). Intensiv blau gefärbte Blattgewebe wurden nach Hitzestress-Behandlungen bei 42°C beobachtet (Abbildung 3.6c). Eine GUS-Färbung wurde bei einer Vielzahl von Zellen, Gewebeteilen und zum Teil auch bei vollständigen Sprossen detektiert. Vollständig GUS-positive Sprosse wurden jedoch nur vereinzelt beobachtet.

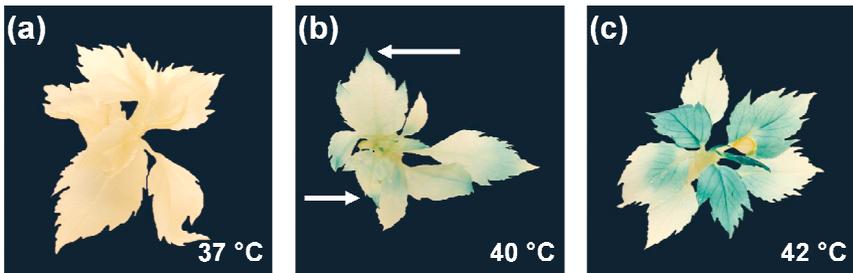


Abbildung 3.6 GUS-Färbung Hitzestress-behandelter Sprosse der Linie T670. (a) Nach einer Hitzestress-Behandlung für 8 h bei 37°C wurde keine GUS-Färbung detektiert (b) Die Hitzestress-Behandlung bei 40°C bewirkt vor allem in den Blattspitzen der transgenen Blätter eine schwache GUS-Aktivität. (c) Eine deutlich blaue GUS-Färbung war in den Blättern von Sprossen zu beobachten, die für 8 h bei 42°C behandelt wurden. Gleichzeitig wurden jedoch immer wieder weiße, Blattbereiche detektiert.

Basierend auf den Ergebnissen der GUS-Tests wurde anschließend die Expression des Reportergens und des Selektionsmarkers mittels RT-PCR untersucht. Hierfür wurden erneut *in-vitro*-Sprosse der Linie T670 für acht Stunden bei 37°C bzw. 42°C behandelt und am nächsten Tag Blattproben für die RNA-Extraktion abgenommen. Die cDNA der extrahierten RNA wurde anschließend in zwei RT-PCR-Ansätzen mit *gusA*- bzw. *nptII*-spezifischen Primern eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde cDNA nicht-behandelter Blätter der Linie T670 und als Negativkontrolle cDNA von Blättern des nicht-transformierten 'Pinova'-Sämlings mitgeführt. Transkripte des *gusA*-Gens wurden weder in der Positiv- noch Negativkontrolle amplifiziert (Abbildung 3.7). Auch in den Blattproben der Sprosse, die bei 37°C behandelt wurden, konnte keine *gusA*-Expression nachgewiesen werden. Die Expression des Reportergens wurde nur in jenen Sprossen detektiert, die zuvor bei 42°C

behandelt wurden (Abbildung 3.7). Unabhängig davon waren Transkripte des *nptII*-Gens in allen untersuchten, transgenen Blattproben nachweisbar.



Abbildung 3.7 RT-PCR von Hitzestress-behandelten Blattproben der Linie T670. Die Apfelsprosse wurden für 8 Stunden bei 37°C bzw. 42°C mit Hitzestress behandelt und anschließend die RNA isoliert. Ohne Hitzestress-Behandlung zeigten die Sprosse keine *gusA*-Expression (Ko). Auch nach einer Behandlung bei 37°C wurden keine *gusA*-Transkripte detektiert. Erst bei einer Temperatur von 42°C konnte eine schwache *gusA*-Expression nachgewiesen werden. Die Expression des *nptII*-Markergens wurde in allen drei Proben detektiert.

3.1.3.2 Bestimmung der optimalen Dauer der Hitzestress-Behandlung

Zwei 300 ml Weck[®]-Gläser mit je fünf Sprossen der Linie T670 wurden unterschiedlich lange (0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h oder 12 h) bei 42°C inkubiert. Die 12-stündige Hitzestress-Behandlung führte jedoch zum Absterben der Apfelsprosse. Deshalb wurden diese Sprosse verworfen. Die restlichen Gläser wurden im Kulturenraum für 24 h aufbewahrt und am Folgetag mittels GUS-Test überprüft. Nach dem GUS-Test wurden die Sprosse entfärbt und fotografiert (Abbildung 3.8a). Es wurden Farbmasken erstellt, um die Anzahl an blauen Pixeln zu ermitteln (Abbildung 3.8b). Anhand der ermittelten Pixel wurde der prozentuale Anteil der GUS-gefärbten Blattflächen berechnet. Auf diese Weise wurden zwischen fünf und 14 behandelte Sprosse pro Hitzestress-Experiment ausgewertet. Der mittlere Wert der relativen GUS-positiven Flächen pro Zeitregime mit dazugehöriger Standardabweichung ist in Abbildung 3.8c grafisch dargestellt.

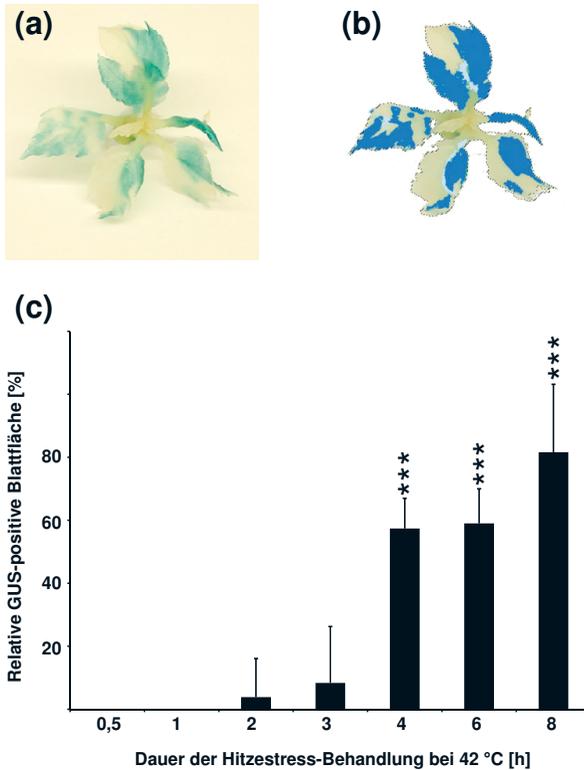


Abbildung 3.8 Auswertung der Effektivität einer Hitzestress-Behandlung anhand der mittleren relativen GUS-positiven Blattfläche in Abhängigkeit zur Dauer der Hitzestress-Behandlung bei 42°C. (a) Original-Foto nach dem GUS-Test. (b) Das Original-Foto wurde mittels Bildverarbeitung zur Berechnung der relativen GUS-positiven Blattfläche verwendet. Dunkelblau = GUS-positive Fläche; Hellblau = Übergangszonen; Weiß = Hintergrund. (c) Prozentualer Anteil der GUS-gefärbten Blattflächen in Abhängigkeit zur Dauer der Hitzestress-Behandlung bei 42°C. Untersucht wurden verschiedene Zeitregime, bei denen die *in-vitro*-Apfelsprosse der Linie T670 bei 42°C Hitzestress-behandelt worden sind. Angegeben sind die Standardabweichungen und signifikante Unterschiede in der GUS-Färbung zu den nicht-behandelten Sprossen. ***- $p < 0,01$ (DMR-Test).

Der prozentuale Anteil der GUS-positiven Blattflächen zeigte, dass die Hitzestress-Behandlung erst ab einer Dauer von wenigstens zwei Stunden vereinzelt zu Rekombinationsereignissen geführt hat. Nach einer dreistündigen Hitzestress-Behandlung waren ebenfalls nur durchschnittlich acht Prozent der analysierten Blattflächen GUS-gefärbt.

Einen signifikanten Anstieg ($p < 0,01$) der GUS-positiven Blattflächen auf durchschnittlich 57 bzw. 59 Prozent wurden nach einer vier- bzw. sechsständigen Hitzestress-Behandlung detektiert. Nach acht Stunden bei 42°C waren dann sogar durchschnittlich 82 Prozent der Blattflächen GUS-positiv. Es konnte gezeigt werden, dass eine längere Dauer der Hitzestress-Behandlung auch zu einer höheren Anzahl an GUS-positiven Zellen führt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde von 12 unbehandelten Sprossen der Linie T670 die genomische DNA extrahiert (drei Sprosse je DNA-Probe). Diese zwölf Sprosse wurden eine Woche später mit Hitzestress behandelt: drei Sprosse für acht Stunden bei 37°C bzw. jeweils drei Sprosse für zwei, vier oder acht Stunden bei 42°C. Im Anschluss an die Hitzestress-Behandlung wurde erneut genomische DNA aus den Blättern isoliert und eine Long-Range-PCR mit den sieben DNA-Proben durchgeführt. Dabei sollte erneut der Bereich zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen analysiert werden (Abbildung 3.9). Dabei wurde festgestellt, dass in den unbehandelten Sprossen sowie in den Sprossen, die bei 37°C behandelt wurden, immer noch das 4,5 kbp PCR-Fragment vorlag. In den Sprossen, die für zwei Stunden bei 42°C behandelt wurden, wurde neben dem 4,5 kbp zusätzlich ein 1,2 kbp kleines PCR-Fragment amplifiziert. Nach vier- bzw. achtständiger Behandlung bei 42°C konnte in den untersuchten Sprossen nur noch das 1,2 kbp PCR-Fragment nachgewiesen werden.

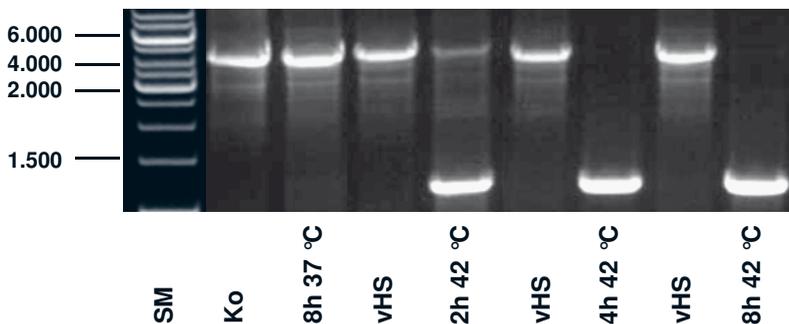


Abbildung 3.9 Amplifikation der T-DNA zwischen 35S Promotor und *gusA*-Gen nach der Hitzestress-Behandlung. Die genomische DNA wurde aus unbehandelten Sprossen der T-Linie T670 sowie nach der Hitzestress-Behandlung isoliert und eine Long-Range-PCR durchgeführt. Dabei wurde der Bereich zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen amplifiziert. Die Positivkontrolle zeigte das 4,5 kbp Fragment – die vollständige T-DNA. Auch in den Proben der bei 37°C inkubierten Sprosse wurde dieses Fragment amplifiziert. Im Gegensatz hierzu konnte in allen Proben, deren Sprosse bei 42°C behandelt wurden, zusätzlich noch ein 1,2 kbp Fragment beobachtet werden. SM – 1 kbp Standardmarker, Ko – Positivkontrolle: Plasmid-DNA pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; vHS – Sprosse der Linie T670 vor der Hitzestress-Behandlung.

Das 1,2 kbp sowie das 4,5 kbp PCR-Produkt wurden nun in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert, dieser in *E. coli* transformiert und sequenziert. Anschließend wurden beide Nukleotidsequenzen miteinander verglichen (Abbildung 3.10). Dabei wurde festgestellt, dass das 1,2 kbp Fragment nur noch aus dem 35S-Promotor, einer der beiden *FRT*-Erkennungssequenzen sowie dem *gusA*-Reportergen besteht. Das gesamte *FRT*-flankierte Fragment mit *nptII*-Gen und *flp*-Rekombinase wurde durch den Hitzestress bei 42°C eliminiert.



Abbildung 3.10 Sequenzvergleich vor und nach der Flp-vermittelten Rekombination.

Die beiden PCR-Fragmente (1 und 2) wurden bei der Isolierung des Bereichs zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen vor bzw. nach der Hitzestress-Behandlung der Linie T670 erhalten. Dargestellt ist nur das *FRT*-flankierte Fragment. (1) Die Sequenz des 4,5 kbp PCR-Fragmentes enthält das vollständige *FRT*-flankierte Fragment. Das *nptII*-Gen, der HS-Promotor und die *flp*-Rekombinase werden von zwei *FRT*-Erkennungssequenzen flankiert. (2) Die Sequenz des 1,2 kbp PCR-Fragmentes aus der Long-Range-PCR zeigte, dass in den Hitzestress-behandelten Sprossen das gesamte *FRT*-flankierte Fragment fehlt. Zurückgeblieben war nur noch eine *FRT*-Erkennungssequenz (*FRT*¹).

Anschließend wurden drei weitere vitale, unbehandelte Sprosse der Linie T670 ausgewählt und die Gesamt-RNA isoliert. Diese Sprosse wurden für acht Stunden bei 42°C behandelt und erneut die Gesamt-RNA isoliert. Nachdem die cDNA synthetisiert war, wurde eine RT-PCR mit *nptII*- bzw. *gusA*-spezifischen Primern ausgeführt (Abbildung 3.11). Dabei wurde festgestellt, dass die Transkripte des *gusA*-Gens ausschließlich in den cDNA-Proben der Pflanzen nachgewiesen werden konnten, welche für acht Stunden bei 42°C behandelt wurden. Dennoch wurde das *nptII*-Gen sowohl vor als auch nach der Hitzestress-Behandlung weiter exprimiert.

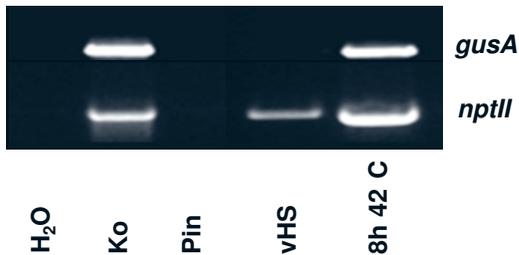


Abbildung 3.11 Ergebnisse der RT-PCR mit *nptII*- bzw. *gusA*-spezifischen Primern.

Isoliert wurden die RNA-Proben vor und nach der Hitzestress-Behandlung von Sprossen der Linie T670. Die Transkripte des *nptII*-Gens wurden auch noch nach der Hitzestress-Behandlung nachgewiesen. Die Expression des *gusA*-Gens hingegen wurde ausschließlich in den behandelten Sprossen detektiert. H₂O – Wasser; Ko – Positivkontrolle: Plasmid-DNA pB-Npt-Hsp-Flp-Gus, Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA; vHS – vor der Hitzestress-Behandlung.

3.1.3.3 Expression der *flp*-Rekombinase in Abhängigkeit zur Dauer der Hitzestress-Behandlung

Um die Dauer der Hitzestress-Behandlung zur Induktion des *Gmhsp17.5-E*-Promotors zu bestimmen, wurde die Linie T782 ausgewählt, da diese nur eine einzige T-DNA-Integration enthält. Untersucht wurde die Promotoraktivität indirekt mit Hilfe einer Expressionsanalyse des *flp*-Gens. Hierfür wurden die Sprosse dieser Linie vom Kallus abgeschnitten und für 30 bis 360 min bei 42°C Hitzestress-behandelt. Direkt im Anschluss an die Behandlung wurden die Blätter der Sprosse geerntet und aus diesen die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR mit *flp*-spezifischen Primern auf das Vorkommen von *flp*-Transkripten getestet. Dabei wurde festgestellt, dass bereits nach einer 30-minütigen Hitzestress-Behandlung die *flp*-Rekombinase exprimiert wird (Abbildung 3.12). *Flp*-Transkripte wurden auch in allen anderen induzierten Blattproben nachgewiesen. In den Kontrollproben bzw. den behandelten Sprossen des 'Pinova'-Sämlings wurde zu keinem Zeitpunkt eine Expression der Rekombinase detektiert. Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese lassen vermuten, dass die Expression der *flp*-Rekombinase bei einer längeren Hitzestress-Induktion stärker wird.



Abbildung 3.12 RT-PCR Ergebnis zur Expression des *flp*-Rekombinasegens in Abhängigkeit unterschiedlich langer Hitzestress-Behandlungen bei 42°C. Nach einer 30-minütiger Hitzestress-Behandlung konnten Transkripte der *flp*-Rekombinase in den Blättern der T-Linie nachgewiesen werden. In den Kontrollsprossen des 'Pinova'-Sämlings wurde zu keinem Zeitpunkt eine Expression der Rekombinase detektiert. SM – 100 bp Standardmarker; H₂O – Wasser, Ko – Positivkontrolle: Plasmid-DNA pB-Npt-Hsp-Flp-Gus, Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA.

3.1.4 Regeneration von *nptII*-freien transgenen Apfelsprossen

Für die Regeneration *nptII* freier, transgener Apfelsprosse wurden jeweils zehn Sprosse der Linie T670 für acht Stunden bei 40°C bzw. für zwei, drei, vier oder acht Stunden bei 42°C mit Hitzestress behandelt. Die Gläser wurden anschließend für drei Wochen in den Kulturenraum gestellt. Danach wurden alle Blätter dieser Sprosse geerntet und in fünf mm dünne Streifen geschnitten. Die Regeneration der Explantate erfolgte für 16 Wochen auf LSG-Regenerationsmedium ohne selektierendes Kanamycin. Die Abwesenheit eines Selektionsmittels ermöglichte die gleichzeitige Regeneration von Zellen mit bzw. ohne *nptII*-Gen. Die Regeneration neuer Apfelsprosse wurde in drei Entwicklungsstufen eingeteilt: Die Entwicklung des Kallus (Abbildung 3.13a), die Differenzierung des Kallus in pflanzliche Gewebe, z. B. Blattgewebe (Abbildung 3.13b), und die Entwicklung eines Regenerats mit ausdifferenzierten Spross- und Blattgeweben (Abbildung 3.13c).

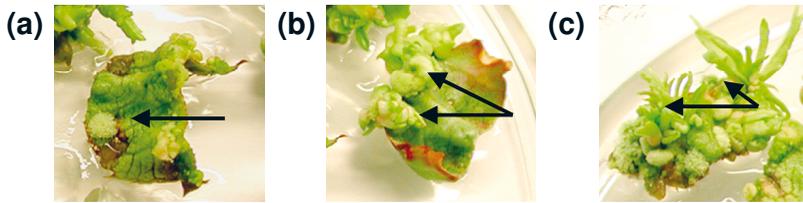


Abbildung 3.13 Regenerationsprozess putativ *nptII*-freier Apfelsprosse. Die Regeneration putativ *nptII*-freier Sprosse wurde in drei Entwicklungsstufen differenziert: (a) die Entwicklung eines Kallus; (b) die Differenzierung der Zellen in unterschiedliche pflanzliche Gewebe und (c) das Wachstum zu voll entwickelten Apfelsprossen mit differenzierten Geweben.

Nach 16 Wochen wurden von der Ausgangslinie T670 insgesamt 138 Sprossregenerate aus den unterschiedlichen Hitzestress-Experimenten gewonnen und auf M8-Vermehrungsmedium übertragen. Anschließend wurden zwei bis drei Blätter eines jeden Sprossregenerats mittels GUS-Test überprüft (Tabelle 3.1). Dabei wurde festgestellt, dass die Sprossregenerate entweder vollständig GUS-positiv oder vollständig GUS-negativ waren.

Tabelle 3.1 Gegenüberstellung von Dauer der Hitzestress-Behandlungen und dem Anteil an putativ *nptII*-freien Sprossregeneraten der Linie T670. Gegenübergestellt sind die jeweilige Dauer und Temperatur der Hitzestress-Behandlung; die Anzahl der Apfelsprosse, die mit Hitzestress behandelt wurden; die Anzahl der getesteten Sprossregenerate sowie die Anzahl und der prozentuale Anteil der GUS-positiven Regenerate.

T-Linie	Zeit & Temperatur	Getestete Sprossregenerate ^a	vollständig GUS positive Sprosse	%	Regeneratsnummer
T670	8 h 40°C	10	0	0,0	T670/R7A
T670	2 h 42°C	47	7	14.9	T670/R11A-F
T670	3 h 42°C	24	8	33.3	T670/R13A-G
T670	4 h 42°C	38	0	0.0	T670/R15A
T670	8 h 42°C	19	3	15.8	T670/R8A

^a Es wurden ausschließlich vitale Sprosse untersucht, die voll entwickelte Blätter hatten. Sprosse mit einem anormalen Habitus wurden nicht untersucht.

Wie der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, wurden von den Explantaten aus den fünf Hitzestress-Experimenten nach 16 Wochen zwischen zehn und 47 Sprossregenerate getestet. Die Anzahl an Testmaterial war dabei vorrangig von der Anzahl an gebildeten Regeneraten und deren Entwicklungszustand abhängig. Der GUS-Test zeigte, dass zwischen 0 und 33,3 Prozent von diesen Regeneraten vollständig GUS-positiv war. Der höchste Anteil (33,3 Prozent) an GUS-positiv getesteten Sprossregeneraten wurde bei Explantaten detektiert, deren Ausgangssprosse für drei Stunden bei 42°C behandelt worden waren (T670/R13). Durch den Regenerationsprozesses im Anschluss an eine zweistündige Hitzestress-Behandlung bei 42°C wurden 14,9 Prozent vollständig GUS-positiver Sprossregenerate erzeugt (T670/R11). Der Anteil an vollständig GUS-positiv getesteten Regeneraten, deren Ausgangssprosse für acht Stunden bei 42°C behandelt wurden, lag jedoch nur bei 15,8 Prozent (T670/R8). Eine schwache GUS-Färbung der Mittelachse wurde bei den Regeneraten T670/R7 detektiert. Deren Ausgangssprosse wurden für acht Stunden bei 40°C behandelt. Entgegen den Erwartungen wurden überhaupt keine GUS-positiven Sprossregenerate bei jenen Explantaten detektiert, deren Ausgangssprosse für vier Stunden bei 42°C behandelt wurden (T670/R15).

Zusätzlich wurden einige dieser GUS-getesteten Blätter mikroskopisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Blätter der GUS-positiven Sprossregenerate alle einheitlich GUS-positiv waren (Abbildung 3.14a). Partuell GUS-gefärbte Blattareale, wie sie nach der Hitzestress-Behandlung zu beobachten waren (Abbildung 3.14b), wurden nur noch bei den Regeneraten detektiert, deren Ausgangssprosse bei 40°C inkubiert wurden.

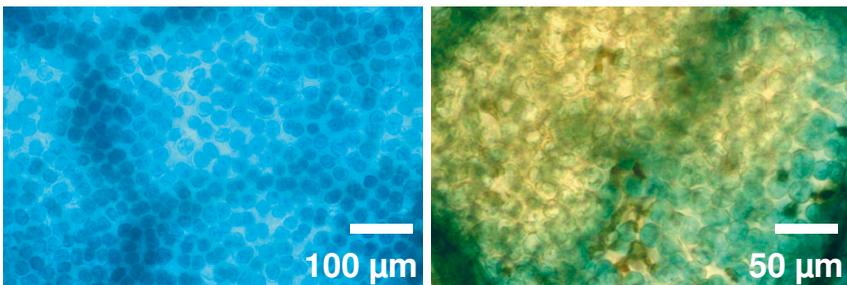


Abbildung 3.14 **Histologische GUS-Färbung nach der Regeneration von Hitzestress-behandelten Sprossen bzw. nach der Hitzestress-Behandlung.** (a) Lichtmikroskopische Aufnahme eines vollständig GUS-positiv gefärbten Blattareals nach der Regeneration eines Hitzestress-induzierten Sprosses von T670. Dieses besteht ausschließlich aus GUS-positiven Zellen. (b) Lichtmikroskopische Aufnahme eines chimären Blattareals der Linie T670 nach der Hitzestress-Behandlung.

Die Regenerate T670/R11A-F, T670/R13A-G und T670/R8A waren im GUS-Test vollständig blau und wurden deshalb auf M8-Vermehrungsmedium mit $500 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Timetin übertragen und vermehrt. Das Sprossregenerat T670/R15A wurde im GUS-Test negativ getestet und wurde ebenfalls auf M8-Vermehrungsmedium mit $500 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Timetin vermehrt.

Von insgesamt sechs Sprossregeneraten (T670/R11A, -R11B, -R13A, -R13B, -R15A und -R8A) wurden die jungen Blätter geerntet und aus diesen die Gesamt-RNA isoliert. Nachdem die RT-PCR mit den *EF1a*-spezifischen Primern für alle cDNA-Proben positiv war, wurde eine RT-PCR mit *gusA*- bzw. *nptII*-spezifischen Primern durchgeführt. Die Expression des *gusA*-Gens konnte wie erwartet nur in den GUS-positiv getesteten Regeneraten sowie nach der Hitzestress-Behandlung gezeigt werden (Abbildung 3.15). Weder in den unbehandelten Sprossen der Linie T670 noch in dem GUS-negativen Regenerat T670/R15A wurden Transkripte des *gusA*-Gens nachgewiesen. Trotz des Regenerationsprozesses wurde auch in allen regenerierten, GUS-positiv getesteten Regeneraten das *nptII*-Gen weiterhin exprimiert.

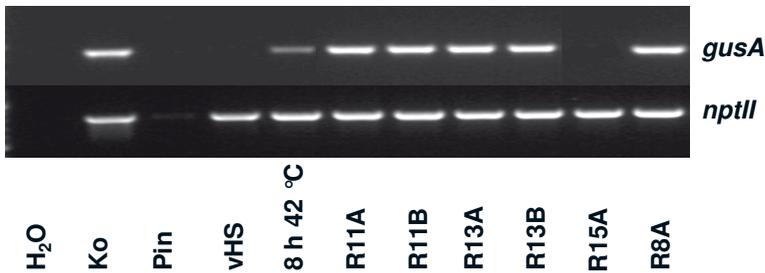


Abbildung 3.15 RT-PCR zur Untersuchung der *gusA*- bzw. *nptII*-Expression nach der **Regeneration von GUS-positiven Sprossregeneraten**. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass das *gusA*-Gen auch nur in den GUS-positiv getesteten Sprossen nach der Hitzestress-Behandlung bzw. der Sprossregeneration exprimiert wurde. Das *nptII*-Gen wurde nach dem Hitzestress sowie nach der Regeneration von GUS-positiven Regeneraten weiter exprimiert. H₂O – Wasser; Ko – Positivkontrolle Plasmid-DNA: pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA; vHS – vor der Hitzestress-Behandlung; R – Regenerat.

Zusätzlich zu den PCR- und RT-PCR-Untersuchungen wurde ein Southern Blot durchgeführt. Dazu wurde die genomische DNA der Sprossregenerate T670/R11A, -R13A, -R13B und -R15A mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut. Die Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI befindet sich innerhalb des *FRT*-flankierenden Fragments zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit einer *nptII*- bzw. einer *gusA*-

spezifischen Sonde (Abbildung 3.16). Dabei konnte festgestellt werden, dass bei den GUS-positiv getesteten Regeneraten R11A, R13A und R13B nur noch drei der vier *gusA*-Hybridisierungssignale nachweisbar waren (Abbildung 3.16). Somit konnte mit Hilfe der Hitzestress-Behandlung und der sich anschließenden Regeneration ein vollständiges *FRT*-flankiertes Fragment eliminiert werden. Die drei anderen T-DNA-Integrationen liegen unverändert vor, weshalb das *nptII*-Gen auch parallel zum *gusA*-Gen weiter exprimiert wird.

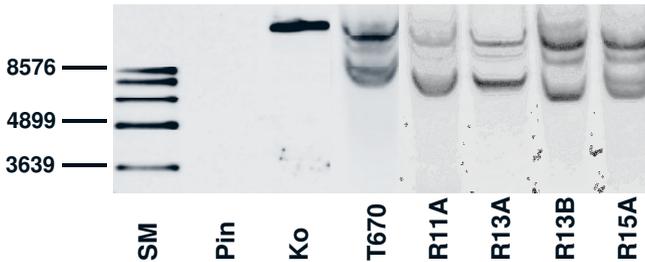


Abbildung 3.16 Southern Blot mit *gusA*-Sonde nach der Regeneration. Die genomische DNA von den GUS-positiven Regeneraten R11A, R13A, R13B sowie dem GUS-negativen Regenerat R15A der Linie T670 wurde isoliert und mit *Bam*HI verdaut. Hybridisiert wurden die Proben mit einer *gusA*-spezifischen-Sonde. Die T-Linie T670 zeigte vor dem Hitzestress (vHS) insgesamt 4 T-DNA-Integrationen. Die GUS-positiv getesteten Regenerate zeigten nur noch drei der vier *gusA*-Signale. Nur bei T670/15A wurden noch alle vier Integrationen detektiert. SM – Standardmarker; Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA; Ko – Positivkontrolle Plasmid-DNA; pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; vHS – vor der Hitzestress-Behandlung.

3.1.5 Untersuchungen zur Auswirkung einer wiederholten Hitzestress-Behandlung auf die Erhöhung der Regenerationsrate von *nptII* freien Apfelsprossen

Die Ergebnisse zu der *multi-copy*-Linie T670 haben gezeigt, dass mit einer einmaligen Hitzestress-Behandlung bei 42°C und einer sich anschließenden Regeneration partiell *nptII*-freie Apfelsprosse erzeugt werden konnten. Diese Ergebnisse sollten nun an acht *single-copy* Linien getestet und optimiert werden. Deshalb erfolgte an jeweils durchschnittlich 25 Sprossen der gm-Linien T781 und T782 eine Hitzestress-Behandlung für drei Stunden bei 42°C. Im darauf folgenden GUS-Assay wurde jedoch festgestellt, dass die einmalige Behandlung der Sprosse nicht ausreichend war, um Rekombinationen auszulösen – die Blätter waren alle GUS-negativ. Deshalb wurde die Hitzestress-Behandlung bei den Linien T781 und

T782 nach einer siebentägigen Pause wiederholt. Erst nach dieser zweiten Behandlung konnten im GUS-Test zahlreiche kleinere GUS-positive Blattareale detektiert werden. Jeweils fünf Sprosse der Linien T789, T790, T791, T792, T793 und T794 wurden nun insgesamt dreimal für drei Stunden bei einer Temperatur von 42°C behandelt. Zwischen den einzelnen Hitzestress-Behandlungen wurde ebenfalls eine siebentägige Pause eingelegt. Nach der letzten Hitzestress-Behandlung wurden zwei bis drei Blätter je Spross geerntet und die Rekombination mittels GUS-Test visuell analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass eine Vielzahl der untersuchten Blätter intensiv blau gefärbt war. Es wurden gleichzeitig auch Blätter beobachtet, die keine GUS-Färbung zeigten oder nur partiell GUS-positiv waren. Die Anzahl der behandelten Sprosse einer jeden Linie und der Anteil von diesen Sprossen, die eine partielle oder vollständige GUS-Färbung zeigten, sind in Tabelle 3.2 gegenübergestellt.

Tabelle 3.2 Rekombinationshäufigkeiten in Abhängigkeit von den Hitzestress-Behandlungen. bei den Linien T781, T782 und T789 bis T793. Gegenübergestellt sind die jeweilige Wiederholung, Dauer und Temperatur der Hitzestress-Behandlung; die Anzahl der Apfelsprosse, die mit Hitzestress behandelt wurden; die Anzahl bzw. der prozentuale Anteil der GUS-positiv getesteten Sprosse. Temp. – Temperatur; WH – Wiederholung.

T-Linie	Hitzestress-Behandlung				GUS-positive Sprosse ^b	
	Zeit [h]	Temp. [°C]	WH	Sprossanzahl ^a	Anzahl	%
T781	3	42	1	21	1	4,7
T782	3	42	1	31	6	19,4
T789	3	42	2	5	5	100,0
T790	3	42	2	5	2	40,0
T791	3	42	2	5	2	40,0
T792	3	42	2	5	3	60,0
T793	3	42	2	5	3	60,0
T794	3	42	2	5	5	100,0

^a Die Anzahl der behandelten Sprosse variierte in Abhängigkeit zur Verfügbarkeit an Sprossmaterial. ^b Zeigten die analysierten Blätter eine GUS-Färbung, wurden diese als GUS-positiv eingestuft und im anschließenden Regenerationsprozess eingesetzt.

Die Daten in Tabelle 3.2 zeigen, dass nach der wiederholten Hitzestress-Behandlung der Linien T781 und T782 nur 4,7 bis 19,4 Prozent der induzierten Sprosse eine GUS-Färbung zeigten. Nach der dreimaligen Hitzestress-Behandlung der Linien T789 bis T794 wurde dagegen bei 40 bis 100 Prozent der Sprosse eine GUS-Färbung detektiert. Der Anteil an GUS-

gefärbten Blattarealen konnte somit durch die dritte Hitzestress-Behandlung noch weiter erhöht werden.

Anschließend wurden für die Regeneration nur jene Sprosse ausgewählt, deren Testblätter im GUS-Assay GUS-positiv waren. Die restlichen Blätter von diesen Sprossen wurden geerntet, in Streifen geschnitten und die Blattexplantate auf LSG-Regenerationsmedium ohne Selektionsmittel für 16 Wochen regeneriert. Von den Linien T781, T782 und T793 wurden alle vitalen Regenerate mit voll entwickelten Blättern (Abbildung 3.17a) auf frisches M8-Vermehrungsmedium übertragen und mittels GUS-Test auf den Rekombinationserfolg hin überprüft. Dabei wurden drei Typen von Regeneraten identifiziert: Regenerate, die keine GUS-Färbung zeigten (Abbildung 3.17b); Chimäre Regenerate, die aus GUS-positiven und GUS-negativen Geweben bestanden (Abbildung 3.17c) und vollständig GUS-gefärbte Regenerate (Abbildung 3.17d).

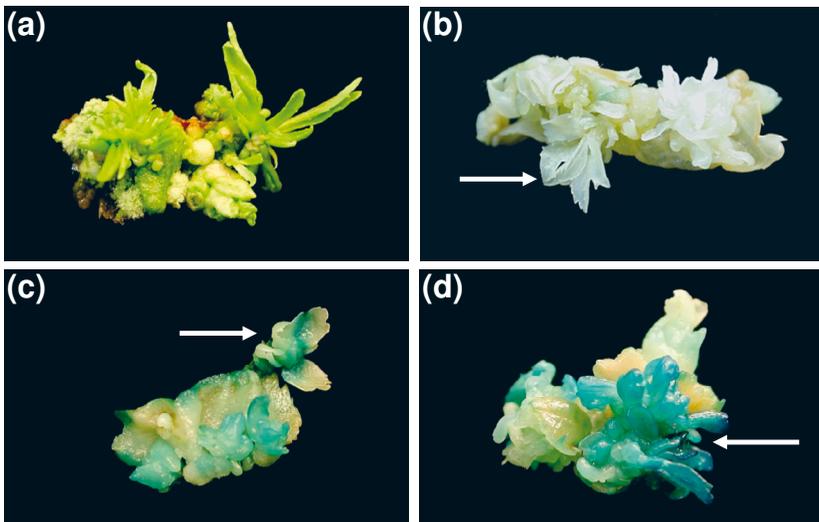


Abbildung 3.17 **Histologische GUS-Färbung von Sprossregeneraten der Linie T782.**

(a) Regenerierter Apfelspross nach 16 Wochen auf Regenerationsmedium ohne Kanamycin. (b) GUS-negatives Regenerat. (c) Chimäres Regenerat (Pfeil), welches aus einem Gemisch von GUS-positiven und GUS-negativen Geweben besteht. (d) GUS-positives Regenerat (Pfeil).

Von 34 bis 87 der vermehrten Sprossregenerate wurden jeweils zwei bis drei Blätter mittels GUS-Test überprüft (Tabelle 3.3). Von den 34 getesteten Regeneraten der Linie T781 zeigte nur ein einziges Regenerat (2,9 Prozent) eine vollständige GUS-Färbung (T781/R19-6). Alle anderen getesteten Regenerate dieser Linie waren GUS-negativ. Andere Ergebnisse wurden bei den Regeneraten der Linien T782 und T793 detektiert. Von den 87 getesteten Sprossregeneraten der Linie T782 waren 31 Regenerate (35,6 Prozent) und von den 73 getesteten Sprossregeneraten der Linie T793 waren 27 Regenerate (37 Prozent) GUS-positiv gefärbt. Vereinzelt wurden chimäre Regenerate bei diesen beiden Linien detektiert.

Tabelle 3.3 Ergebnisse des GUS-Tests nach der Regeneration von Hitze-stress-behandelten Sprossen der *single-copy* Linien T781, T782 und T793. Angegeben sind die Ausgangslinie sowie die dazugehörige Anzahl der GUS-getesteten Sprossregenerate. Zusätzlich wurde die Anzahl bzw. der prozentuale Anteil der GUS-positiven Regenerate aufgeführt und die Bezeichnung dieser GUS-positiven Sprossregenerate angegeben.

T-Linie	GUS-Test		GUS-positive Sprosse ^b		Regeneratsnummer
	Anzahl Sprossregenerate ^a	Anzahl	%		
T781	34	1	4,7		T781/R19-6
T782	87	31	35,6		T782/R22/R29
T793	73	27	37,0		-

^a Es wurden ausschließlich vitale Sprosse untersucht, die voll entwickelte Blätter hatten. Sprosse mit einem anormalen Habitus wurden nicht untersucht. ^b Zeigten die analysierten Blätter eine GUS-Färbung, wurden diese als GUS-positiv eingestuft und im anschließenden Regenerationsprozess eingesetzt.

3.1.6 Molekulare Charakterisierung putativ *nptII*-freier transgener Apfelsprosse

Für die anschließenden molekularen Untersuchungen wurden als erstes die im GUS-Test identifizierten, vollständig GUS-positiven Regenerate der Linie T781 (T781/R19-6), der Linie T782 (T782/R22-2A, T782/R22-3A, T782/R22-3B, T782/R22-3E und T782/R22-4A) sowie ein partiell GUS-positives Regenerat der Linie T782 (T782/R29-8D) und ein GUS-negatives Regenerat von T782 (T782/R29-8A) ausgewählt. Die Sprossregenerate wurden auf M8-Vermehrungsmedium vermehrt und von diesen Blattproben entnommen. Die Blattproben wurden anschließend für die Extraktion genomischer DNA bzw. für die Isolierung der Gesamt-RNA verwendet.

Um den Bereich zwischen 35S Promotor und *gusA*-Reportergen zu amplifizieren und den Erfolg der Rekombination nachzuweisen, wurde eine Long-Range-PCR an der genomischen DNA der Regenerate T782/R22-2A bzw. T781/R19-6 durchgeführt. Die genomische DNA eines unbehandelten Sprosses der Linie T781 wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde die genomische DNA eines Regenerats der Linie T670 (T670/R13A) eingesetzt. An der DNA eines unbehandelten Sprosses der Linie T781 wurde, wie erwartet, das 4,5 kbp Fragment amplifiziert. Im Gegensatz dazu wurde in allen GUS-positiven Sprossregeneraten der drei Linien nur noch das 1,2 kbp kurze Fragment nachgewiesen (Abbildung 3.18).

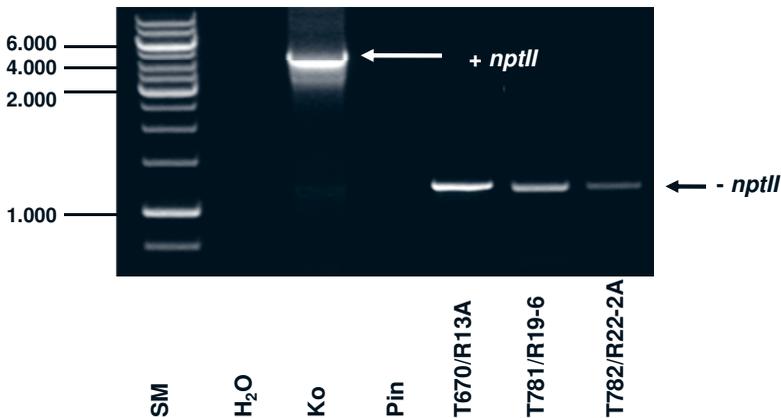


Abbildung 3.18 Amplifikation der T-DNA zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen. Die genomische DNA von den GUS-positiven Regeneraten der T-Linien T781 und T782 wurde isoliert und mit Hilfe einer Long-Range-PCR der Bereich zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen amplifiziert. Die Kontroll-DNA (unbehandelte T781) zeigte das 4,5 kbp PCR-Fragment, die vollständige übertragene T-DNA (+ *nptII*). Im Gegensatz hierzu wurde in den GUS-positiven Regeneraten nur noch das 1,2 kbp Fragment (- *nptII*) beobachtet. Die vollständige Eliminierung des *FRT*-flankierten Fragments zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen wurde gezeigt. SM – 1 kbp Standardmarker; H₂O – Wasser; Ko – Positivkontrolle: unbehandelter Spross von T781; Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA.

Anschließend wurde die DNA auf das Vorhandensein von *nptII*- bzw. *gusA*-Gen-Sequenzen mittels Standard-PCR mit den Primern *nptIIF/nptIIR* bzw. *gusAF/gusAR* getestet. Dabei konnte in allen untersuchten Proben das *gusA*-Gen nachgewiesen werden (Abbildung 3.19). Das *nptII*-Gen hingegen konnte nur noch in den GUS-negativen Sprossregeneraten von T781 (Daten nicht gezeigt) und T782 sowie in dem chimären Sprossregenerat der Linie T782

(T782/R29-8D) nachgewiesen werden (Abbildung 3.19). In keinem der GUS-positiven Sprossregenerate der Linien T781 bzw. T782 wurde das *nptII*-Gen amplifiziert.



Abbildung 3.19 PCR-Ergebnis zur Integration von *gusA*- und *nptII*-Gen in regenerierten Sprossen. Die PCR mit *gusA*-spezifischen Primern zeigte die Integration des *gusA*-Reportergens in allen untersuchten gm-Sprossen. Bei der PCR mit *nptII*-spezifischen Primern wurde festgestellt, dass das *nptII*-Gen – mit Ausnahme von T670/R13A – in keinem der GUS-positiven Regenerate nachgewiesen werden konnte. Lediglich in dem GUS-negativen Regenerat T782/R29-8A sowie in dem chimären Regenerat T782/R29-8D wurde das *nptII*-Gen weiterhin nachgewiesen. H₂O – Wasser; Ko – Positivkontrolle: Plasmid-DNA pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA.

Um das Ergebnis abzusichern, wurde anschließend eine RT-PCR an cDNA dieser Sprosse durchgeführt. Die Qualität der cDNA wurde zuerst mit den *EF1α*-spezifischen Primern überprüft. Dabei konnten für alle Proben Banden ähnlicher Stärke amplifiziert werden (Abbildung 3.20). Die cDNA-Proben hatten somit eine vergleichbare Konzentration. Transkripte des *gusA*-Gens wurden wie erwartet ausschließlich in den GUS-positiven Sprossen nachgewiesen (Abbildung 3.20). Die Expression des *nptII*-Gens wurde nur in den GUS-negativen Regeneraten der T-Linien T781 und T782 nachgewiesen (Abbildung 3.20). Auch in der cDNA des chimären Regenerates T782/R29-8D war der Nachweis von *nptII*-Transkripten möglich. Die GUS-positiven Sprosse der Linie T670 zeigten neben einer *nptII*-Bande zusätzlich auch noch eine Bande für das *gusA*-Gen.

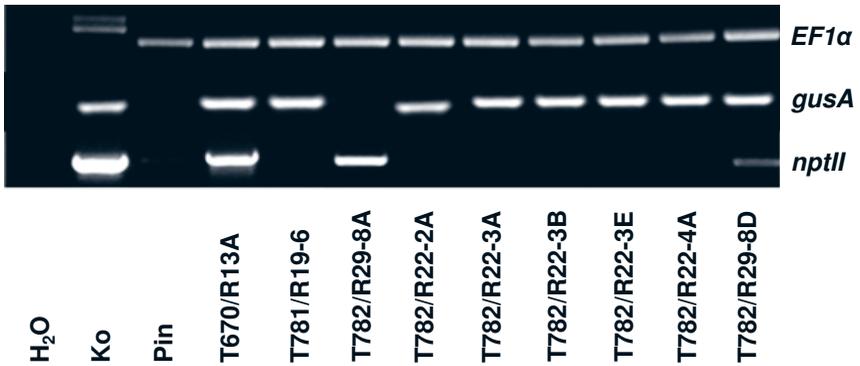


Abbildung 3.20 RT-PCR nach der Regeneration. Die RT-PCR mit den apfelspezifischen *EF1α*-Primern zeigte, dass in allen Proben eine vergleichbare cDNA-Konzentration vorlag. Die RT-PCR mit *gusA*-spezifischen Primern wies Transkripte des *gusA*-Gens ausschließlich in den GUS-positiv getesteten Regeneraten nach. Die RT-PCR mit *nptII*-spezifischen Primern zeigte eine starke Expression des *nptII*-Gens in dem GUS-positiven Regenerat T670/R13A sowie dem GUS-negativen Regenerat der Linie T782 (T782/R29-8A). Das chimäre Regenerat T782/29-8D zeigte noch eine schwache *nptII*-Expression. H₂O – Wasser-Kontrolle; Ko – Positivkontrolle: (*EF1α*) 'Pinova'-Sämling DNA, (*gusA* / *nptII*) Plasmid-DNA pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA.

Abschließend wurde die Eliminierung des *nptII*-Gens mit einem Southern Blot überprüft. Die genomische DNA der T-Linien vor der Hitzestress-Behandlung sowie von vier GUS-positiven Regeneraten (T781/R19-6, T782/R22-2A, T782/R22-3A und T782/R22-3E) und von einem chimären Regenerat (T782/R29-8D) wurde isoliert und mit *Bam*HI verdaut. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *nptII*- bzw. einer *gusA*-spezifischen Sonde (Abbildung 3.21). Dabei konnte festgestellt werden, dass bei den GUS-positiv getesteten Sprossregeneraten keine *nptII*-Hybridisierungssignale mehr detektiert wurden (Abbildung 3.21). Eine Kopie des *nptII*-Gens wurde lediglich in dem chimären Regenerat T782/29-8D und in den unbehandelten Sprossen der Linien T781 und T782 detektiert.

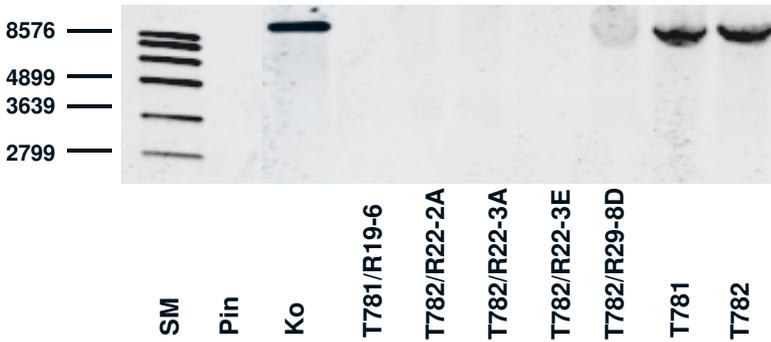


Abbildung 3.21 Southern Blot mit *nptII*-Sonde nach der Regeneration Hitzestress-behandelter Sprosse. Die genomische DNA von den GUS-positiven Regeneraten T781/R19-6, T782/R22-2A, T782/R22-3A bzw. -3E bzw. von dem chimären Regenerat T782/R29-8D wurde isoliert und mit *Bam*HI verdaut. Hybridisiert wurden die DNA-Proben mit einer *nptII*-Sonde. In den GUS-positiven Regeneraten wurde keine Kopie des *nptII*-Gens detektiert. Sowohl in den unbehandelten Sprossen als auch in dem chimären Regenerat wurde das *nptII*-Gen weiterhin nachgewiesen. T781, T782 – transgene Linien vor dem Hitzestress; T781/R19-6, T782/R: 22-2A; 22-3A, 22-3E – GUS-positiv Regenerate; T782/R29-8D – chimäres Regenerat bestehend aus GUS-positiven und GUS-negativen Zellen. SM – Standardmarker; Pin – Negativkontrolle 'Pinova'-Sämling DNA; Ko – Positivkontrolle: Plasmid-DNA pB-Npt-Hsp-Flp-Gus.

3.1.7 Biologischer Nachweis der *nptII*-Entfernung

Die restlose Eliminierung des *nptII*-Gens wurde mittels molekularen Verfahren in den Sprossen des Regenerates 782/R22-2A (*- nptII*) nachgewiesen. Nachdem das Regenerat auf M8-Vermehrungsmedium vermehrt worden war, wurden jeweils drei der dreiwöchigen Sprosse auf M8-Medium ohne Selektionsmittel bzw. auf M8-Medium mit 100 µg ml⁻¹ Paromomycin überführt. Als Kontrolle wurden jeweils drei Sprosse der unbehandelten Linie T782 (+ *nptII*) sowie des nicht-transformierten 'Pinova'-Sämlings mitgeführt. Nach einer Wachstumsphase von vier Wochen wurden die Sprosse visuell überprüft. Wie erwartet, war der Zustand aller Sprosse auf M8-Vermehrungsmedium ohne Paromomycin nach vier Wochen sehr gut (Abbildung 3.22a). Die Sprosse waren vital und intensiv grün. Auf M8-Medium mit Paromomycin (Abbildung 3.22b) hingegen waren nur noch die unbehandelten Sprosse der Linie T782 vital. Die *nptII*-freien Sprossregenerate und auch die Sprosse des nicht-transformierten 'Pinova'-Sämlings waren tot. Die Sprosse hatten weder einen Kallus ausgebildet, noch zeigten sie ein Wachstum. Die Gewebe waren rot-bräunlich gefärbt.

Abschließend wurde noch einmal ein GUS-Test mit allen noch lebenden Sprossen durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich in dem Sprossregenerat T782/22-2A eine GUS-Färbung detektiert (Abbildung 3.22c). Die nicht-behandelten, transgenen Sprosse der Linie T782 und natürlich auch die Sprosse des nicht-transformierten 'Pinova'-Sämlings zeigten keine GUS-Färbung – die Gewebe waren vollständig weiß.

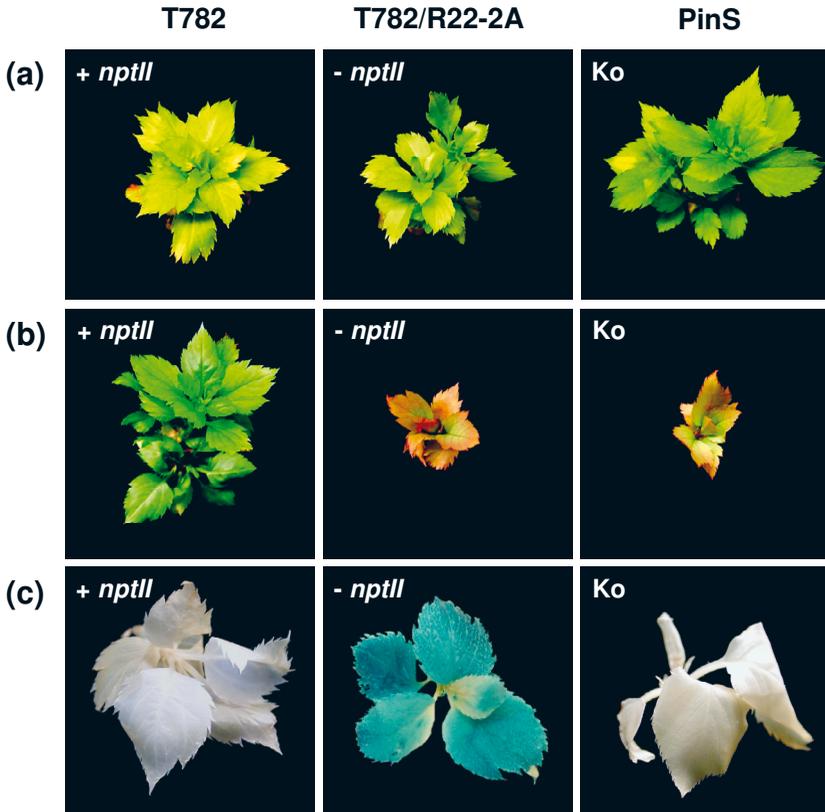


Abbildung 3.22 *In-vitro*-Kultivierung auf M8-Medium mit und ohne toxisches **Paromomycin**. Untersucht wurden unbehandelte Sprosse der Linie T782 (+ *nptII*); das *nptII*-freie Regenerat T782/R22-2A (- *nptII*). Als Kontrolle (Ko) wurden Sprosse des nicht-transformierten 'Pinova'-Sämling (PinS) mitgeführt. (a) Die Sprosse wurden auf M8-Medium ohne Paromomycin kultiviert. (b) Die Apfelsprosse wurden auf M8-Medium mit 100 µg ml⁻¹ Paromomycin kultiviert. (c) Histologischer GUS-Test von Sprossen, die auf M8-Medium ohne Paromomycin gewachsen waren.

3.2 Untersuchungen zur RNAi-induzierten Resistenzerrhöhung in transgenen Apfelpflanzen

Im zweiten Teil der Arbeit sollten grundlegende Untersuchungen zur Etablierung eines RNAi-basierten Verfahrens zur Erhöhung der Resistenz von Apfelpflanzen gegenüber pilzlichen Schaderregern durchgeführt werden. Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob eine Aufnahme und ein Transport von siRNAs aus pflanzlichen Zellen in den Apfelmehltau-Erreger *Podosphaera leucotricha* stattfindet. Anschließend wurde die Bedeutung der Chitinsynthasen auf die Entwicklung des Apfelschorf- bzw. Apfelmehltau-Erregers mit Hilfe eines Nikkomycin-Tests untersucht. Danach wurde zielgerichtet mit der Isolierung von *Chitinsynthase* Klasse V-Genen aus beiden Schaderregern begonnen.

3.2.1 Die Aufnahme von Fluoreszein-markierten siRNA aus pflanzlichen Geweben in pilzliche Strukturen

In einem ersten Versuchsansatz sollte geklärt werden, ob es einen Transport von siRNAs aus pflanzlichen Zellen in den lebenden Apfelmehltau-Erreger *P. leucotricha* gibt.

Dazu wurde in einem ersten Experiment getestet, ob *in-vitro*-Apfelsprosse Tinte über die Leitgefäße aufnehmen können. Hierfür wurden *in-vitro*-Apfelsprosse unter Wasser vom Kallus abgeschnitten und in verdünnter, handelsüblicher Tinte platziert. Die Tinte wurde zunächst in den Leitgefäßen und bereits nach wenigen Minuten in den umliegenden Gewebeteilen des Blattes beobachtet. Um zu testen, ob der Apfelmehltau-Erreger *P. leucotricha* die Tinte aus pflanzlichen Zellen aufnehmen kann, wurden junge *in-vitro*-Apfelsprosse mit Konidien von *P. leucotricha* inokuliert. Drei Tage nach der Inokulation wurden die Blätter geerntet und in die Tinte gestellt. Nach wenigen Minuten konnte eine Aufnahme der Tinte in die pflanzlichen Gewebe beobachtet werden (Abbildung 3.23a). Am nächsten Tag wurden die Blätter mikroskopisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Tinte in den pflanzlichen Leitbahnen transportiert (Abbildung 3.23b) und in die pilzlichen Infektionsstrukturen aufgenommen wurde. Die Haustorien waren blau (Abbildung 3.23c, Pfeile). Als Negativkontrolle wurden inokulierte Blätter drei Tage nach der Inokulation in Leitungswasser gestellt und am nächsten Tag mikroskopisch untersucht. Die pilzlichen Haustorien in den Epidermiszellen jener Blätter waren farblos.

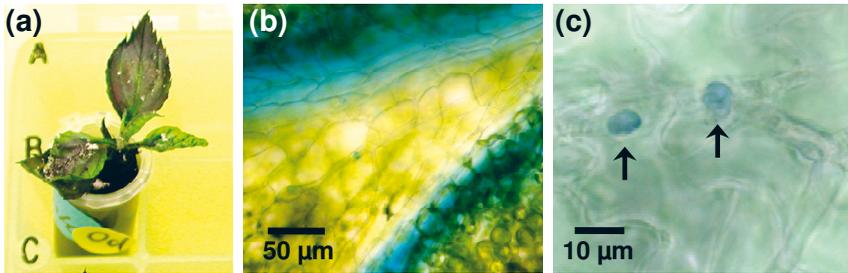


Abbildung 3.23 Aufnahme und Transport von Tinte in pflanzliche Zellen und die Aufnahme dieser Tinte in pilzliche Strukturen. (a) Die Aufnahme der Tinte in einen *in-vitro*-Apfelspross war bereits nach wenigen Minuten erkennbar. (b) Ein *in-vitro*-Apfelspross nimmt die Tinte auf und transportiert diese über die Leitgefäße in die Blattgewebe. (c) Apfelmehltau-inokulierte Apfelblätter wurden in Tinte gestellt. Am nächsten Tag wurden blau gefärbte Haustorien (Pfeile) in den Epidermiszellen beobachtet.

In einem zweiten Versuch wurden junge *in-vitro*-Sprosse mit dem Apfelmehltau-Erreger inokuliert. Die Blätter dieser Sprosse wurden drei Tage nach der Inokulation geerntet. Zwei der geernteten Blätter wurden als Negativkontrolle in Leitungswasser gestellt. Die restlichen Blätter wurden in eine 50 µM Lösung mit unspezifischen, Fluoreszein-markierten siRNAs platziert. Am nächsten Tag wurden alle Blätter mit einem Durchlicht-Mikroskop im Hellfeld und UV-Licht mikroskopiert. Dabei wurde festgestellt, dass bei den Blättern der Negativkontrolle eine rote Autofluoreszenz des Chlorophylls zu beobachten war. Die pilzlichen Hyphen bzw. Konidiophoren auf diesen Blättern waren durch eine blaue Autofluoreszenz gekennzeichnet (Abbildung 3.24a). Die mikroskopische Untersuchung der mit siRNA-behandelten Blätter zeigte, dass die fluoreszierenden siRNAs vor allem in den Zellen nahe den Leitgefäßen lokalisiert werden konnten (Abbildung 3.24b). In den pilzlichen Hyphen bzw. Konidiophoren auf diesen Blättern, wurden diese Fluoreszenz-Signale ebenfalls detektiert (Abbildung 3.24c).

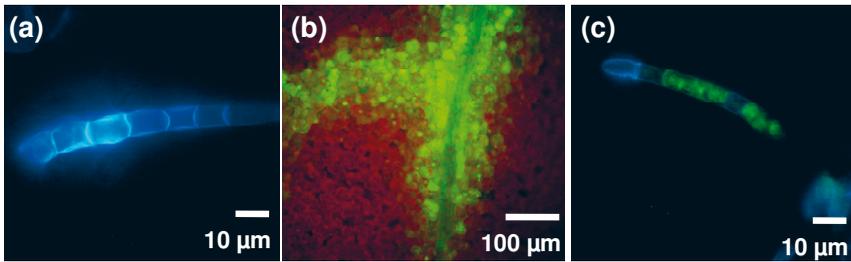


Abbildung 3.24 Aufnahme von siRNAs aus pflanzlichen Zellen in pilzliche Strukturen. (a) Wurden inokulierte *in-vitro*-Apfelblätter in Wasser gestellt, war nur eine blaue Autofluoreszenz der entwickelten Konidiophoren erkennbar. (b) Die unspezifischen, Fluoreszeин-markierten siRNAs wurden in den Leitbahnen und deren umliegenden Gewebeteilen detektiert. (c) Wurden die Apfelmehltau-inokulierten *in-vitro*-Blätter in eine siRNA-Lösung gestellt, so konnten die Fluoreszenz-Signale auch innerhalb pilzlicher Strukturen (bsp. Konidiophoren) lokalisiert werden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Vorversuche wurde untersucht, ob die siRNA-Aufnahme des Pilzes ein passiver oder ATP-abhängiger Prozess ist. Hierfür wurden junge *in-vitro*-Apfelsprosse mit dem Apfelmehltau-Erreger inokuliert. Als Negativkontrolle wurden drei dieser Blätter in Leitungswasser gestellt. Die restlichen Blätter wurden in die 50 µM konzentrierte siRNA-Lösung gestellt, wobei fünf dieser Blätter mit dem Fungizid Flint® behandelt und der Pilz abgetötet wurde. Die pilzlichen Strukturen auf den Blättern wurden am nächsten Tag mit einem Konfokalen Mikroskop evaluiert. Lokalisiert wurden pilzliche Strukturen im Hellfeld. Die Detektion fluoreszierender siRNAs erfolgte anschließend unter UV-Anregung. Dabei wurde festgestellt, dass in den Blättern der Negativkontrolle weder in den pflanzlichen Zellen noch in den pilzlichen Strukturen Fluoreszenz-Signale detektiert wurden (Abbildung 3.25a). In den Leitbahnen und umliegenden Blattgeweben der siRNA-inkubierten Blätter wurden Fluoreszeин-Signale detektiert. Die pilzlichen Strukturen auf Blättern, die zuvor mit dem Fungizid behandelt wurden, zeigten keine Fluoreszenz (Abbildung 3.25b). Auf den nicht-Fungizid-behandelten Blättern wurden zahlreiche Fluoreszeин-Signale in den pilzlichen Hyphen (Abbildung 3.25c) und vereinzelt Signale auch in den Konidienketten bzw. Konidiophoren detektiert (Abbildung 3.25d, Pfeil).

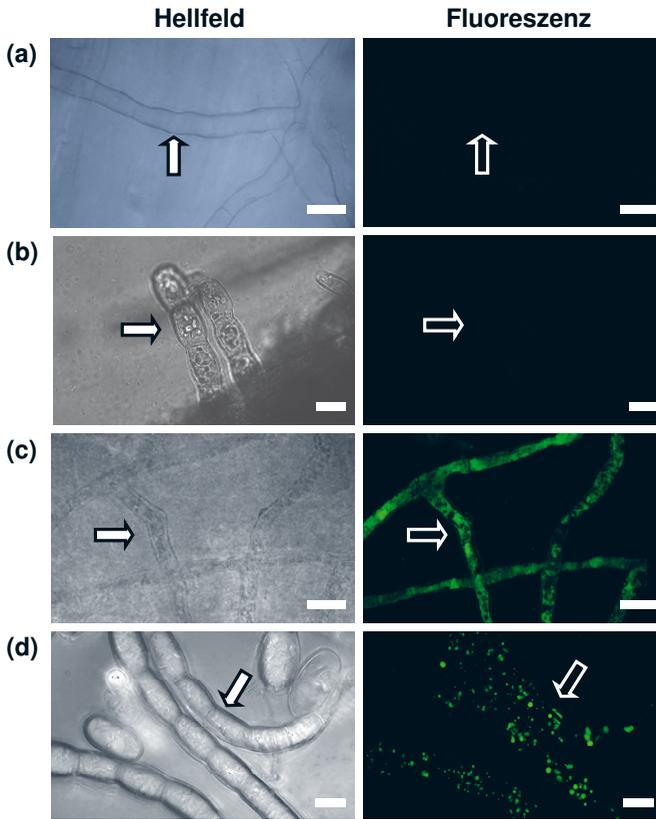


Abbildung 3.25 Aufnahme von Fluoreszeinsirnas, unspezifischen siRNAs aus Apfelzellen in den Pilz. Gegenüberstellung mikroskopischer Aufnahmen im Hellfeld und UV-Anregung (Fluoreszenz) (a) Negativkontrolle Wasser. Nach der Inkubation von inokulierten *in-vitro*-Apfelblättern mit Leitungswasser wurden keine Fluoreszenz-Signale detektiert. (b) Vor der Inkubation von inokulierten *in-vitro*-Apfelblättern mit Fluoreszeinsirnas wurde der Pilz mit dem Fungizid Flint® abgetötet. Es waren keine Fluoreszenz-Signale in den pilzlichen Strukturen sichtbar. (c) Deutliche Fluoreszenz-Signale wurden in den Pilzhyphen des lebenden Apfelmehltaus detektiert. (d) Punktuell Fluoreszenz-Signale waren in den sich entwickelnden Konidienketten zu beobachten (Pfeil). Der weiße Balken entspricht 10 µm.

3.2.2 Inhibitionsversuche von Chitinsynthasen mittels Nikkomyzin Z

Für die Versuche mit dem Chitinsynthase-Blocker Nikkomyzin Z wurden *in-vitro*-Apfelblätter des 'Pinova'-Sämlings mit dem obligat biotrophen Pilz *Podosphaera leucotricha*

inokuliert. Am nächsten Tag wurden die inokulierten Blätter mit Nikkomyzin Z behandelt. Als Negativkontrolle wurden inokulierte Blätter mit Wasser eingesprüht. Die mit Wasser behandelten Pilze zeigten weiterhin eine normale Hyphenmorphologie (Abbildung 3.26a). Nach der Behandlung mit einer 500 µM Nikkomyzin Z-Lösung wurde häufig das Anschwellen von Keimhyphen beobachtet (Abbildung 3.26b). Der fakultativ biotrophe Apfelschorf-Erreger *V. inaequalis* wurde auf Malzextraktagar kultiviert. Heranwachsende Kulturen wurden mit einigen Tropfen der 500 µM Nikkomyzin Z-Lösung behandelt. Schon am nächsten Tag zeigten fast alle Hyphen eine veränderte Morphologie. Die Hyphen bildeten größtenteils bis zu 30 µm große Blasen (Abbildung 3.26c, Pfeil).

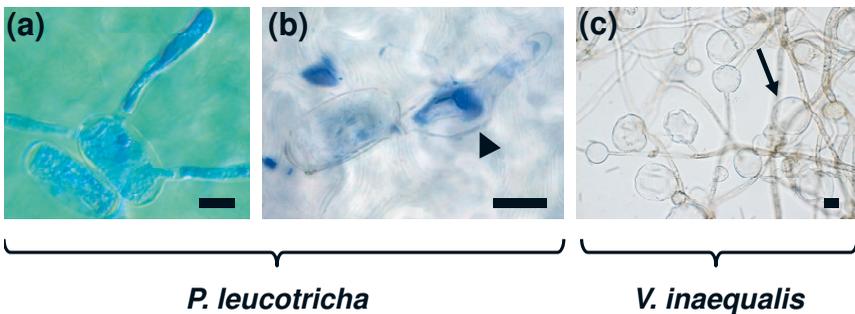


Abbildung 3.26 Effekt des Chitinsynthese-Inhibitors Nikkomyzin Z auf das Hyphenwachstum von *P. leucotricha* und *V. inaequalis*. (a) Ohne die Zugabe von Nikkomyzin zeigte sowohl der Apfelmehltau- als auch der Apfelschorf-Erreger (nicht dargestellt) eine normale Morphologie der Keimhyphen. (b) Die Zugabe einer 500 µM Nikkomyzin Z-Lösung führte beim Apfelmehltau-Erreger zu einem Anschwellen der Keimhyphen (Pfeilspitze). (c) Nachdem eine heranwachsende Kultur des Apfelschorf-Erregers *V. inaequalis* mit der 500 µM Nikkomyzin Z-Lösung behandelt, bildeten fast alle Hyphen bis zu 30 µm große blasige Strukturen (Pfeil). Diese Hyphen waren deformiert. Der schwarze Balken entspricht 10 µm.

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob die Behandlung von *in-vitro*-Apfelsprossen mit Nikkomyzin Z die Infektion mit *P. leucotricha* hemmt bzw. reduziert. Hierfür wurden junge *in-vitro*-Apfelsprosse mit dem Apfelmehltau-Erreger inokuliert. Anschließend wurde eine Hälfte dieser inokulierten Sprosse mit autoklaviertem Leitungswasser besprüht. Die restlichen Sprosse wurden mit einer 500 µM Nikkomyzin Z-Lösung behandelt. 21 Tage nach der Inokulation wurden die Blätter bei zweifacher Vergrößerung untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die mit Wasser-behandelten Blätter

typische Symptome einer Mehltau-Infektion zeigten (Abbildung 3.27a). Auf den Blättern der Nikkomyzin Z-behandelten Apfelsprosse wurden keine Symptome beobachtet (Abbildung 3.27b).

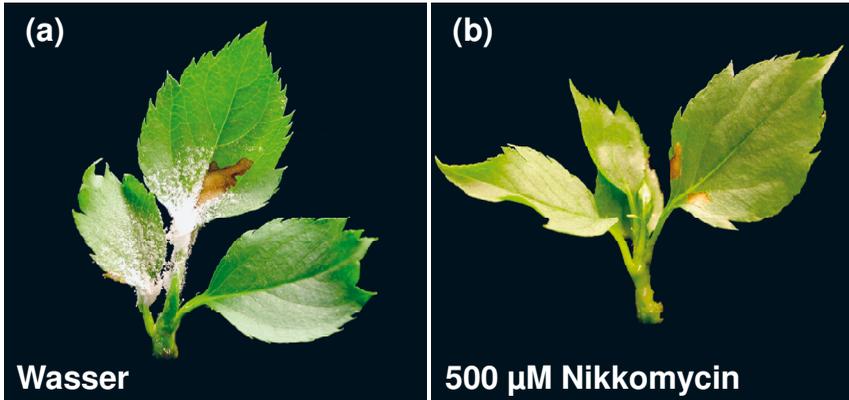


Abbildung 3.27 Wirkung von Nikkomyzin Z auf die Entwicklung des Apfelmehltau-Erregers *P. leucotricha*. (a) 36 Tage nach der Inokulation zeigten die Wasser-behandelten *in-vitro*-Apfelsprosse ein dichtes Pilzmyzel auf der Blattoberfläche. (b) 21 Tage nach der Inokulation zeigten die mit einer 500 µM Nikkomyzin Z-Lösung behandelten *in-vitro*-Apfelsprosse keine Symptome einer Mehltau-Infektion.

3.2.3 Isolierung von *Chitinsynthase Klasse V*-Genen aus den pilzlichen Schaderregern *P. leucotricha* und *V. inaequalis*

Zu Beginn der Arbeit wurde eine Chitinsynthase-Datenbank erstellt. In dieser Datenbank wurden codierende Sequenzen unterschiedlicher Chitinsynthase Klassen von verschiedenen Ascomyceten bzw. Basidiomyceten aus der NCBI-Datenbank eingetragen (Tabelle A.2 im Anhang, Punkt 9.4.2). Anschließend wurde mit der Isolierung des Gens aus den beiden Schaderregern *V. inaequalis* und *P. leucotricha* begonnen.

3.2.3.1 Isolierung von *Chitinsynthase Klasse V*-Genfragmenten mit degenerierten Primern

Für die Amplifikation eines ersten Fragmentes des *Chitinsynthase Klasse V* (*ChsV*)-Gens wurde die genomische DNA von Apfelschorf und Apfelmehltau extrahiert und eine Standard-PCR mit den degenerierten Primern prCHSIV-V.1 und prCHSIV-V.2 (WERNER *et al.* 2002)

durchgeführt. Dabei wurde ein einzelnes PCR-Produkt an genomischer DNA von Apfelschorf amplifiziert. Dieses PCR-Produkt (S10) hatte eine Größe von 660 bp. An genomischer DNA des Apfelmehltau-Erregers wurden insgesamt drei PCR-Produkte amplifiziert (Mil7 mit einer Größe von 732 bp, Mil23 mit einer Größe von 723 bp und Mil30 mit einer Größe von 376 bp). Alle vier PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit der BlastX-Funktion der NCBI-Datenbank in putative Proteinsequenzen umgeschrieben. Die putativen *ChsV*-Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Software MEGA4 in einem Alignment mit allen Proteinsequenzen der Chitinsynthase-Datenbank verglichen. Anschließend wurden die phylogenetischen Distanzen zwischen den einzelnen Sequenzen im *Neighbor-Joining*-Verfahren berechnet (Abbildung 3.28).

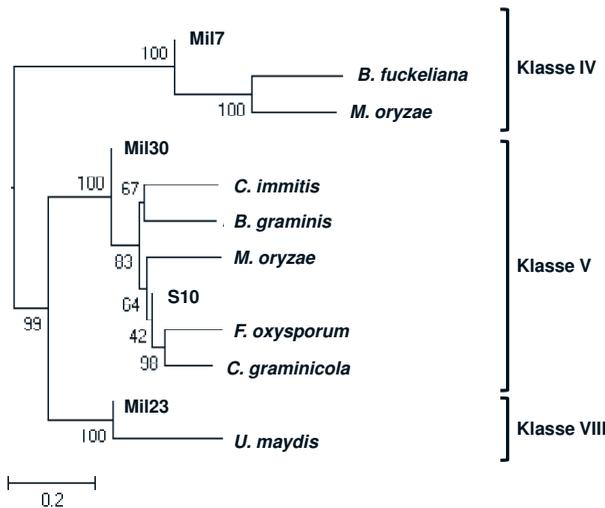


Abbildung 3.28 Phylogenetische Distanzen der amplifizierten PCR-Fragmente putativer Chitinsynthasegene aus *V. inaequalis* und *P. leucotricha*. Verrechnet wurden partielle Proteinsequenzen der isolierten Genfragmente aus *V. inaequalis* und *P. leucotricha* mit 14 Sequenzen von *Chs*-Genen unterschiedlicher Klassen anderer Ascomyceten und 2 Sequenzen von *Chs*-Genen der Basidiomyceten. Der Baum basiert auf einem *Minimum Evolution*-Algorithmus und 1000 Bootstrap-Wiederholungen. Dargestellt sind nur die Klassen IV, V und VIII. Die vier isolierten Genfragmente lassen sich drei unterschiedlichen *Chs*-Klassen zuordnen. S10 und Mil30 clustern innerhalb der *ChsV*-Klasse.

Der phylogenetische Baum in Abbildung 3.28 zeigt, dass die PCR-Produkte S10 aus *V. inaequalis* und Mil30 aus *P. leucotricha* innerhalb der *Chitinsynthase* Klasse V-Gene clusterten. Mil7 wurde der *Chitinsynthase* Klasse IV und Mil23 in der *Chitinsynthase*-Klasse VIII eingeordnet. Für die Isolierung des *Chitinsynthase* Klasse V Gens aus *V. inaequalis* bzw. *P. leucotricha* wurden die Fragmente S10 bzw. Mil30 als Startfragmente ausgewählt. Die Startfragmente wurden für die Ableitung von je drei hintereinander liegenden, sequenzspezifischen Primern in 5'-3'- bzw. 3'-5'-Richtung verwendet.

3.2.3.2 Isolierung des vollständigen *Chitinsynthase* Klasse V-Gens aus *V. inaequalis*

Die Isolierung des *ChsV*-Gens aus dem Apfelschorf-Erreger *V. inaequalis* erfolgte an genomischer DNA. Hierfür wurde die genomische DNA des Apfelschorf-Erregers isoliert. An dieser DNA wurden insgesamt 2 TAIL-PCR-Reaktionen in 5'-3'-Richtung und 4 TAIL-PCR-Reaktionen in 3'-5'-Richtung durchgeführt (Abbildung 3.29). Die amplifizierten TAIL-PCR-Produkte waren zwischen 800 bp und 1.200 bp groß und wurden sequenziert. Jeder neue Sequenzabschnitt hatte eine Überlappung mit der bereits bekannten Gensequenz von 50 bis 100 bp. Auf diese Weise wurden die einzelnen Sequenzen zu einer vollständigen Gensequenz zusammengefügt (im Anhang, Punkt 9.4.4).

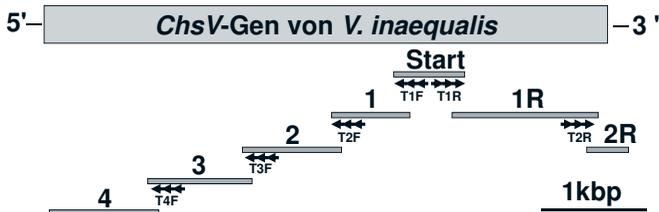


Abbildung 3.29 Isolierung des *ChsV*-Gens aus genomischer DNA von *V. inaequalis*.

Das *ChsV*-Gen wurde mittels TAIL-PCR in sieben Einzelschritten isoliert. Als erstes wurde das Startfragment (Start) mit einer Standard-PCR und degenerierten Primern aus der genomischen Apfelschorf-DNA gewonnen. Die drei hintereinander liegenden Pfeile markieren die Lage der eingestellten TAIL-Primer (Tabelle A.1). *ChsV*- Chitinsynthase Klasse V; T1F – S10T1-1-3F; T2F – S10T2-1-3F; T3F – S10T3-1-3F; T4F – S10T4-1-3F; T1R – S10T1-1-3R; T2R – S10T2-1-3R.

Die genomische Sequenz des *Chitinsynthase* Klasse V-Gens von *V. inaequalis* war insgesamt 6.285 bp lang (Anhang 8.4.4). Für die anschließende Isolierung der kompletten mRNA des Gens wurden als erstes die sequenzspezifischen Primer ViChsVF/ViChsVR abgeleitet. Mit diesen Primern wurde eine Long-Range-PCR an cDNA von *V. inaequalis* durchgeführt. Dabei wurde ein 4.550 bp großes PCR-Produkt amplifiziert und sequenziert. Für die Amplifikation vollständiger cDNA-Enden wurde abschließend eine RACE-PCR durchgeführt. Hierfür wurden am 5'- bzw.-3'-Ende der kodierenden Sequenz jeweils zwei hintereinander liegende, nach außen gerichtete Primer abgeleitet. Für die Amplifikation spezifischer RACE-PCR-Produkte wurden Adaptoren an die Enden der Apfelschorf-mRNA ligiert. In zwei aufeinander folgenden 5'- bzw. 3'-RACE-PCR-Reaktionen mit sequenz- und adapterspezifischen Primern wurden die vollständigen cDNA-Enden des *ChsV*-Gens amplifiziert. Dabei wurde in 5'-Richtung ein 1.100 bp großes RACE-PCR-Produkt und in 3'-Richtung ein 1.000 bp großes RACE-PCR-Produkt amplifiziert. Beide PCR-Produkte wurden sequenziert und zur kodierenden *ChsV*-Gensequenz zusammengefügt. Die kodierende Sequenz ist insgesamt 5.235 bp groß. Das Gen beinhaltet ein Intron mit einer Größe von 47 bp (Base 2.949 bis Base 2.996). Die kodierende Sequenz wurde mit Hilfe der BlastX-Funktion der NCBI-Datenbank in eine Proteinsequenz umgeschrieben. Mit dieser wurde ein Alignment mit allen Proteinsequenzen der Chitinsynthase-Datenbank durchgeführt und anschließend ein phylogenetischer Baum mit dem *Neighbor-Joining*-Verfahren berechnet (Abbildung 3.30).

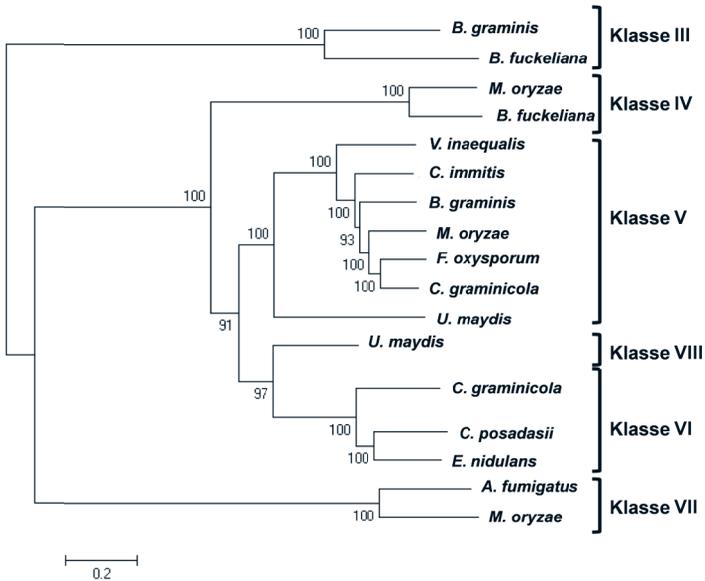


Abbildung 3.30 Phylogenetische Einordnung des vollständig isolierten Chitinsynthasegens aus *V. inaequalis*. Verrechnet wurde die *ChsV*-Proteinsequenz mit 14 Sequenzen von *Chs*-Genen anderer Ascomyceten und 2 Sequenzen von *Chs*-Genen der Basidiomyceten. Der Baum basiert auf einem *Minimum-Evolution*-Algorithmus und 1000 Bootstrap-Wiederholungen. Die putative Proteinsequenz des isolierten Gens aus *V. inaequalis* konnte der *ChsV*-Klasse zugeordnet werden.

Der phylogenetische Baum in Abbildung 3.30 zeigt, dass auch das *ChsV*-Gen aus *V. inaequalis* innerhalb der *ChsV*-Gene clustert. Parallel dazu wurde ein Blast der kodierenden Sequenz des Gens mit der BlastX-Funktion der NCBI-Datenbank durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die *ChsV*-Aminosäuresequenz von *V. inaequalis* eine Homologie von 72,2 Prozent zu der Proteinsequenz von *Glomerella graminicola* (NCBI: AAL23719 bzw. AY052547) zeigte. Durch den Vergleich der beiden Sequenzen konnte die Lage von *ChsV*-typischen, konservierten Domänen lokalisiert werden (Abbildung 3.31). Innerhalb der Proteinsequenz des *ChsV*-Gens von Apfelschorf wurden vier konservierte Regionen detektiert. (1) Die Myosin-Motor-Domäne liegt zwischen Aminosäure 4 bis 650, (2) die Cytochrom b5-ähnliche Bindungsdomäne zwischen Aminosäure 840 bis 896, (3) der Chitinsynthase Domäne zwischen Aminosäure 1203 bis 1423 und (4) die Terminale Dek C-Domäne zwischen Aminosäure 1653 bis 1709 (Abbildung 3.31).

4 Diskussion

4.1 Flp/FRT-vermittelte Entfernung des *nptII*-Gens

Das Flp/FRT-Rekombinationssystem ist ein System, welches bereits häufig bei verschiedenen Pflanzenarten zur Entfernung von Markergenen eingesetzt wurde (VETTER *et al.* 1983; LYZNIK *et al.* 1993; LLOYD UND DAVIS 1994; LYZNIK *et al.* 1995; KILBY *et al.* 1995; KERBACH *et al.* 2005; SHAN *et al.* 2006; LYZNIK *et al.* 2007; GIDONI *et al.* 2008, WOO *et al.* 2009; FLADUNG *et al.* 2010). Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zu testen, ob das Flp/FRT-Rekombinationssystem für eine induzierte und zielgerichtete Entfernung des *nptII*-Markergens aus transgenen Apfelzellen geeignet ist.

4.1.1 Voruntersuchungen transgener Apfelinien

Für die Flp/FRT-vermittelte Entfernung des *nptII*-Gens wurde der Monitoringvektor pB-Npt-Hsp-Flp-Gus erstellt. Die T-DNA des Vektors enthält einen 35S-Promotor, ein FRT-flankiertes Fragment sowie ein *gusA*-Reportergen. Da das Reportergen durch das FRT-flankierte Fragment räumlich vom 35S-Promotor getrennt wird, führt erst die vollständige Entfernung dieser Box zur Expression des Reportergens. Die Verwendung des *gusA*-Gens ermöglicht so eine schnelle und einfache Detektion von Rekombinationsereignissen unter Verwendung des histologischen GUS-Tests.

Für die Apfeltransformation wurde der Monitoringvektor in den *A. tumefaciens*-Stamm GV3101-pMP90RK (HOLSTERS *et al.* 1980; KONZC UND SCHELL 1986) übertragen. In 17 Transformationsexperimenten wurden insgesamt 4.080 junge *in-vitro*-Apfelblätter eines Sämlings der Sorte 'Pinova' mit dem *A. tumefaciens*-Stamm (GV3101-pMP90RK-pB-Npt-Hsp-Flp-Gus) inokuliert und die Blätter anschließend für drei Tage Co-kultiviert. Für den Regenerationsprozess wurden Blattstreifen als Explantate verwendet, welche zwei Schnittkanten aufwiesen. Von den 4.080 inokulierten Blättern konnten insgesamt 36 putativ transgene Regenerate abgenommen und auf M8-Vermehrungsmedium mit 500 µg ml⁻¹ Timentin und 100 µg ml⁻¹ Paramomycin übertragen werden. Von diesen 36 Regeneraten wurden schließlich neun putativ transgene Regenerate selektiert, was einer Transformationsrate von 0,2 Prozent entspricht. Vergleichbare Transformationsraten wurden auch in anderen Studien erzielt (JAMES *et al.* 1989; DE BONDT *et al.* 1994; DE BONDT *et al.* 1996; PUIE UND SCHAART 1996; HANKE *et al.* 1999; SZANKOWSKI *et al.* 2003; FLACHOWSKY *et al.* 2008). Die neun putativ transgenen Regenerate wurden auf M8-

Vermehrungsmedium mit 500 µg ml⁻¹ Timentin und 100 µg ml⁻¹ Kanamycin vermehrt und daraus neun transgene Linien aufgebaut. An DNA bzw. RNA der selektierten transgenen Apfellinien konnte dann gezeigt werden, dass die T-DNA vollständig integriert und funktionsfähig war. So wurden mittels PCR alle übertragenen Gene (*nptII*, *flp*, *gusA*) einzeln nachgewiesen und in einer Long-Range-PCR der T-DNA-Bereich zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen amplifiziert. Dabei wurde an den DNA-Proben aller transgenen Linien wie erwartet ein 4,5 kbp großes PCR-Fragment detektiert. Die Sequenz des PCR-Fragments wurde mit der T-DNA-Sequenz des Monitoringvektors verglichen und festgestellt, dass beide Sequenzen identisch sind. Somit besitzen alle transgenen Linien mindestens eine vollständige T-DNA-Kopie, was anschließend in einer Southern Blot Analyse bestätigt wurde. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass an der RNA aller Linien Transkripte des *nptII*-Gens nachgewiesen wurden, aber keine mRNA-Transkripte des *flp*- oder *gusA*-Gens detektiert werden konnten. Aus diesem Grund konnte davon ausgegangen werden, dass alle transgenen Apfellinien ein vollständiges und funktionsfähiges T-DNA-Konstrukt enthalten.

4.1.2 Untersuchungen zum Hitzestress-induzierbaren *Gmhsp17.5-E*-Promotor

Um eine kontrollierte Rekombination des *FRT*-flankierten Fragments zu erzielen, wurde die Expression des *flp*-Rekombinase-Gens von einem Hitzestress-induzierbaren Promotor reguliert. Eine kontrollierte Genexpression der Rekombinase ist sehr wichtig, damit beispielsweise der Regenerationsprozess transgener Zellen nicht beeinflusst wird. Findet eine Entfernung des *nptII*-Gens während der Regeneration auf selektivem Medium statt, sterben diese Zellen ab. Es könnten keine transgenen Sprossregenerate gewonnen werden. Verwendet wurde der Hitzestress-induzierbare *Gmhsp17.5-E*-Promotor aus der Sojabohne *Glycine max* (CZARNECKA *et al.* 1989; BARROS *et al.* 1992; LYZNIK *et al.* 1995). Die Induktion des *Gmhsp17.5-E*-Promotors erfolgt ausschließlich durch erhöhte Temperaturen. Dies konnte mittels RT-PCR bzw. GUS-Assay an den transgenen Apfelsprossen gezeigt werden. Ohne eine Hitzestress-Behandlung kam es zu keinen Rekombinationsereignissen. Das bedeutet, dass der Promotor bei der in Kulturenräumen durchschnittlich vorherrschenden Temperatur von 24°C nicht induziert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien beschrieben (CRONE *et al.* 2001; FLADUNG *et al.* 2010). Um als erstes die Induzierbarkeit des *Gmhsp17.5-E*-Promotors zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zeit- und Temperaturregime an den transgenen Apfelsprossen getestet. Die gewählten Regime richteten

sich dabei nach den Zeit- und Temperaturangaben anderer Studien (SEVERIN UND SCHÖFFL 1990; LYZNIK *et al.* 1995; CUELLAR *et al.* 2006). Hierfür wurde die Apfellinie T670 verwendet. T670 war die erste transgene Linie, die selektiert und ausreichend vermehrt werden konnte. Um die Experimente standardisiert durchzuführen, wurden für die einzelnen Hitzestress-Behandlungen jeweils frische, drei Wochen alte *in-vitro*-Sprosse verwendet. Nach allen Hitzestress-Experimenten wurden die behandelten Sprosse für 24 Stunden in den Kulturenraum gestellt, da der *Gmhsp17.5-E*-Promotor noch mehrere Stunden nach einer Hitzestress-Behandlung aktiv ist (LYZNIK *et al.* 1995). Von den behandelten Sprossen wurden 24 Stunden später jeweils zwei bis drei Blätter abgenommen und mittels GUS-Test analysiert. Eine GUS-Färbung ist ein Nachweis für GUS-Proteine in Zellen in Folge einer *gusA*-Expression. Es muss also vorher eine erfolgreichen Rekombination des *FRT*-flankierten Fragments stattgefunden haben. Die Intensität der GUS-Färbung scheint abhängig von der Anzahl rekombinierter Zellen zu sein. Deshalb konnten anhand der Ergebnisse des GUS-Assays, Rückschlüsse auf die *Gmhsp17.5-E*-Promotoraktivität, die Expression der *flp*-Rekombinase und die Rekombinationshäufigkeit gezogen werden.

Als erstes wurde getestet, welche Temperatur für die Promotorinduktion notwendig ist. Hierfür wurden Sprosse mit Kallus für acht Stunden bei Temperaturen zwischen 37°C und 42°C behandelt. Diese Sprosse zeigten nach den Hitzestress-Behandlungen keine GUS-Färbung. Da nach drei bis vier Wochen das Wachstum der *in-vitro*-Sprossspitzen weitgehend abgeschlossen ist, könnte dies möglicherweise eine Ursache für eine fehlende Induktion des *Gmhsp17.5-E*-Promotors sein. So wurden bereits in anderen Studien Untersuchungen zur altersabhängigen Expression von Hitzestress-Genen durchgeführt (LIU *et al.* 1989). Dabei wurde festgestellt, dass die Induktion von Hitzestress-Promotoren mit zunehmenden Zellalter abnimmt. Aus diesem Grund wurde zwei Tage bei nachfolgendem Hitzestress der Kallus von den dreiwöchigen Apfelsprossen abgeschnitten. Danach wurden die kallusfreien Sprosse für acht Stunden bei 37°C, 40°C bzw. 42°C behandelt und am nächsten Tag die Blätter mittels GUS-Test analysiert. Nach der Hitzestress-Behandlung bei 37°C wurde noch keine GUS-Färbung beobachtet. Nach der Behandlung bei 40°C wurden erstmalig hellblaue Blattareale detektiert. Diese hellblauen Bereiche sind ein Beweis für die Aktivierung des *Gmhsp17.5-E*-Promotors. Parallel dazu wurden die Blätter der Sprosse geerntet, welche zuvor bei 42°C behandelt wurden. Im GUS-Test wurde festgestellt, dass eine Vielzahl der Zellen eine dunkelblaue GUS-Färbung zeigte. Die zunehmende Anzahl intensiv GUS-gefärbter Zellen könnte auf eine erhöhte Promotoraktivität zurückgeführt werden. LYZNIK *et al.* (1995) konnten in ihren Experimenten zeigen, dass eine Hitzestress-Behandlung transgener

Maisprotoplasten bei 42°C eine erhöhte *Gmhsp17.5-E*-Promotoraktivität bewirkt. Um die Expression von *gusA*- und *nptII*-Gen zu untersuchen, wurden 24 Stunden nach dem Hitzestress Blattproben entnommen. Dabei wurde festgestellt, dass die Behandlung bei 37°C keine *gusA*-Expression bewirkt. Zudem wurden Transkripte des Reportergens ausschließlich in Blattproben jener Sprosse nachgewiesen, die zuvor bei 42°C behandelt wurden. Somit konnte mit der Hitzestress-Behandlung bei 42°C die Expression der *flp*-Rekombinase und die sich anschließende Flp-vermittelte Rekombination des *FRT*-flankierten Fragments erfolgreich induziert werden. Da jedoch gleichzeitig in allen untersuchten, transgenen Blattproben auch Transkripte des *nptII*-Gens nachgewiesen wurden, war die Rekombination offensichtlich nur partiell in den Blattgeweben erfolgt. Deshalb wurde untersucht werden, ob der Anteil rekombinierter Zellen abhängig von der Dauer der Hitzestress-Behandlung ist. Dabei wurde zunächst festgestellt, dass eine Behandlung von weniger als zwei Stunden zu keiner GUS-Färbung in den Geweben führte. Erst eine zweistündige Behandlung bewirkte erste GUS-Aktivitäten. Dabei wurde festgestellt, dass nach einer längeren Hitzestress-Behandlung der Anteil blaufärbter Zellen höher war. Bereits nach einer vierstündigen Behandlung mit 42°C bewirkte einen signifikanten Anstieg der GUS-gefärbten Blattfläche auf circa 60 Prozent. Nach der achtstündigen Behandlung waren schließlich über 80 Prozent der Blattfläche GUS-gefärbt. Die Wiederholung der Hitzestress-Behandlung führte ebenfalls zu einem erhöhten Anteil GUS-positiver Blattflächen. Dennoch wurden nach fast allen Hitzestress-Behandlungen immer wieder farblose Blattstiele bzw. Sprossachsen detektiert.

Auf molekularer Ebene wurde geprüft, ob mit Hilfe der Hitzestress-Behandlung vollständig *nptII*-freie Apfelsprosse erzeugt werden konnten. Hierfür wurden Sprosse der Linie T670 unterschiedlich lange bei 42°C behandelt. Die genomische DNA wurde am Folgetag isoliert und an dieser eine Long-Range-PCR zur Isolierung des T-DNA-Bereichs zwischen *35S*-Promotor und *gusA*-Gen durchgeführt. Dabei wurde an den DNA-Proben nicht-behandelter Blätter und auch an der DNA von Blättern, die bei 37°C inkubiert wurden, das 4,5 kbp PCR-Fragment amplifiziert. Nach der zweistündigen Behandlung wurden an den Blattproben zwei PCR-Fragmente detektiert. Amplifiziert wurden das 4,5 kbp- und ein zweites, 1,2 kbp PCR-Fragment. Nach vier- bzw. achtstündiger Behandlung wurde an den DNA-Proben nur noch das 1,2 kbp Fragment detektiert. Dieses kurze PCR-Fragment wurde sequenziert und die Sequenz mit T-DNA-Sequenz des transformierten Monitoringvektors verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass das gesamte *FRT*-flankierte Fragment fehlt und nur noch eine der beiden *FRT*-Erkennungssequenzen zwischen dem *35S*-Promotor und dem *gusA*-Gen liegt. Dass eine der beiden *FRT*-Erkennungssequenzen im Genom zurück bleibt, ist aus der

Literatur bekannt (LLOYED UND DAVIS 1994; LYZNIK *et al.* 1995; LYZNIK *et al.* 2007; WANG *et al.* 2010). Da diese *FRT*-Sequenz nur 34 bp lang ist, beeinflusst sie die Expression des Reportergens nicht. Und auch wenn in der Long-Range-PCR kein 4,5 kbp Fragment mehr detektiert werden konnte, wurden in einer sich anschließenden RT-PCR an cDNA der Hitzestress-behandelten Blätter immer noch mRNA-Transkripte des *nptII*-Gens amplifiziert. Eine zuverlässige und vor allem vollständige Entfernung des Selektionsmarkers in allen Zellen transgener Apfelsprosse konnte mit keiner Hitzestress-Behandlung realisiert werden. Das Fehlen der Rekombination in einigen Zellen und die Expression des *nptII*-Gens könnten auf die Verwendung vollständiger Apfelsprosse für die Hitzestress-Behandlungen zurückzuführen sein. Bei dieser Art der Hitzestressinduktion ist es sehr unwahrscheinlich, dass sich die Zelltemperatur während der Behandlung in allen Gewebeschichten gleichmäßig auf 42°C erhöht. Auch in anderen Studien wurde diese heterogene Ausbreitung von Hitze in unterschiedlichen Gewebeschichten beschrieben (CUELLAR *et al.* 2006; THOMSEN *et al.* 2009; FLADUNG *et al.* 2010). Die Verwendung differenzierter Gewebe hat zur Folge, dass erst die äußeren Zellschichten erwärmt werden und danach erst die darauffolgenden Bereiche (FLADUNG *et al.* 2010). Dass jedoch die Dauer der Hitzestress-Behandlung ein wesentliches Kriterium für den Rekombinationserfolg in vielen Zellen ist, hat die RT-PCR mit *flp*-spezifischen Primern gezeigt. Hierfür wurden Sprosse der Linie T782 für 30 bis 360 Minuten bei 42°C behandelt und direkt im Anschluss die RNA extrahiert. Die cDNA der isolierten RNA wurde in eine RT-PCR eingesetzt und festgestellt, dass bereits nach einer 30-minütigen Hitzestress-Behandlung mRNA-Transkripte der *flp*-Rekombinase nachgewiesen werden konnten. Da mit einer längeren Behandlung eine Zunahme der Bandenstärke beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass die Anzahl an Zellen zunimmt, in denen eine Expression des *flp*-Gens stattfindet. Vergleichbare Ergebnisse wurden von LYZNIK *et al.* (1995) beschrieben, welche die *Gmhsp17.5-E*-Promotoraktivität anhand der Konzentration von GUS-Molekülen in einer Protoplastenkultur untersuchten. Dabei stellten sie fest, dass die Konzentration der GUS-Proteine während einer vierstündigen Hitzestress-Behandlung nahezu linear anstieg, was auf die zunehmende Anzahl exprimierender Protoplasten und eine gesteigerte Promotoraktivität hinweist (LYZNIK *et al.* 1995).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass der *Gmhsp17.5-E*-Promotor sehr effektiv für die Kontrolle der Flp-vermittelten Rekombination eingesetzt werden kann. Auch das Flp/*FRT*-System ist für die vollständige Eliminierung des *FRT*-flankierten Bereiches und somit für die Entfernung aller überschüssigen Gensequenzen in einer Zelle geeignet. Die Hitzestress-Behandlung führte jedoch nur zu partiell *nptII*-freien Geweben. Ein langfristiges

Ziel für die gentechnologische Modifikation von Apfelsorten ist aber die vollständige Eliminierung des *nptII*-Gens aus allen Zellen. Aus diesem Grund wurde nach einer Strategie gesucht, welche es ermöglicht, vollständig *nptII*-freie Apfelsprosse zu erzeugen. Hierfür schienen zunächst Apfelprotoplasten erfolgversprechend, da auch in einer vorangegangenen Studie zur Flp-vermittelten Rekombination Protoplastenkulturen erfolgreich verwendet wurden (LYZNIK *et al.* 1995). Die Herstellung von Apfelprotoplasten ist methodisch jedoch wesentlich aufwendiger und der Regenerationserfolg um ein Vielfaches geringer (HURWITZ UND AGRIOS 1984; KOUIDER *et al.* 1984; PATAT-OCHATT *et al.* 1988; WALLIN UND JOHANSSON 1989; HUANCARUNA-PERALES UND SCHIEDER 1993; PATAT-OCHATT *et al.* 1993; DING *et al.* 1995; OCHATT UND PATAT-OCHATT 1995; DIEKMANN *et al.* 1998). Im Gegensatz hierzu liegt die Regenerationsrate von Apfelblattexplantaten bei bis zu 100 Prozent (YEPES UND ALDWINCKLE 1994). Zusätzlich existieren am Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst in Dresden-Pillnitz sehr gut etablierte Regenerationsprotokolle für die verwendete Apfelsorte 'Pinova'-Sämling. Deshalb schien ein zusätzlicher Regenerationszyklus Hitzestress-behandelter *in-vitro*-Apfelblätter das effektivste Verfahren zu sein, um vollständig *nptII*-freie Apfelsprosse zu erzeugen.

4.1.3 Die Regeneration vollständig *nptII*-freier Sprossregenerate

Mit der ein- bzw. mehrmaligen Hitzestress-Behandlung ganzer *in-vitro*-Apfelsprosse transgener Linien konnten zwar Rekombinationsereignisse ausgelöst werden, aber vollständig *nptII*-freie Sprosse wurden dabei nicht erzeugt. Da nach einer längeren bzw. wiederholten Hitzestress-Behandlung bei 42°C auch der prozentuale Anteil GUS-gefärbter Blattflächen zunahm, wurde angenommen, dass durch die höhere Anzahl rekombinierter Zellen auch eine höhere Anzahl *nptII*-freier Sprossregenerate im Regenerationsprozess zu erwarten sind. Für die Regeneration wurden die *in-vitro*-Blätter nach den Hitzestress-Experimenten in 5 mm schmale Streifen geschnitten und die Blattexplantate auf LSG-Regenerationsmedium ohne Zugabe eines Selektionsmittels gelegt. Insgesamt wurden die Blätter aus fünf Hitzestress-Experimenten der Linie T670 und aus jeweils einem Hitzestress-Experiment der Linien T781, T782 und T793 zur Regeneration aufgelegt. Im Regenerationsprozess entstehen neue Pflanzen aus einer einzelnen Zelle oder kleineren Zellkomplexen. Ist die Ausgangszelle durch eine Flp-vermittelte Rekombination *nptII*-frei, so entwickelt sich theoretisch auch nur ein uniform *nptII*-freies Sprossregenerat. Nach 16 Wochen konnte eine Vielzahl an Sprossregeneraten aus jedem Hitzestress-Experiment abgenommen und vermehrt werden. Nachdem die

Sprossregenerate ausreichend Blattmaterial gebildet hatten, wurden zwei bis drei Blätter abgenommen und mittels GUS-Screening analysiert. Zwischen 0 und 38 Prozent der Sprossregenerate waren vollständig GUS-positiv gefärbt. Chimäre Regenerate wurden nur noch vereinzelt detektiert. Auffallend war, dass der Anteil putativ *nptII*-freier Sprossregenerate aus dem dreistündigen Hitzestress-Experiment der Linie T670 mit 33 Prozent am höchsten war. Nachdem in Folge der wiederholten Hitzestress-Behandlung der Linie T793 ein sehr hoher Anteil GUS-positiv gefärbter Blattareale detektiert werden konnte, wurde erwartet, dass die Regenerationsrate putativ *nptII*-freier Sprossregenerate ebenfalls um ein Vielfaches erhöht werden könne. Diese lag jedoch auch bei 38 Prozent. Mit Hilfe einer wiederholten Hitzestress-Behandlung konnte somit der Anteil putativ *nptII*-freier Sprossregenerate nicht signifikant erhöht werden. Eine längere Temperaturerhöhung von bis zu acht Stunden an der Linie T670 bewirkte einen höheren Anteil GUS-positiver Blattareale, der Anteil putativ *nptII*-freier Sprossregenerate lag jedoch nur bei circa 16 Prozent. Verantwortlich dafür könnten Zellschäden sein, die wahrscheinlich während der Hitzestress-Behandlung verursacht wurden. Der Nachteil bei der Verwendung eines Hitzestress-induzierbaren Promotors liegt darin, dass der Hitzestress zu den natürlich vorkommenden abiotischen Stressfaktoren zählt, die die Synthese „normaler“ Proteine herabgesetzt und die Produktion von Hitzestress-Proteinen bewirkt wird (LIN *et al.* 1984; VIERLING 1991; SORENSEN *et al.* 2003; WANG *et al.* 2004). An *Malvastrum rotundifolium* wurde beispielsweise gezeigt, dass mit steigender Blatttemperatur auch die Photosyntheserate stetig absinkt (SEEMANN *et al.* 1984). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass eine Behandlung transgener Apfelsprosse über mehrere Stunden bei 42°C zum Absterben einzelner Gewebeteile oder des gesamten Apfelsprosses führte bzw. die Regenerationsrate rekombinierter Zellen herabsetzte. Der verwendete Promotor stammt aus der Sojabohne *Glycine max*, welche wiederum eine sehr hohe Thermotoleranz besitzt und Temperaturen von 45°C toleriert (LIN *et al.* 1984). Der Promotor hat den Vorteil, dass er erst bei 40°C aktiviert werden kann, die Thermotoleranz des Apfels ist jedoch deutlich geringer (WOOLF UND FERGUSON 2000; BOWEN *et al.* 2002). In einer Studie von BOWEN *et al.* (2002) wurde die Wirkung von Hitzestress auf die Lebensfähigkeit von Apfelzellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Lebensfähigkeit von Apfelzellen nach einer Hitzestress-Behandlung bei 38°C nur noch bei 86,4 Prozent, nach einer Behandlung bei 40°C bei 81,7 Prozent und nach einer Stunde bei 42°C nur noch bei 11 Prozent lag (BOWEN *et al.* 2002). Da eine Thermotoleranz gegenüber sonst tödlichen abiotischen Stressfaktoren, zu denen auch Hitze gehört, in fast allen Pflanzen erzeugt werden kann (GONG *et al.* 1998;

PRÄNDL *et al.* 1998; SORENSEN *et al.* 2003), wurde dies auch an den Apfelzellen von BOWEN *et al.* (2002) getestet. Nachdem Zellkulturen eine Stunde mit einer Temperatur von 38°C vorbehandelt wurden, überlebten schließlich 66 Prozent der Zellen eine einstündige Temperaturerhöhung auf 42°C. Wenn vor der eigentlichen Hitzestress-Behandlung die transgenen *in-vitro*-Apfelsprosse mit 38°C vorbehandelt werden, könnte so eine Thermotoleranz aufgebaut werden. Dadurch könnte der physiologische Zustand des Blattmaterials verbessert und auf diese Weise die Regenerationsfähigkeit *nptII*-freier Zellen möglicherweise verbessert werden.

Alle Sprossregenerate, deren Blätter im GUS-Test vollständig blau gefärbt waren, wurden als putativ *nptII*-frei eingestuft. Sprossregenerate, die im GUS-Test sowohl farblose als auch blau gefärbte Blattgewebe zeigten, wurden als chimäre Sprossregenerate klassifiziert. Waren die Blätter vollständig farblos, wurden diese Sprossregenerate als nicht-rekombiniert eingeordnet. Für die sich anschließenden molekularen Untersuchungen wurden zunächst alle putativ *nptII*-freien Sprossregenerate T781/R19-6, T782/R22-2A, T782/R22-3A, T782/R22-3B, T782/R22-3E und T782/R22-4A, sowie ein partiell GUS-positives Regenerat T782/R29-8D und ein GUS-negatives Regenerat T782/R29-8A auf nicht-selektivem M8-Vermehrungsmedium vermehrt. Aus den Blättern dieser Sprossregenerate wurde die genomische DNA bzw. die Gesamt-RNA extrahiert. Als erstes wurde an der DNA der putativ *nptII*-freien Regenerate T670/R13A, T781/R19-6 und T782/R22-2A eine Long-Range-PCR zur Isolierung des T-DNA-Bereichs zwischen 35S-Promotor und *gusA*-Gen durchgeführt. Dabei wurde in allen drei untersuchten DNA-Proben das 1,2 kbp PCR-Fragment amplifiziert. Anschließend wurde die DNA aller oben genannten Regenerate mit einer PCR auf die Integration der einzelnen Transgene geprüft und in allen untersuchten Proben das *gusA*-Gen nachgewiesen. Das *nptII*-Gen wurde dabei noch an der DNA aller putativ *nptII*-freien Sprossregenerate der Linie T670, dem nicht-rekombinierten Sprossregenerat T782/R29-8A und auch an der DNA des chimären Regenerats T782/R29-8D amplifiziert. An der genomischen DNA der vollständig GUS-gefärbten Regenerate T781/R19-6, T782/R22-2A, T782/R22-3A, T782/R22-3B, T782/R22-3E und T782/R22-4A wurde das *nptII*-Gen nicht nachgewiesen. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch eine RT-PCR mit *nptII*- und *gusA*-spezifischen Primern. Dabei wurde festgestellt, dass Transkripte des *nptII*-Gens ausschließlich an cDNA-Proben von Regeneraten amplifiziert worden waren, an deren DNA bereits die Integration des *nptII*-Gens nachgewiesen wurde. Auffallend war, dass in allen vollständig GUS-positiven Regeneraten der Linie T670 die Expression beider Transgene detektiert wurde. Ein Southern Blot zeigte schließlich, dass von den vier T-DNA-Integrationen der Ausgangslinie T670 nur eine in den

GUS-positiven Regeneraten rekombiniert war. Die vollständige Rekombination des *FRT*-flankierten Fragments war bei den Linien T781 und T782 einfacher, da diese nur eine T-DNA-Integration enthalten. An der DNA aller putativ *nptII*-freien Sprossregenerate der Linien T781 bzw. T782 wurde das *nptII*-Gen nicht mehr amplifiziert und auch an cDNA waren keine mRNA-Transkripte des *nptII*-Gens mehr nachweisbar. Somit kann bei diesen beiden Linien angenommen werden, dass eine uniforme GUS-Färbung regenerierter Zellen mit einer vollständigen Eliminierung des *FRT*-flankierten Fragments zusammenhängt. Abschließend wurden Sprosse des Regenerats T782/R22-2A ausgewählt, um exemplarisch die vollständige Entfernung des Selektionsmarkers zu demonstrieren. Sprosse wurden hierfür auf selektives M8-Medium mit Paromomycin übertragen. Die Sprosse waren binnen weniger Wochen tot, was zeigte, dass das *nptII*-Gen nicht mehr exprimiert wurde.

4.1.4 Flp/FRT-Rekombinationssystem für die effiziente Entfernung des *nptII*-Gens und die Möglichkeit zur gezielten Integration neuer Zielgene

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Flp-vermittelte Rekombination zu einer vollständigen Eliminierung des gesamten *FRT*-flankierenden Bereichs in transgenen Apfelsprossen führt. Mittels PCR und RT-PCR konnten weder das *nptII*-Gen, noch mRNA-Transkripte von diesem, an der DNA bzw. cDNA vollständig GUS-positiv gefärbter Sprossregenerate der Linien T781 und T782 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es auch zu keiner Re-Integration an der verbleibenden *FRT*-Erkennungssequenz gekommen ist. Die Autoren anderer Studien schätzen das Risiko einer Re-Integration in Folge der Rekombination ebenfalls als gering ein (KERBACH *et al.* 2005; THOMSON *et al.* 2009). Mit der Eliminierung des *FRT*-flankierten Fragments und des *nptII*-Markergens wurden somit alle überflüssigen Gensequenzen aus der genomischen DNA dieser T-Linien entfernt. Eine erneute Transformation transgener Pflanzen ist schwierig, solange der Selektionsmarker noch im transgenen Genom integriert ist (KRENS *et al.* 2004). Die nachträgliche Entfernung des Markergens hätte den Vorteil, dass eine zweite Transformationrunde mit den bereits gentechnologisch modifizierten Pflanzen möglich ist (ALDWINKLE *et al.* 2008). Auf diese Weise könnten *nptII*-freie transgene Sorten genutzt werden, um beispielsweise apfeleigene Resistenzgene gentechnologisch zu pyramidisieren. In neusten Studien wurde gezeigt, dass eine Integration in eine bereits vorhandene *FRT*-Sequenz in pflanzlichen Genomen möglich ist (FLADUNG *et al.* 2010; NANDY UND SRIVASTAVA 2010;

SRIVASTAVA UND GIDONI 2010). Die Übertragung weiterer Zielgene an der verbleibenden *FRT*-Erkennungsstelle hätte somit den Vorteil, dass die Transgen-Integration gezielt an einer bereits identifizierten Stelle im Genom erfolgen würde und der Transformationserfolg ebenfalls mittels GUS-Assay überprüft werden kann. Untersuchungen von FLADUNG *et al.* (2010) haben jedoch gezeigt, dass hierfür die Transformation von zwei Vektoren notwendig war. Ein Konstrukt enthielt ein *bar*-Gen, welches transgenen Pflanzen eine Resistenz gegenüber dem Herbizid Hygromycin vermittelt (THOMPSON *et al.* 1987). Der andere Vektor enthielt das FLP/*FRT*-Rekombinationssystem für die Integration des *bar*-Gens an einer bereits vorhandenen *FRT*-Sequenz im pflanzlichen Genom. Hierfür wurde *flp*-Rekombinase ebenfalls von einem Hitzestress-induzierbaren Promotor reguliert, war jedoch dauerhaft im Espengenom integriert (FLADUNG *et al.* 2010). Das Ziel für einen praxisorientierten Einsatz des Rekombinationssystems beim Apfel ist die Eliminierung aller überflüssigen Gensequenzen, was bei einer dauerhaften Integration des FLP/*FRT*-Systems im Apfelgenom nicht möglich wäre. Für die Pyramidisierung apfeleigener Resistenzgene ist deshalb die Transformation von *nptII*-freien, transgenen Apfelsprossen mit weiteren Vektorkonstrukten methodisch einfacher. Effektive Konstrukte sollten dabei das *FRT*-flankierte Fragment, ein zusätzliches Selektionssystem und anstelle des *gusA*-Gens ein Zielgen enthalten.

4.1.5 Praxisorientierte Verbesserung des FLP/*FRT*-Rekombinationssystems

Ein langfristiges Ziel ist der Einsatz der FLP/*FRT*-Rekombination zur effizienten Erzeugung von *nptII*-freien, gentechnologisch modifizierten Apfelpflanzen. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Rekombinationsereignisse mit Hilfe des Reportergens *gusA* und dem histologischen GUS-Test evaluiert. Auf diese Weise war die Identifizierung vollständig bzw. partiell *nptII*-freier Sprossregenerate methodisch sehr einfach. In einem anwendungsorientierten Einsatz sollte schließlich das Reportergen mit einem gewünschten Zielgen ausgetauscht werden. Hierfür ist eine zusätzliche Selektion *nptII*-freier Regenerate notwendig. Deshalb wurde ein neues Konstrukt erstellt (Abbildung 4.1). Dieses Konstrukt enthält in der *FRT*-flankierten Region einen zusätzlichen Selektionsmarker und wurde bereits für neue Transformationsexperimente eingesetzt. Als Selektionsmarker wurde das D-Aminosäure-Oxidase 1-Gen (*dao1*) genutzt.



Abbildung 4.1T-DNA des Monitoringvektors mit einem zweiten Selektionssystem. Das *nptII*-Gen dient der Selektion putativ transgener Apfelfellen nach der Vektortransformation. Zusätzlich wurde der *dao1*-Selektionsmarker im *FRT*-flankierten Fragment (schwarz) eingefügt. Nach der Hitzestress-Behandlung werden die Blattexplantate auf nicht-selektives Regenerationsmedium gelegt. Nach diesem Regenerationsprozess können mit Hilfe einer Positiv- oder Negativselektion vollständig *nptII*-freie Sprossregenerate von *dao1*-transgenen, nicht-rekombinierten Apfelfellen unterschieden werden. LB – linke Bordersequenz der T-DNA; 35SP – *CaMV* 35S Promotor; *nptII* – Neomycinphosphotransferase II; *dao1* – D-Aminosäure-Oxidase 1 Gen; HSP – Hitze-Stress-Promotor; *flp* – Rekombinase; *gusA* – β -Glucuronidase; T – Terminatoren; RB – rechte Bordersequenz der T-DNA.

Das D-Aminosäure-Oxidase 1-Gen (*dao1*) stammt aus der Hefe *Rhodotorula gracilis* und kodiert das FAD-abhängige Enzym D-Aminosäure-Oxidase (POLLEGIONI *et al.* 1993; ALONSO *et al.* 1998; GHOLIZADEH UND KOHNEHROUZ 2009). Katalysiert wird die oxidative Desaminierung der D-Aminosäuren (CURTI *et al.* 1992), welche einer der am meisten untersuchten Stoffwechselwege im D-Aminosäure-Metabolismus ist und in einer Vielzahl von eukaryotischen Organismen, wie Hefen, Pilzen, Insekten, Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetieren bekannt ist (PILONE 2000). Eine Aktivität des DAAO-Enzyms in Pflanzen wurde bisher nicht beschrieben. Deshalb ist dieses für den Einsatz als Selektionsmarker bestens geeignet (ERIKSON *et al.* 2004; LAI *et al.* 2007; TRIFONOVA *et al.* 2009a, b). Im Gegensatz zu vergleichbaren Selektionssystemen aus *E. coli* (ERIKSON *et al.* 2005; LAI *et al.* 2007) können *dao1*-transgene Apfelsprosse in Abhängigkeit des verwendeten Substrats positiv bzw. negativ selektiert werden (HÄTTASCH *et al.* 2009). Dabei zeigte HÄTTASCH *et al.* (2009), dass die Zugabe von 20 mM D-Serin das Wachstum nicht-transgener Apfelsprosse hemmt. Im Gegensatz dazu wird das Wachstum *dao1*-transgener Apfelsprosse durch die Zugabe von D-Isoleucin gehemmt. Diese Eigenschaft des DAAO-Selektionssystems könnte effizient für die Identifikation von rekombinierten, *nptII*-freien Sprossregeneraten genutzt werden. Für die Identifikation *nptII*-freier Apfelsprosse wurde das *dao1*-Gen innerhalb des *FRT*-flankierten Fragments zwischen *nptII*-Gen und *flp*-Gen integriert. Eine Rekombination bewirkt die Entfernung dieser Box und die Eliminierung des *dao1*-Gens aus dem pflanzlichen Genom. Nach der Hitzestress-Behandlung können die Blattexplantate auf nicht-selektives LSG-Regenerationsmedium bzw. Regenerationsmedium mit D-Isoleucin übertragen werden. Die Untersuchungen von HÄTTASCH *et al.* (2009) lassen jedoch annehmen, dass eine selektive Regeneration vollständig *nptII*-freier Apfelsprossen kaum erfolversprechend ist. Während

des Regenerationsprozesses auf nicht-selektivem Medium können mehrere hundert Apfelsprosse in wenigen Wochen heranwachsen. Diese können entweder *nptII*-frei oder chimär sein. Alle diese Regenerate mittels PCR zu testen, wäre enorm zeit- und kostenaufwendig. Mit Hilfe des M8-Vermehrungsmediums und der Zugabe von D-Isoleucin könnten im Anschluss an die Regeneration hunderte Sprossregenerate einfach und schnell gescreent werden. Durch die Rekombination des *FRT*-flankierten Fragments ist zu erwarten, dann nur die *nptII*-freien Regenerate auf selektivem M8-Vermehrungsmedium wachsen. Es ist anzunehmen, dass alle vitalen Sprosse dann auch vollständig *nptII*-frei sein könnten.

Um auch in transgenen Linien mit mehreren T-DNA-Integrationen die Rekombinationsrate zu erhöhen, könnte der GC-Gehalt des *flp*-Gens erhöht werden. Das *flp*-Rekombinase-Gen des verwendeten Monitoringvektors ist identisch mit dem natürlich vorkommenden Gen aus der Bäckerhefe (NCBI EU334847). Dieses hat einen GC-Gehalt von 37 Prozent. In mehreren Studien wurde jedoch bereits festgestellt, dass der GC-Gehalt für die heterologe Genexpression von Bedeutung ist (WOHLLEBEN *et al.* 1988; GUSTAFSSON *et al.* 2004; SONG UND NIEDERWEIS 2007; FEDORYSHYN *et al.* 2008; FLADUNG *et al.* 2010). In Untersuchungen von FLADUNG *et al.* (2010) wurde der GC-Gehalt des *flp*-Gens durch das Einfügen des Introns *Sits1* aus Kartoffel auf 45 Prozent erhöht und im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte heterologe Expression des Gens in transgener Espe erzielte (FLADUNG *et al.* 2010). Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie könnte angenommen werden, dass auch in transgenen Apfelzellen eine erhöhte Genexpression auch zu einer erhöhten Rekombinationsrate innerhalb einer Zelle führt.

4.2 HIGS- eine neue Strategie zur RNAi-basierten Verbesserung der Resistenz in transgenen Kulturpflanzen

Die Methode der wirtinduzierten Genstilllegung (HIGS) wurde kürzlich entwickelt, um *Knock-Down*-Stämme von obligat biotrophen Pilzen, wie *Blumeria graminis* oder *Puccinia striiformis f. sp. tritici*, zu erzeugen (NOWARA *et al.* 2010; YIN *et al.* 2011). Diese HIGS-Strategie könnte aber auch bei transgenen Kulturpflanzen eingesetzt werden, um die Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen zu verbessern. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit erste initiale Experimente durchgeführt, welche sich mit einer solchen Resistenzstrategie beim Apfel beschäftigten.

4.2.1 Die Aufnahme pflanzlicher siRNA in die pilzlichen Hyphen

Voraussetzung für den Erfolg einer HIGS-Strategie beim Apfel ist die Aufnahme pflanzlicher siRNAs in den pilzlichen Schaderreger *P. leucotricha*. So wurde bereits bei der Gerste festgestellt, dass die in Pflanzenzellen produzierten siRNAs während der Infektion in *Blumeria graminis* aufgenommen werden und zur Stilllegung eines spezifischen Gens führen (NOWARA *et al.* 2010). Deshalb wurden in der hier vorliegenden Arbeit als erstes Untersuchungen zur Aufnahme und zum Transport von siRNA-Molekülen von pflanzlichen Zellen in pilzliche Hyphen durchgeführt. Hierfür wurden *in-vitro*-Apfelsprosse mit dem Apfelmehltau-Erreger *P. leucotricha* inokuliert und drei Tage später in eine Lösung mit siRNA-Molekülen gestellt. Die dafür verwendeten, 19nt kurzen siRNA-Moleküle waren unspezifisch und mit Fluoreszein markiert. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass siRNA-Moleküle aus der Lösung über die Leitbahnen in die Blätter aufgenommen wurden. Ein Teil der pflanzlichen Zellen fluoreszierte. Die fluoreszierenden siRNAs wurden auch in den pilzlichen Hyphen und asexuellen Konidien beobachtet. Dies war ein erstes Indiz für die Aufnahme von siRNA-Molekülen aus den pflanzlichen Zellen in *P. leucotricha*. Somit ist auch anzunehmen, dass die von transgenen Pflanzen produzierten RNAi-Signale während einer Infektion von dem Schaderreger absorbiert werden können. Ob die Aufnahme der unspezifischen siRNAs passiv erfolgt oder an einen ATP-abhängigen Transportmechanismus gekoppelt ist, sollte in einem zweiten Versuchsansatz untersucht werden. Deshalb wurden weitere *in-vitro*-Apfelsprosse mit *P. leucotricha* inokuliert. Drei Tage nach der Inokulation wurde ein Teil der Sprosse mit dem Fungizid Flint® behandelt. Flint® enthält das Strobilurin Trifloxystrobin (SCHRAMM *et al.* 1978; REUVENI 2000; BARTELETT *et al.* 2002). Strobilurine wirken als Atmungsblocker und greifen im Zentrum des Cytochrom bc 1-Komplexes in die

pilzliche Atmungskette ein (SIEROTZKI *et al.* 2000). Die Fungizid-behandelten Blätter wurden ebenfalls in eine siRNA-Lösung gestellt und zwei Tage später mikroskopisch analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass fluoreszierende siRNA-Moleküle in den pflanzlichen Blattgeweben zu finden waren. Die siRNAs wurden somit erfolgreich von den pflanzlichen Leitgeweben aufgenommen und in Blattzellen transportiert. In den Pilzhyphen oder anderen pilzlichen Strukturen wurden jedoch keine Fluoreszenz-Signale identifiziert. Der Strobilurin-behandelte Pilz war nicht mehr in der Lage, die siRNA-Moleküle aktiv aus den pflanzlichen Epidermiszellen aufzunehmen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die siRNA-Aufnahme entweder selbst ein aktiver, ATP-gebundener Prozess ist oder an einen anderen ATP-gebundenen Prozess gekoppelt ist. Aktive Transportprozesse finden zwischen biotrophen Pilzen und einer pflanzlichen Wirtszelle statt. Dies wurde auch von HAHN UND MENDGEN (2001) beschrieben, welche vermuten, dass die strukturellen und funktionellen Eigenschaften solcher Interaktionen zwischen biotrophen Pilzen und deren Wirtspflanze denen einer Mykorrhiza-Symbiose sehr stark ähneln (HAHN UND MENDGEN 2001). Bei einer Mykorrhiza-Symbiose ist der Transport verschiedener Nährstoffe, von Kohlenhydraten oder Aminosäuren zwischen Pflanzenzellen und Mykorrhiza-Pilzen überwiegend an ATPase-gebundene Prozesse in den pflanzlichen und pilzlichen Zellmembranen gekoppelt (Übersicht SMITH *et al.* 1994). HAHN UND MENDGEN (2001) beschreiben, dass die Entwicklung eines biotroph lebenden Pilzes an pflanzliche Stoffwechselwege gebunden ist, wobei Proteine oder chemische Signale übertragen werden. KEMEN *et al.* (2005) konnten beispielsweise pilzliche Proteine in den befallenen Wirtszellen isolieren, die von den Haustorien des obligat biotrophen Rostpilzes *Uromyces fabae* übertragen wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aufnahme synthetischer siRNA aus pflanzlichen Epidermiszellen ATP-gebunden ist. Unklar ist jedoch weiterhin, ob die pilzlichen Haustorien ausschließlich einzelsträngige bzw. doppelsträngige pflanzliche siRNA aufnehmen. Sicher scheint, dass siRNA-Moleküle am HIGS-Prozess beteiligt sind und in die pilzlichen Strukturen aufgenommen werden (NOWARA *et al.* 2010). So wurde der Transport von RNAi-Signalen, insbesondere der einzelsträngigen und kurzen siRNA-Moleküle, zwischen parasitischen Pflanzen wie *Triphysaria versicolor* (FRISCH und MEY) und ihrem Wirt beschrieben (WESTWOOD *et al.* 2009). Auch in diesen Wirt-Parasit-Systemen wurden spezifische Genstilllegungen mit Hilfe der siRNAs erzeugt (TOMILOV *et al.* 2008). Innerhalb einer Pflanze findet zudem eine systemische Ausbreitung der RNA-Interferenz nach dem 'source to sink'-Prinzip statt (KEHR UND BUHTZ 2008). Dabei werden siRNA-Moleküle über das Phloem

in junge Blätter transportiert (YOO *et al.* 2004; KEHR UND BUHTZ 2008) und können dort auch von biotrophen Schaderregern aufgenommen werden.

4.2.2 Chitinsynthase Klasse V-Genen als potentielle Targets zur RNAi-basierten Erhöhung der Resistenz in transgenen Apfelpflanzen

Die Expression von *Chitinsynthase* der Klasse V-Genen (*ChsV*) ist für die Zellwandstabilität und die pathogene Lebensweise pilzlicher Schaderreger essentiell (AMNUAYKANJANASIN *et al.* 2003; MADRID *et al.* 2003; RUIZ-HERRERA *et al.* 2002; RUIZ-HERRERA UND SAN-BLAS 2003; RONCERO 2002; MARTÍN-UDÍROZ *et al.* 2004; WERNER *et al.* 2007; WALLY *et al.* 2008). Aus diesem Grund scheint das *ChsV*-Gen auch als Zielgen für eine wirtinduzierte Genstilllegung sehr geeignet. Da von dem obligat biotrophen Pilz *P. leucotricha* keine *Knock-Out*-Stämme hergestellt werden können, sollte die Bedeutung der Chitinsynthasen während der pilzlichen Entwicklung mit dem Chitinsynthese-Hemmer Nikkomyzin Z analysiert werden. Nikkomyzin Z hemmt die Vernetzung der N-Acetylglucosamine in der pilzlichen Zellwand und führt dabei zu einer instabilen Zellwand. Das Resultat sind deutliche Deformationen der Hyphenstrukturen. Für die Versuche wurden die beiden Schaderreger mit einer 500 µM Nikkomyzin Z-Lösung behandelt und am nächsten Tag mikroskopisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass einzelne Keimhyphen von *P. leucotricha* geschwollen waren. Im Gegensatz dazu wurde nach der Behandlung von *V. inaequalis* mit dem Chitinsynthese-Hemmer fast nur noch eine anormale Hyphenmorphologie detektiert. Bis zu 30 µm große, blasige Strukturen wurden dabei vor allem an den Hyphenspitzen von *V. inaequalis* beobachtet. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch bei dem Gerstenmehltau-Erreger *Blumeria graminis* bzw. *Glomerella graminicola* gemacht (ZHANG *et al.* 2000; WERNER *et al.* 2007). In einem weiteren Versuch wurde die Bedeutung der Chitinsynthasen für die Entwicklung von *P. leucotricha* auf Apfelblättern untersucht. Hierfür wurden *in-vitro*-Apfelsprosse mit *P. leucotricha* inokuliert. Anschließend wurden die Sprosse entweder mit Wasser oder mit einer 500 µM Nikkomyzin Z-Lösung behandelt. Drei Wochen nach der Inokulation wurde festgestellt, dass die wasserbehandelten Blätter eine Mehltau-Infektion zeigten. Die charakteristische Bepuderung der Blätter war durch die Behandlung mit Wasser reduziert. Dies kann jedoch darauf zurück geführt werden, dass die Konidien teilweise abgespült wurden. Auf den Nikkomyzin Z-behandelten Blättern hingegen konnte gar keine Mehltauinfektion mehr beobachtet werden. Der Pilz war nicht zu einer Infektion von *in-vitro*-Apfelblättern fähig. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Chitinsynthase als Target für

die wirtinduzierte Resistenzserhöhung geeignet scheint. Eine Stilllegung des *ChsV*-Gens würde bei einer Infektion transgener Wirtszellen mit *P. leucotricha* mit hoher Wahrscheinlichkeit die Zellwandsynthese beeinflussen und die Krankheitsentwicklung hemmen.

4.2.3 Isolierung des *Chitinsynthase Klasse V* Gens aus *P. leucotricha* und *V. inaequalis*

Für die Nutzung der wirtinduzierten Resistenzstrategie wurde in der hier vorliegenden Arbeit versucht, die *ChsV*-Gene aus den pilzlichen Schaderregern *V. inaequalis* und *P. leucotricha* zu isolieren. Zu Beginn dieser Arbeit stand für die Extraktion genomischer DNA von *P. leucotricha* kein Pilzmaterial zur Verfügung. Deshalb wurde zu diesem Zeitpunkt isolierte DNA von Einzelsporisolen verwendet, die dankenswerterweise von S. Lesemann und F. Dunemann (Julius Kühn Institut, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst) zur Verfügung gestellt wurde. Für die Erhöhung der DNA-Konzentration wurde die DNA mit dem Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplifikation Kit (GE Healthcare) vervielfältigt. Später wurden für die Extraktion genomischer DNA die Hyphen und Konidien von *P. leucotricha* von der Oberfläche infizierter Gewächshauspflanzen mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das Pilzmaterial wurde mit 0,5 mm kleinen Precells-Glaskügelchen zerkleinert. Auf diese Weise war eine mechanische Zerkleinerung der Zellwände auch bei den sehr kleinen Konidien möglich. Nachdem das Pilzmaterial mechanisch zerkleinert worden war, erfolgte die DNA- bzw. RNA-Extraktion. Häufig werden dafür Präparationsmethoden, wie die CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Methode, eingesetzt (CHOMCZYNSKI UND SACCHI 1987; SALOHEIMO *et al.* 1991; DÖBBELING *et al.* 1997; CUBERO *et al.* 1999; URBANIETZ UND DUNEMANN 2005; WERNER *et al.* 2007). Solche Präparationsmethoden setzen jedoch eine hohe Ausgangsmenge pilzlichen Materials voraus. Da solche Mengen an Pilzmaterial nicht verfügbar waren, wurde die DNA-Extraktion mit dem DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) und die RNA-Extraktion mit dem Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. Die dabei gewonnenen Konzentrationen extrahierter Nukleinsäuren waren im Vergleich mit anderen Präparationsmethoden gering, aber dafür sehr sauber und für Einsatz in den PCR-Reaktionen sehr gut geeignet. Mit der Amplifikation der *ChsV*-Gene aus *P. leucotricha* bzw. *V. inaequalis* wurde mittels einer PCR und degenerierten Primern an genomischer DNA begonnen. Die degenerierten Primer wurden bereits erfolgreich für die Isolierung des *ChsV*-Gens aus *Glomerella graminicola* eingesetzt (WERNER *et al.* 2007). Für *P. leucotricha* wurden

insgesamt drei unterschiedliche PCR-Fragmente amplifiziert und sequenziert. Die genomische Sequenz wurde mit der BlastX-Funktion der NCBI-Datenbank in eine Proteinsequenz umgeschrieben und mit anderen Chitinsynthase-Genen verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass nur das Mil30-PCR-Fragment Ähnlichkeiten mit anderen *ChsV*-Genen zeigte. Die höchste Übereinstimmung zeigte die isolierte Sequenz zu dem *ChsV*-Gen von *Aspergillus teraeus* (NCBI: EAU38076). Auffallend war, dass die drei amplifizierten Sequenzen Ähnlichkeiten zu drei unterschiedlichen Pilzgattungen und Mil23 sogar Ähnlichkeiten zu Basidiomyceten zeigten. Deshalb wurde die PCR mit den degenerierten Primern zusätzlich mit frischer genomischer DNA wiederholt, die von Christian Kröling mit einer modifizierten Methode nach STEINER *et al.* (1995) extrahiert wurde. An dieser DNA wurde ein 661 bp großes PCR-Fragment (*CkChsV*) amplifiziert und die Sequenz mit der BlastN- und BlastX-Funktion mit Sequenzen in der NCBI-Datenbank verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass die Nukleinsäuresequenz dem *ChsV*-Gen des Gerstenmehltau-Erregers *Blumeria graminis* zu 79 Prozent ähnlich ist. *P. leucotricha* und *B. graminis* gehören beide zu der Gattung *Erysiphales*. *B. graminis* ist die nächstverwandte Art zu *P. leucotricha*, von welcher die Sequenz des *ChsV*-Gens bekannt ist. Die Nukleotidsequenz des *CkChsV*-Fragments wurde mit der Sequenz des Mil30-PCR-Fragments verglichen. Dabei wurde eine Ähnlichkeit von lediglich 74,6 Prozent festgestellt. Anschließend wurden auch die putativen Proteinsequenzen beider Fragmente miteinander verglichen, wobei diese eine Ähnlichkeit von 97 Prozent zeigten. Somit kann angenommen werden, dass das Mil30-Fragment ein *ChsV*-Gen ist. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass dieses nicht aus *P. leucotricha*, sondern aus einem anderen Pilz stammt. Dies wiederum könnte auf verunreinigte DNA zurück geführt werden. Durch den Einsatz des Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kits (GE Healthcare, München) zur Amplifikation dieser DNA könnte die Kontamination noch zusätzlich verstärkt worden sein. Besser scheint deshalb die Vermehrung von *P. leucotricha* auf *in-vitro*-Apfelsprossen, welcher dann von infizierten Blättern abgesaugt werden kann.

Die Isolierung des *ChsV*-Gens aus *V. inaequalis* erfolgte als erstes an genomischer DNA. Begonnen wurde die Genisolierung mit einer PCR mit den degenerierten Primern (siehe oben). Dabei wurde ein PCR-Fragment amplifiziert, dessen Sequenz den *ChsV*-Genen anderer Pilze sehr ähnlich war. Anschließend wurden jeweils drei hintereinander liegende, nach außen gerichtete Primer am 5'- bzw. 3'-Ende der amplifizierten Sequenz abgeleitet. Die Genisolierung erfolgte nun mit Hilfe der Thermal asymmetric interlaced (TAIL) PCR (LIU UND WHITTIER 1995; LIU UND HUANG 1998). Diese PCR wurde häufig für die Isolierung von unbekanntem genomischen Regionen eingesetzt (LIU *et al.* 1995, TERAUCHI UND KAHL

2000). Dabei werden oftmals PCR-Fragmente mit einer Größe von weniger als 1.000 bp amplifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist jedoch, dass nur geringe DNA-Konzentrationen für die einzelnen PCR-Reaktionen benötigt werden. Die Durchführung der TAIL-PCR ist zudem kostengünstig, da keine zusätzlichen Reagenzien oder Kitsysteme erforderlich sind. Um die kodierende Sequenz des *ChsV*-Gens aus *V. inaequalis* zu isolieren, wurde als erstes eine Long-Range-PCR mit genspezifischen Primern und cDNA durchgeführt. Die erhaltene Sequenz wurde anschließend für die Ableitung von Primern genutzt, die für die Amplifikation der cDNA-Enden in einer RACE-PCR eingesetzt wurden. Die RACE-PCR ist eine PCR-Methode, um unbekannte 5'- und 3'-Enden von mRNA-Transkripten eines Gens zu vervielfältigen (FROHMAN *et al.* 1988; JAIN *et al.* 1992). In einem abschließenden Alignment wurde die isolierte genomische bzw. kodierende Gensequenz mit *Chs*-Genen anderer Pilze verglichen und ein phylogenetischer Stammbaum berechnet. Dabei wurde festgestellt, dass das isolierte Gen aus *V. inaequalis* ein *ChsV*-Gen ist.

4.2.4 Verbesserung der Resistenz gegenüber Apfelschorf *V. inaequalis*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenz des *ChsV*-Gens von *V. inaequalis* aus genomischer DNA und mRNA isoliert und sequenziert. Obwohl *V. inaequalis* subkutikulär lebt, ist eine Fähigkeit zur Aufnahme von RNAi-Signalen nicht ausgeschlossen. Während der pflanzlichen Entwicklung und zur Adaption an Umweltveränderungen ist eine interzelluläre Kommunikation essentiell (KEHR UND BUHTZ 2008). Hierfür existieren sogenannte Plasmodesmata, welche Signalstoffe und auch RNAi-Signale auf kurzen Distanzen von Zelle zu Zelle selektiv transportieren (KEHR UND BUHTZ 2008). Parallel dazu ist *V. inaequalis* in der Lage, pflanzliche Bestandteile zu lösen bzw. Nährstoffe über Diffusion zu absorbieren (WILLIAMS UND KUC 1969). Es wurde auch die Existenz von zytoplasmatischen Verbindungen, sogenannte Ektodesmata, beschrieben. Diese stellen eine Verbindung des Schaderregers zu dem pflanzlichen Zytoplasma dar (WILLIAMS UND KUC 1969). Ob der Apfelschorf-Erreger über diese Ektodesmata pflanzliche siRNA-Moleküle aus dem Interzellullarraum aufnehmen kann, könnte mit den unspezifischen, Fluoreszein-markierten siRNA-Molekülen überprüft werden. Untersuchungen zur siRNA-Aufnahme wurden jedoch noch nicht realisiert, da zunächst erst noch ein zuverlässiger *in-vitro*-Infektionstest etabliert werden muss.

5 Zusammenfassung

Eines der wichtigsten Ziele gentechnologischer Arbeiten ist die Erzeugung transgener Kulturpflanzen ohne die Verwendung von Selektionsmarkergenen. Die Selektion transgener Zellen erfolgt beim Apfel (*Malus x domestica* BORKH.) in der Regel im Anschluss an einen *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer mit dem *nptIII*/Kanamycin-System. Im Oktober 2002 wurde eine neue EU-Freisetzungsrichtlinie (2001/18/EG) rechtskräftig. Im Rahmen dieser Richtlinie ist vorgesehen, dass die Verwendung von Markergenen, insbesondere von Antibiotikaresistenzgenen, eingeschränkt werden soll. Das bedeutet, dass die Freisetzung gentechnisch modifizierter Organismen, welche beispielsweise das *nptIII*-Gen als Selektionsmarker enthalten, unzulässig ist. Aus diesem Grund ist die Etablierung alternativer Selektionsstrategien zwingend notwendig. Aktuell ist jedoch noch kein vergleichbares Selektionssystem zur Ablösung des *nptIII*/Kanamycin-Systems beim Apfel verfügbar. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Funktionsfähigkeit und Anwendbarkeit des Flp/*FRT*-Rekombinationssystems zur nachträglichen Entfernung des *nptIII*-Gens an Apfel untersucht. Ziel dabei war die Erzeugung gentechnisch modifizierter Apfelsprosse, die keinen Selektionsmarker mehr enthalten. Für die Untersuchungen wurde ein Monitoringvektor erstellt und in den *Agrobacterium*stamm GV3101-pMP90RK übertragen. Mit diesem Stamm wurden in 17 Transformationsexperimenten insgesamt 4.080 *in-vitro*-Apfelblätter inokuliert und neun transgene Linien aufgebaut. Der transformierte Vektor enthält auf der funktionellen T-DNA einen *CaMV 35S*-Promotor und ein *gusA*-Reportergen. Dazwischen liegt ein sogenanntes *FRT*-flankiertes Fragment, welches das *gusA*-Gen räumlich vom *CaMV 35S*-Promotor trennt. Dieses *FRT*-flankierte Fragment besteht aus dem *nptIII*-Markergen und dem *flp*-Rekombinase-Gen, welches von dem Hitzestress-induzierbaren Promotor *Gmhsp17.5E* aus der Sojabohne *Glycine max* reguliert wurde. Eine Expression von *gusA* wurde somit erst nach der Entfernung des *FRT*-flankierten Fragments erwartet. Dies ermöglichte eine schnelle Detektion von Rekombinationsereignissen mittels histologischen GUS-Tests. Die Linie T670 war die erste transgene Apfelinie, die selektiert und vermehrt werden konnte. Mit den Sprossspitzenkulturen dieser Linie wurden verschiedene Zeit- und Temperaturregime zur Induktion des *Gmhsp17.5E*-Promotors durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass eine Behandlung transgener Apfelsprosse bei 42°C Flp-vermittelte Rekombinationen bewirkte. Die Hitzestress-induzierte Rekombination erfolgte jedoch nicht in allen Zellen gleichzeitig, denn es wurden überwiegend Sprosse mit Mischgeweben detektiert. Um vollständig *nptIII*-freie, transgene Apfelsprosse zu erzeugen, wurden die Blätter der Linien

T670, T781, T782 und T793 nach einer Hitzestress-Behandlung geerntet und die Blattstreifen für 16 Wochen auf Regenerationsmedium ohne selektierendes Kanamycin aufgelegt. Für die Detektion putativ *nptII*-freier Sprosse wurden im Anschluss an die Regeneration stichprobenartig jeweils bis zu 40 Sprossregenerate ausgewählt und mittels GUS-Test analysiert. Auf diese Weise konnten bis zu 38 Prozent GUS-positive, putativ *nptII*-freie Sprossregenerate identifiziert werden. Die molekularen Untersuchungen an genomischer DNA und mRNA verschiedener Sprossregenerate der Linien T781 und T782 haben gezeigt, dass die Regeneration Hitzestress-behandelter Blätter vollständig *nptII*-freie Apfelsprosse erzeugte. Um das Flp/*FRT*-Rekombinationssystem praxisorientiert zu verbessern, wurde ein weiterer Monitoringvektor konstruiert, welcher ein zusätzliches Selektionssystem enthält. Mit diesem zweiten Selektionssystem könnten *nptII*-freie Sprossregenerate gezielt selektiert und der Vektor später zur Übertragung gewünschter Zielgene eingesetzt werden. Auf diese Weise ist es zukünftig möglich, gentechnologisch modifizierte Apfelpflanzen zu erzeugen, die langfristig keine Antibiotikaresistenzgene mehr tragen.

Ein weiteres grundlegendes Ziel gentechnologischer Arbeiten in der Apfelzüchtung besteht in der Erhöhung der Resistenz gegenüber biotischen Schaderregern. Im Mittelpunkt des Interesses steht besonders die Verbesserung der Resistenz gegenüber phytopathogenen Pilzen, wie dem Apfelmehltau *Podospaera leucotricha* und dem Apfelschorf *Venturia inaequalis*. Für verschiedene apfeleigene Resistenzquellen existieren zwar molekulare Marker, die Sequenzen beteiligter Resistenzgene sind bisher jedoch kaum identifiziert. Aus diesem Grund ist die Verwendung arteigener Resistenzgene für gentechnologische Ansätze bislang kaum möglich. Eine Erfolg versprechende Methode stellte deshalb die RNAi-basierte Stilllegung von Genen des Krankheitserregers dar. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Experimente mit Apfel durchgeführt, die eine wirtinduzierte Abwehrstrategie gegenüber den pilzlichen Schaderregern untersuchten. Als erstes wurde der Transport synthetischer, Fluoreszein-markierter siRNA-Moleküle aus pflanzlichen Blättern in die Hyphen von *P. leucotricha* gezeigt. Die Behandlung des Pilzes mit einem Atmungsblocker hat zusätzlich verdeutlicht, dass die Aufnahme pflanzlicher siRNAs in pilzliche Infektionsstrukturen wahrscheinlich ein ATP-abhängiger Prozess ist. Der effiziente Einsatz eines RNAi-induzierten Resistenzmechanismus an Apfelpflanzen setzt die Stilllegung eines essentiellen Pilzgens voraus. Hierfür wurde das *Chitinsynthase* Klasse V-Gen als potentielles Target ausgewählt und mit der Isolierung des Gens aus *P. leucotricha* und *V. inaequalis* begonnen. Die Expression dieses Gens ist für die Zellwandstabilität und die pilzliche Entwicklung essentiell (WERNER *et al.* 2007), weshalb die Stilllegung eines solchen Gens

die Krankheitsentwicklung des Apfelmehltaus bzw. Apfelschorfs an transgenen Apfelblättern verlangsamen oder sogar hemmen könnte.

6 Summary

One of the most important goals in genetic engineering is the generation of marker-free transgenic crops. Subsequent to an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer, the *nptIII*/kanamycin system is usually applied for the selection of transgenic apple cells (*Malus x domestica* BORKH.). In October 2002 the European government enacted a Council Directive (2001/18/EG) which prohibits the release of genetically modified (gm) organisms carrying selective markers such as the *nptIII* gene. The establishment of alternative selection strategies is therefor compulsory. Still, until now no comparable system is available to replace the *nptIII*/kanamycin selection system for apple transformation experiments. In the present study, the operability and applicability of the Flp/*FRT* recombination system in order to remove the *nptIII* gene after the selection of transgenic apple cells was analyzed. The overall aim was the generation of gm apple plants which do not carry the selective marker. A monitoring vector was constructed and transferred into the *Agrobacterium* strain GV3101pMP90RK. The transgenic strain was then used to inoculate 4,080 *in-vitro* apple leaves in 17 different apple transformation experiments and nine gm apple lines were finally selected. The functional T-DNA of the vector contains the *CaMV 35S* promoter and a *gusA* reporter gene which were spatially separated by a *FRT*-flanked box. This *FRT*-flanked box contained the *nptIII* gene and the *flp* recombinase gene which was regulated by the heat-shock-inducible promoter *Gmhsp17.5E* from the soybean *Glycine max*. Consequently, expression of *gusA* was only expected after elimination of the *FRT*-flanked box. Each recombination event could be detected by using histochemical GUS Assays. The first obtained transgenic apple line, T670, was used to investigate different time and temperature regimes for the *Gmhsp17.5E* promoter induction. An effective promoter induction and Flp-mediated recombination was observed after treatment of apple shoots at 42°C. However, the heat-shock-induced recombination did not occur concurrently in all cells, because shoots with chimeric tissues were often detected. To generate fully *nptIII*-free gm apple plants, the leaves of the lines T670, T781, T782 and T793 were sampled after heat-shock-treatment and the explants placed on regeneration medium without the selective agent kanamycin for 16 weeks. Up to forty shoot regenerates were randomly chosen and analyzed using the GUS Assay after regeneration process in order to detect putative *nptIII*-free apple shoots up. Using this method, up to 38 percent of the

studied regenerates were identified as GUS positive and putatively *nptII*-free. In addition, the molecular analysis on genomic DNA and mRNA of selected shoot regenerates of the lines T781 and T782 showed that the regeneration of heat-shock-treated leaves generate fully *nptII*-free gm apple shoots. To increase the efficiency of Flp/*FRT* recombination system another monitoring vector was created which contained a second selection system. Using this second selection system, *nptII*-free apple plants could potentially be identified without the use of *gusA*. For the long term the transfer of target genes and the generation of gm apple plants which do not carry antibiotic resistance genes will be possible.

Another important aim in genetic engineering of apple breeding programs is the increase of resistance against biotic pathogens. Especially an improved resistance against pathogenic fungi like the apple powdery mildew *Podosphaera leucotricha* and apple scab *Venturia inaequalis* is highly requested. Although molecular markers exist for different apple resistant loci, nucleotide sequences of involved genes are yet unknown. Hence the use of apple resistance genes is not possible in genetic modification experiments of apple plants. A promising method is the RNAi-mediated gene silencing in pathogenic fungi. In the second part of the present study, experiments were thus conducted, performed in which a host-induced defense mechanism against fungal pathogens was analyzed. First, we showed the transport of synthetic, Fluorescein-labeled siRNA molecules from plant leaves into the hyphae of *P. leucotricha*. The treatment of the fungus with a respiration blocker additionally illustrated that absorption of herbal siRNAs into fungal infection structures is probably an ATP-dependent process. For an efficient application of RNAi-induced resistance mechanisms in gm apple plants, the silencing of an essential fungal gene is required. We chose the *chitinsynthase* class V gene as a potential target and started with the gene isolation from *P. leucotricha* and *V. inaequalis*. The expression of *ChsV* genes is essential for cell wall stability and fungal development (AMNUAYKANJANASIN *et al.* 2003; MADRID *et al.* 2003, WERNER *et al.* 2007). Due to these facts the silencing of *ChsV* may trigger a reduced or inhibited disease development of the apple powdery mildew disease or apple scab.

7 Präsentationen und Publikationen

Präsentationen

- HERZOG K, FLACHOWSKY F, DEISING HB, HANKE M-V (2009). Preliminary results to generate marker-free gm-plants with increased fungal resistance in apple (*Malus x domestica* BORKH.). 5. Plant Sciences Student Conference, 23.-26.06.2009, Halle.
- HERZOG K, FLACHOWSKY F, DEISING HB, HANKE M-V (2009). Preliminary results to generate marker-free apple plants (*Malus x domestica* BORKH.) with increased fungal resistance. 2. Nachwuchswissenschaftler Forum des Julius Kühn-Instituts, 17.-19.11.2009, Berlin-Dahlem. Julius-Kühn-Archiv 424, S. 24.
- HERZOG K, FLACHOWSKY F, KÖLLMER S, HANKE M-V, SCHWEIZER P, DEISING HB, (2010). Chancen durch Gentechnik – Neue Wege zur gesunden Pflanze. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06.-09.09.2010. Julius-Kühn-Archiv 428, S. 64.
- HERZOG K, WÜRDIG J, FLACHOWSKY H, DEISING HB, HANKE M-V (2011). Heat-shock regulated excision of the nptII marker gene in transgenic apple (*Malus x domestica* BORKH.). XIII Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, 11.-15.09.2011, Warschau, Polen, S. 68.

Publikation

HERZOG K, FLACHOWSKY H, HANKE M-V (2009). Erste Ergebnisse zur Etablierung eines Sicherheitsvektorsystems an Apfel (*Malus x domestica* BORKH.) zur Erzeugung markergenfreier gm-Pflanzen. Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut 1.Nachwuchswissenschaftler Forum 419 2009, 24-28.

Akzeptierte Publikation

HERZOG K, FLACHOWSKY H, DEISING HB UND HANKE M-V (2012). Heat-shock-mediated elimination of the *nptIII* marker gene in transgenic apple (*Malus x domestica* BORKH.). Gene.

8 Literaturverzeichnis

- ADAMS TH, BOYLAN MT UND TIMBERLAKE WE (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 54, 353-362.
- AIYAR A (1999) The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment. *Bioinformatics Methods and Protocols*, 132 (2), 221-241.
- ALDWINKLE HS, MALNOY MA UND BOREJSZA-WYSOCKA (2008) Genetic transformation of apple without the use of a selectable marker. United States Patent Application Publikation, US 2008/0213454 A1.
- ALONSO J, BARREDO JL, DIEZ B, MELLADO E, SALTO F UND GARCIA JL (1998) D-amino acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*). *Microbiology*, 144, 1095-1101.
- AMNUAYKANJANASIN A, EPSTEIN L UND LABAVITCH JM (2003) Physiological, biochemical and microscopic analyses of weakened walls of conidia in *Colletotrichum graminicola* with a disrupted class V chitin synthase gene, *chsA*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63, 107-115.
- AN GH (1985) High-efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 79(2), 568-570
- AYLOR DE (1998) The aerobiology of apple scab. *Plant Disease*, 82 (8), 838-849.
- BAILEY C UND ARST JR HN (1975) Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *European Journal of Biochemistry*, 51, 573-577.
- BARROS MD, CZARNECKA E UND GURLEY WB (1992) Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Molecular Biology*, 19, 665-675.
- BARTELETT DW, CLOUGH JM, GODWIN JR, HALL AA, HAMER M UND PARR-DOBZANSKI B (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58 (7), 649-662.
- BARTNICKI-GARCÍA S (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Reviews in Microbiology*, 22, 87-107.
- BAULCOMBE D (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 356-363.

-
- BELFANTI E, SILFVERBERG-DILWORTH E, TARTARINI S, PATOCCHI A, BARBIERI M, ZHU J, VINATZER BA, GIANFRANCESCHI L, GESSLER C UND SANSAVINI S (2004) The *HcrVf2* gene from wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America PNAS, 101 (3), 886-890.
- BERNSTEIN E, CAUDY AA, HAMMOND SM UND HANNON GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature, 409, 363-366.
- BLOCK M UND DEBROUWER D (1991) Two T-DNA's co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus. Theoretical and Applied Genetics, 82 (3), 257-263.
- BOLAR JP, BROWN SK, NORELLI JL UND ALDWINCKLE HS (1999) Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 55, 31-38.
- BOLAR JP, NORELLI JL, WONG K-W, HAYES CK, HARMAN GE UND ALDWINCKLE HS (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. Phytopathology, 90 (1), 72-77.
- BOWEN J, LAY-YEE M, PLUMMER K UND FERGUSON I (2002) The heat shock response is involved in thermotolerance in suspension-cultured apple fruit cells. Journal of Plant Physiology, 159, 599-606.
- BRASIER CM (1991) *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathologia, 115, 151-161.
- BRAUN U (1995) The powdery mildews of Europe. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- BRODERSEN P UND VOINNET O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. Trends in Genetics, 22 (5), 268-280.
- BURCHILL RT (1965) Seasonal fluctuations in spore concentrations of *Podosphaera leucotricha* (Ell. and Ev.) Salm. in relation to the incidence of leaf infections. Annals of Applied Biology, 55 (3), 409-415.

-
- BUS V, RANATUNGA C, GARDINER S, BASSETT H UND RIKKERINK E (2000) Marker assisted selection for pest and disease resistance in the New Zealand apple breeding programme. *Acta Horticulturae* 538 (2), 541-547.
- CABONI E, LAURI P UND D'ANGELI S (2000) *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Reports*, 19, 755-760.
- CADDICK MX, GREENLAND AJ, JEPSON I, KRAUSE K-P, QU N, RIDDELL KV, SALTER MG, SCHUCH W, SONNEWALD U UND TOMSETT AB (1998) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology*, 16, 177-180.
- CAFFIER V UND LAURENS F (2005) Breakdown of *Pl2*, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. *Plant Pathology*, 54 (2), 116-124.
- CAFFIER V UND PARISI L (2007) Development of apple powdery mildew on sources of resistance to *Podosphaera leucotricha*, exposed to an inoculum virulent against the major resistance gene *Pl-2*. *Plant Breeding*, 126 (3), 319-322.
- CHEN S, HOFIUS D, SONNEWALD U UND BÖRNKE F (2003) Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *The Plant Journal*, 36, 731-740.
- CHEVREAU E, TAGLIONI JP, CESBRON C, DUPIUS F, SOURICE S, BERRY I, BERSEGEAY A, DESCOMBIN J UND LORIDON K (2007) Feasibility of alternative selection methods for transgenic apple and pear using the detoxification gene *Vr-ERE*. *ISHS Acta Horticulturae*, 738, 277-281.
- CHIGIRA Y, ABE K, GOMI K UND NAKAJIMA (2002) *chsZ*, a gene for a novel class of chitin synthase from *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics*, 41, 261-267.
- CHILTON M-D, TEPFER DA, PETIT A, DAVID C, CASSE-DELBART F UND TEMPÉ J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 295, 432-434.
- CHOMCZYNSKI P UND SACCHI N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.

-
- CHRISTIE PJ, ATMAKURI K, KRISHNAMOORTHY V, JAKUBOWSKI S UND CASCALES E (2005) Biogenesis, architecture and function of bacterial type IV secretion systems. Annual Review of Microbiology, 59, 451-485.
- CRANDALL CS (1926): Apple breeding at the University of Illinois. Bull. 111. Agric. Exp. Sta. 2751 337-600.
- CRONE D, RUEDA J, MARTIN KL, HAMILTON DA UND MASCARENHAS JP (2001) The differential expression of a heat shock promotor in floral and reproductive tissues. Plant, Cell and Environment, 24, 869-874.
- CUBERO OF, CRESPO A, FETEH J UND BRIDGE PD (1999) DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. Plant Systematics and Evolution, 216, 243-249.
- CUELLAR W, GAUDIN A, SOLÓRZANO D, CASAS A, NOPO L, CHUDALAYANDI P, MEDRANO G, KREUZE J UND GHISLAIN M (2006) Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato. Plant Molecular Biology, 62, 71-82.
- CURTI B, RONCHI S UND PILONE SM (1992) D- and L-amino acid oxidases. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Müller F ed), 69-94, CRC Press, Boca Raton, FL.
- CZARNECKA E, KEY JL UND GURLEY WB (1989) Regulatory domains of the Gmhsp17.5-E heat shock promotor of soybean. Molecular and Cellular Biology, 9 (8), 3457-3463.
- DALE EC UND OW DW (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. PNAS, 88 (23), 10558-10562.
- DALEY M, KNAUF VC, SUMMERFELT KR UND TURNER JC (1998) Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. Plant Cell Reports, 17, 489-496.
- DE BONDT A, EGGERMONT K, DRUART P, DE VIL M, GODERIS I, VANDERLEYDEN J UND BROEKAERT WF (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. Plant Cell Reports, 13, 587-593.

-
- DE BONDT A, EGGERMONT K, PENNINGCKX I, GODERIS I UND BROEKAERT W (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 15, 549-554.
- DEGENHARDT J, POPPE A, MONTAG J UND SZANKOWSKI I (2006) The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Reports*, 25, 1149-1156.
- DEGENHARDT J, POPPE A, RÖSNER L UND SZANKOWSKI I (2007) Alternative selection systems in apple transformations. *ISHS Acta Horticulturae*, 738.
- DEPICKER A, HERMAN I, JACOBS S, SCHELL J UND VAN MONTAGU M (1985) Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to *Agrobacterium* plant cell interaction. *Molecular and General Genetics*, 201, 477-484.
- DEVEAUX Y, PEAUCELLE A, ROBERTS GR, COEN E, SIMON R, MIZUKAMI Y, TRAAS J, MURRAY JAH, DOONAN JH UND LAUFS P (2003) The ethanol switch: a tool for tissue-specific gene induction during plant development. *The Plant Journal*, 36, 918-930.
- DIEKMANN M, HANKE MV, HUANCARUNA-PERALES E UND SCHIEDER O (1998) Advances in protoplast techniques for *Malus* and *Prunus*. *ISHS Acta Horticulturae* 484.
- DING AP, WANG HF UND CHAO YF (1995) Plant regeneration from cotyledon and cell suspension protoplasts of apple (*Malus x domestica* cv. Starkrimson. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40, 145-149.
- DÖBBELING U, BÖNI R, HÄFFNER A, DUMMER R UND BURG G (1997) Method for simultaneous RNA and DNA extraction from biopsy material, culture cells, plants and bacteria. *BioTechniques*, 22, 88-90.
- DOELLING JH UND PIKAARD CS 1(1993) Transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts derived from rapidly established cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 12 (5), 241-244.
- DOLGOV SV AND SKRYABIN KG (2004) Transgenic apple clonal rootstock resistant to basta herbicide. *ISHS Acta Horticulturae* 663.

-
- DOLGOV SV UND HANKE M-V (2006) Transgenic temperate fruit tree rootstocks. Tree Transgenesis, Part D, 335-350.
- DUNCAN DB (1955) Multiple range and multiple *F* tests. Biometrics, 11, 1-42.
- ELBASHIR SM, MARTINEZ J, PATKANIOWSKA A, LENDECKEL W UND TUSCHL T (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. The EMBO Journal, 20, 6877-6888.
- ELLIS MA, FERREE DC UND SPRING DE (1981) Photosynthesis, transpiration and carbohydrate content of apple leaves infected by *Podospaera leucotricha*. Phytopathology, 71 (4), 392-395.
- ERIKSON O, HERTZBERG M UND NÄSHOLM T (2004) A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. Nature biotechnology, 22 (4), 455-458.
- ERIKSON O, HERTZBERG M UND NÄSHOLM T (2005) The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation. Plant Molecular Biology, 57, 425-433.
- FARGARD M, HOEFTE H UND VERNHETTES (2000) Cell wall mutants. Plant Physiology and Biochemistry, 38, 15-25.
- FEDORYSHYN M, PETZKE L, WELLE E, BECHTHOLD A UND LUZHETSKYY A (2008) Marker removal from actinomycetes genome using Flp recombinase. Gene, 419, 43-47.
- FENNING TM UND GERSHENZON J (2002) Where will the wood come from? Plantation forests and the role of biotechnology. Trends in Biotechnology, 20 (7), 291-296.
- FERREIRA RB, MONTEIRO S, FREITAS R, SANTOS CN, CHEN Z, BATISTA LM, DUARTE J, BORGES A UND TEIXEIRA AR (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. Molecular Plant Physiology, 8 (5), 677-700.
- FILIPOWICZ W (2005) RNAi: The nuts and bolts of the RISC machine. Cell, 122 (1), 17-20.
- FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE UND MELLO CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 391, 806-811.

-
- FISCHER M UND FISCHER C (1999) Evaluation of *Malus* species and cultivars at the fruit genebank Dresden-Pillnitz and its use for apple resistance breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46, 235-241.
- FISCHER M UND FISCHER C (2002) The Dresden-Pillnitz long-term apple breeding program and its results. *The Compact Fruit Tree*, 35 (1), 21-25.
- FLACHOWSKY H, BIRK T UND HANKE M-V (2003) Preliminary results to establish an alternative selection system for apple transformation. *ISHS Acta Horticulturae* 663.
- FLACHOWSKY H, HANKE M-V, ELO A UND SOPANEN T (2005) BpMADS4 – a mads box gene of birch induces flowers on transgenic apple plants in vitro. *ISHS Acta Horticulturae* 738.
- FLACHOWSKY H, PEIL A, SOPANEN T, ELO A UND HANKE M-V (2007) Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early-flowering in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Breeding*, 126, 137-145.
- FLACHOWSKY H, RIEDEL M, REIM S UND HANKE M-V (2008) Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11 (1).
- FLADUNG M, SCHENK TMH, POLAK O UND BECKER D (2010) Elimination of marker genes and targeted integration via *FLP/FRT* recombination system from yeast in hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.). *Tree Genetics and Genomes*, 6, 205-217.
- FLAVELL RB, DART D, FUCHS RL UND FRALEY RT (1992) Selectable marker genes: safe for plants? *Nature Bio/Technology*, 10, 141-144.
- FRAMOND AJ, BARTON KA UND CHILTON M-D (1983) MINI-Ti: A new vector strategy for plant genetic engineering. *Nature Bio/technology*, 1, 262-269.
- FREY JE, FREY B, SAUER C UND KELLERHALS M (2004) Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. *Plant Breeding*, 123 (6), 554-557.
- FRIEDRICH G (1993) *Handbuch des Obstbaus*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

-
- FROHMAN MA, DUSH MK UND MARTIN GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *PNAS*, 85 (23), 8998-9002.
- FUTCHER AB (1988) The 2 μ m circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 4, 27-40.
- GATZ C UND LENK I (1998) Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Sciences*, 3 (9), 352-358.
- GAUGHRAM JP, LAI MH, KIRSCH DR UND SILVERMAN SJ (1994) Nikkomyzin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 in vitro and in vivo. *Journal of Bacteriology*, 176 (18), 5857-5860.
- GERCHEVA P, ZIMMERMAN RH, OWENS LD, BERRY C UND HAMMERSCHLAG FA (1994) Particle bombardment of apple leaf explants influences adventitious shoot formation. *HortScience*, 29 (12), 1536-1538.
- GESSLER C, SUHNER S, DORN B UND KOLLER B (2000) Genetic diversity of the apple mildew fungus *Podosphaera leucotricha*: DNA-markers give surprising results, artefacts or relevant role of sexuality? *IOBC/WPRS Bulletin*, 23 (12), 105-110.
- GESSLER C UND PATOCCHI A (2007) Recombinant DNA Technology in apple. *Green Gene Technology-Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 107, 113-132.
- GHOLIZADEH A UND KOHNEHROUZ BB (2009) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an active fused *Zea mays* L. D-amino acid oxidase. *Biochemistry (Moscow)*, 74 (2), 137-144.
- GIDONI D, SRIVASTAVA V UND CARMÍ N (2008) Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 44 (6), 457-467.
- GITLIN L, KARELSKY S UND ANDINO R (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 418, 430-434.
- GOLIC KG UND LINDQUIST S (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, 59 (3), 499-509.

-
- GONG M, VAN DER LUIT A, KNIGHT MR UND TREWAVAS AJ (1998) Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiology*, 116, 429-437.
- GUSTAFSSON C, GOVINDARAJAN S UND MINSHULL J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22, 346-353.
- HAGEN S, MARX F, RAM AF UND MEYER V (2007) The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (7), 2128-2134.
- HAHN M UND MENDGEN K (2001) Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*, 4 (4), 322-327.
- HANKE M-V, DÜRING K, NORELLI JL UND ALDWINCKLE HS (1998) Transformation of apple cultivars with T4-lysozyme-gene to increase fire blight resistance. *ISHS Acta Horticulturae* 489.
- HANKE M-V, HILLER I, KLOTZSCHE G, WINKLER K, EGERER J, RICHTER K, NORELLI JF UND ALDWINCKLE HS (1999) Transformation in apple for increased disease resistance. *ISHS Acta Horticulturae* 538.
- HANKE M-V UND FLACHOWSKY H (2010) Chapter 17-Fruit Crops. Genetic Modification of Plants-Biotechnology in Agriculture and Forestry 64, 307-348.
- HARRIS SA, ROBINSON JP UND JUNIPER BE (2002) Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*, 18 (8), 426-430.
- HÄTTASCH C, FLACHOWSKY H UND HANKE M-V (2008) Systemic acquired silencing of a *gusA* transgene in apple. *Acta Horticulturae* 839, 393-396.
- HÄTTASCH C, FLACHOWSKY H UND HANKE M-V (2009) Evaluation of an alternative D-amino acid/DAAO selection system for transformation in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology – Isafruit Special Issue*, 188-194.
- HELLENS RP, MULLINEAUX P UND KLEE H (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti-vectors. *Trends in Plant Science*, 5, 446-451.

-
- HOEKEMA A, HIRSCH PR, HOOYKAA PJJ UND SCHILPEROORT RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Natur*, 303, 179-180.
- HOLSTERS M, SILVA B, VAN VLIET F, GENETELLO C, DE BLOCK M, DHEASE P, DEPICKER A, INZE D, ENGLER G UND VILLARROEL R (1980) The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid*, 3, 212-230.
- HOSHIKA S, MINAKAWA N, KAMIYA H, HARASHIMA H UND MATSUDA A (2005) RNA interference induced by siRNAs modified with 4'-thioribonucleosides in cultured mammalian cells. *FEBS Letters*, 579 (14), 3115-3118.
- HOWARD EA, ZUPAN JR, CITOVSKY V UND ZAMBRYSKI PC (1992) The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: Implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell*, 68 (1), 109-118.
- HUANCARUNA-PERALES EH UND SCHIEDER O (1993) Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 71-76.
- HURWITZ CD UND AGRIOS AG (1984) Isolation and culture of protoplasts from apple callus and cell suspension culture. *Journal of Americans Society of Horticulture Science*, 109, 348-350.
- JACKSON AL, BARTZ SR, SCHELTER J, KOBAYASHI SV, BURCHARD J, MAO M, LI B, CAVET G UND LINSLEY PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*, 21, 653-637.
- JAIN R, GOMER RH UND MURTAGH JJ (1992) Increasing specificity from the PCR-RACE technique. *Biotechniques*, 12 (1), 58-59.
- JAMES DJ, PASSEY AJ, BARBARA DJ UND BEVAN M (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports*, 7, 658-661.
- JAMES DJ, PASSEY AJ, WEBSTER AD, BARBARA DJ, VISS P, DANDEKAR AM UND URATSU SL (1992) Transgenic apples and strawberries: advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. *ISHS Acta Horticulturae* 336.

-
- JARONCZYK K, CARMICHAEL JB UND HOBMAN TC (2005) Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others? *Biochemical Journal*, 387, 561-571.
- JEFFERSON AF, KAVANAGH TA UND BEVAN MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6 (13), 3901-3907.
- JIANG NG (1986) An preliminary study on the center of origin of genus *Malus* Miller. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1, 94-96.
- JOSHI SG, SORIANO JM, KORTSTEE A, SCHAART JG, KRENS FA, JACOBSEN E UND SCHOUTEN HJ (2008) Development of cisgenic apples with durable resistance to apple scab. *ISHS Acta Horticulturae* 839, 403-406.
- JUNIPER BE, WATKINS R UND HARRIS SA (1996) The origin of the apple. *ISHS Acta Horticulturae* 484.
- JUNKER BH, CHU C, SONNEWALD U, WILLMITZER L UND FERNIE AR (2003) In plants the *alc* gene expression system responds more rapidly following induction with acetaldehyde than with ethanol. *FEBS Letters*, 535, 136-140.
- KAEPPLER HF (2000) Food Safety Assessment of Genetically Modified Crops. *Agronomy Journal*, 92, 793-797.
- KAMATH RS, FRASER AG, DONG Y, POULIN G, DURBIN R, GOTTA M, KANAPIN A, LE BOT N, MORENO S, SOHRMANN M, WELCHMAN DP, ZIPPERLEN P UND AHRINGER J (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Natur*, 421, 231-237.
- KEHR J UND BUHTZ A (2008) Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of experimental Botany*, 59 (1), 85-92.
- KELLERHALS M, SZÉKELY T, SAUER C, FREY JE UND PATOCCHI A (2009) Pyramidisieren von Schorfresistenzen in der Apfelzüchtung. *Erwerbs-Obstbau*, 51, 21-28.
- KEMEN E, KEMEN AC, RAFIQI M, HEMPEL U, MENDGEN K, HAHN M UND VOEGELE RT (2005) Identification of a Protein from Rust Fungi Transferred from *Haustoria* into Infected Plant Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (11), 1130-1139.

-
- KENNEDY J UND TURNER G (1996) Δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl- D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. Molecular Genetics and Genomics, 253, 189-197.
- KERBACH S, LÖRZ H UND BECKER D (2005) Site-specific recombinatino in *Zea mays*. Theoretical and Applied Genetics, 111 (8), 1608-1616.
- KILBY NJ, DAVIES GJ, SNAITH MR UND MURRAY JAH (1995) FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. THE PLANT JOURNAL, 8 (5), 637-652.
- KNIGHT RL UND ALSTON FH (1968) Sources of field immunity to mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 101, 294-298.
- KONCZ C UND SCHELL J (1986) The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Molecular and General Genetics, 204, 383-396.
- KOUIDER M, HAUPTMANN R, WIDHOLM JM, SKIRVIN RM UND KORBAN SS (1984) Callus formation from *Malus x domestica* cv. 'Jonathan' protoplasts. Plant Cell Reports, 3, 142-145.
- KOVTUN Y, CHIU W-L, TENA G UND SHEEN J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. PNAS, 97 (6), 2940-2945.
- KRENS FA, PELGROM KTB, SCHAART JG, DEN NIJS APM UND ROUWENDAL GJA (2004) Clean vector technology for marker free transgenic fruit crops. Acta Horticulturae, 663, 431-435.
- KÜCK U UND HOFF B (2010) New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 86 (1), 51-62.
- KUIPER HA, KLETER GA, NOTEBORN HPJM UND KOK EJ (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. The Plant Journal, 27 (6), 503-528.
- KUMAR A, TAYLOR MA, ARIF SAM UND DAVIS HV (1996) Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show

-
- altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *The Plant Journal*, 9 (2), 147-158.
- KUMAR S, NEI M, DUDLEY J UND TAMURA K (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9 (4), 299-306.
- LAI F-M, MEI K, MANKIN L UND JONES T (2007) Application of two new selectable marker genes, *dsdA* and *dao1* in Maize transformation. *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*, 5, 141-142.
- LAMBERT C UND TEPFER D (1991) Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create chimeric apple trees through genetic grafting. *Nature Biotechnology*, 9, 80-83.
- LAMBERT C UND TEPFER D (1992) Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theoretical Applied Genetic*, 85, 105-109.
- LEBEDEV VG UND DOLGOV SG (2007) Stability of gus and bar gene expression in transgenic pear clonal rootstock plants during several years. *ISHS Acta horticulturae* 800.
- LEE L-Y UND GELVIN SB (2008) T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*, 146, 325-332.
- LEGRAND V, DALMAYRAC S, LATCHÉ A, PECH J-C, BOUZAYEN M, FALLOT J, TORREGROSA L, BOUQUET A UND ROUSTAN J-P (2003) Constitutive expression of *Vr-ERE* gene in transformed grapevines confers enhanced resistance to eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Plant Science*, 164 (5), 809-814.
- LESEMANN SS UND DUNEMANN F (2006) Neue Erkenntnisse zur Biodiversität des Apfelmehltau-Erregers. *Gesunde Pflanzen*, 58 (2), 117-123.
- LESEMANN SS, SCHIMPKE S, DUNEMANN F UND DEISING HB (2006) Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome *b* gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113 (6), 259-266.
- LI YN (1989) An investigation of the genetic center of *Malus pumila* and *Malus* Miller in the world. *Acta Horticulturae Sinica*, 16, 101-108.

-
- LIN C-Y, ROBERTS JK UND KEY JL (1984) Acquisition of Thermotolerance in Soybean Seedlings. *Plant Physiology*, 74 (1), 152—160.
- LIU A Y-C, LIN Z, CHOI H-S, SORHAGE F UND LI B (1989) Attenuated induction of heat shock gene expression in aging diploid fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 254 (20), 12037-12045.
- LIU Q, SALIH S UND HAMMERSCHLAG F (1998) Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced β -glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Reports*, 18, 32-36.
- LIU Y-G UND WHITTIER RF (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 25 (3), 674-681.
- LIU Y-G, MITSUKAWA N, OOSUMI T UND WHITTIER RF (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal*, 8 (3), 457-463.
- LIU Y-G UND HUANG N (1998) Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by Thermal Asymmetric Interlaced PCR. *Plant Molecular Biology reporter*, 16, 175-181.
- LLOYD AM UND DAVIS RW (1994) Functional expression of the yeast Flp/*FRT* site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Molecular and General Genetics*, 242, 653-657.
- LOAKE GJ, ASHBY AM UND SHAW CH (1988) Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system. *Journal of general microbiology*, 134, 1427-1432.
- LYZNIK, LA, MITCHELL JC, HIRAYAMA L UND HODGES TK (1993) Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucl Acid Res*, 21, 969-975.
- LYZNIK LA, HIRAYAMA L, RAO KV, ABAD A UND HODGES TK (1995) Heat-inducible expression of Flp gene in maize cells. *The Plant Journal*, 8 (2), 177-186.

-
- LYZNIK LA, GORDON-KAMM W, GAO H UND SCHELONGE C (2007) Application of site-specific recombination systems for targeted modification of plant genomes. *Transgenic Plant Journal – Special Feature*, 1 (1), 1-9.
- MACHARDY WE UND GADOURY DM (1989) A revision of Mills's criteria for predicting apple scab infection periods. *Phytopathology*, 79, 304-310.
- MACHARDY WE (1996) *Apple Scab: Biology, Epidemiology, and Management*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- MADDUMAGE R, FUNG RMW, WEIR I, DING H, SIMONS JL UND ALLAN AC (2002) Efficient transient transformation of suspension cultured-derived apple protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70, 77-82.
- MADRID MP, DI PIETRO A UND RONCERO MIG (2003) Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Molecular Microbiology*, 47, 257-266.
- MALNOY M, BOREJSZA-WYSOCKA EE, ABBOTT P, LEWIS S, NORELLI JL, FLAISHMAN MA, GIDONI D UND ALDWINCKLE HS (2007) Genetic transformation of apple without use of selectable marker. *ISHS Acta Horticulturae*, 738, 319-322.
- MALNOY M, BOREJSZA-WYSOCKA EE, NORELLI JL, FLAISHMAN MA, GIDONI D UND ALDWINCKLE HS (2010) Genetic transformation of apple (*Malus x domestica*) without use of a selectable marker gene. *Tree Genetics and Genomes*, 6, 423-433.
- MARTÍN-UDÍROZ M, MADRID MP UND RONCERO MIG (2004) Role of Chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology*, 150, 3175-3187.
- MASGRAU C, ALTABELLA T, FARRÁS R, FLORES D, THOMPSON AJ, BESFORD RT UND TIBURCIO AF (1997) Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal*, 11 (3), 465-473.
- MATTHEW L (2004) RNAi for plant functional genomics. *Comparative and Functional Genomics*, 5, 240-244.
- MCCAFFREY AP, MEUSE L, PHAM T-TT, CONKLIN DS, HANNON GJ UND KAY MA (2002) Gene Expression: RNA interference in adult mice. *Nature*, 418, 38-39.

-
- MCGINNIS K, MURPHY N, CARLSON AR, AKULA A, AKULA C, BASINGER H, CARLSON M, HERMANSON P, KOVACEVIC N, MCGILL MA, SESHADRI V, YOYOKIE J, CONE KAREN, KAEPLER HF, KAEPLER SM UND SPRINGER NM (2007) Assessing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics. *Plant Physiology*, 143 (4), 1441–1451.
- MEISTER G UND TUSCHL T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343-349.
- MEYERING-VOS M; MERZ S, SERTKOL M UND HOFFMANN KH (2006) Functional analysis of the allatostatin-A type gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 492-504.
- MIKI D UND SHIMAMOTO K (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology*, 45 (4), 490-495.
- MILLS WD (1944) Efficient use of sulfur dusts and sprays during rain to control apple scab. *Cornell Ext. Bull.*, 630, 4
- MILUS EA, KRISTENSEN K UND HOVMOLLER MS (2009) Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology*, 99 (1), 89-94.
- MISQUITTA L UND PATERSON BM (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *PNAS*, 96 (4), 1451-1456.
- MIYOSHI M (1895) Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik*, 28, 269-289.
- MÜLLER C, HJORT CM, HANSEN K UND NIELSEN J (2002) Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*, 148, 4025-4033.
- MUNRO CA UND GOW NAR (2001) Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Medical Mycology*, 39 (1), 41-53.

-
- MUBMANN V, SEREK M UND WINKELMANN T (2006) Interaktion von *Agrobacterium tumefaciens* mit der Selektionswirkung von Phosphinothricin. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Supplements, 1, 134-139.
- NAKAYASHIKI H (2005) RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. FEBS Letters, 579 (26), 5950-5957.
- NAKAYASHIKI H UND NGUYEN QB (2008) RNA interference: roles in fungal biology. Current Opinion in Microbiology, 11 (6), 494-502.
- NAKAYASHIKI H, HANADA S, QUOC NB, KADOTANI N, TOSA Y UND MAYAMA S (2005) RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. Fungal Genetics and Biology, 42 (4), 275-283.
- NANDY S UND SRIVASTAVA V (2010) Site-specific gene integration in rice genome mediated by the Flp-*FRT* recombination system. Plant Biotechnology Journal, in press.
- NAVARRE C, SALLETS A, GAUTHY E, MAITREJEAN M, MAGY B, NADER J, DE THOZEE CP, CROUZET J, BATOKO H UND BOUTRY M (2010) Isolation of heat shock-induced *Nicotiana tabacum* transcription promoters and their potential as a tool for plant research and biotechnology. Transgenic Research, DOI 10.1007/s11248-010-9459-5.
- NAYAK T, SZEWCZYK E, OAKLEY CE, OSMANI A, UKIL L, MURRAY SL, HYNES MJ, OSMANI SA UND OAKLEY BR (2006) A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*. Genetics, 172, 1557-1566.
- NEI M, XU P UND GLAZKO G (2001) Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms. PNAS, 98 (5), 2497-2502.
- NORELLI JL UND ALDWINCKLE HS (1993) The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase-transgenic apple tissue. Journal of American Horticultural Science, 118, 311-316.
- NORELLI JL, MILLS JA UND ALDWINCKLE HS (1996) Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. HortScience, 31, 1026-1027.

-
- NORELLI JL, BOREJSZA-WYSOCKA E, MOMOL MT, MILLS JZ, GRETHEL A UND ALDWINCKLE HS (1999) Genetic transformation for fire blight resistance in apple. *ISHS Acta Horticulturae*, 489, 295-296.
- NOWARA D, GAY A, LACOMME C, SHAW J, RIDOUT C, DOUCHKOV D, HENSEL G, KUMLEHN J UND SCHWEIZER P (2010) HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, in press.
- OCHATT SJ UND PATAT-OCHATT EM (1995) Protoplast technology for the breeding of top-fruit trees (*Prunus*, *Pyrus*, *Malus*, *Rubus*) and woody ornamentals. *Euphytica*, 85, 287-294.
- ONOUCHI H, YOKOI K, MACHIDA C, MATSUZAKI H, OSHIMA Y, MASUOKA K, NAKAMURA K UND MACHIDA Y (1991) Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucl. Acids Res.*, 19, 6373-6378.
- PARIS R, COVA V, PAGLIARANI G, TARTARINI S, KOMJANC M UND SANSAVINI S (2009) Expression profiling in *HcrVf2*-transformed apple plants in response to *Venturia inaequalis*. *Tree Genetics and Genomes*, 5 (1), 81-91.
- PARISI L, LESPINASSE Y, GUILLAUMES J UND KRUGER J (1993) A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology*, 83, 533-537.
- PATAT-OCHATT EM, OCHATT SJ UND POWER JB (1988) Plant regeneration from protoplasts of apple rootstocks and scion varieties (*Malus x domestica* Borkh.). *Journal of Plant Physiology*, 133, 460-465.
- PATAT-OCHATT EM, BOCCON-GIBOD J, DURON M UND OCHATT SJ (1993) Organogenesis of stem and leaf protoplasts of a haploid 'Golden Delicious' apple clone (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Cell Reports*, 12, 118-120.
- PEIL A UND HANKE M-V (2005) Apfelzüchtung in Deutschland – Vom Samen zur Sorte. *Forschungsreport 2/2005*, 10-13.
- PELHAM HRB (1982) A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila hsp70* heat-shock gene. *Cell*, 30, 517-528.

-
- PHILLIPS JM UND HAYMAN DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158-161.
- PHIPPS JB, ROBERTSON KR, SMITH PG UND ROHRER JR (1990) A checklist of the subfamily Maloideae (*Rosaceae*). *Canadian Journal of Botany*, 68 (10), 2209-2269.
- PILONE M (2000) D-Amino acid oxidase: new findings. *Cellular and Molecular Life Science*, 57, 1732-1747.
- POLLEGIONI L, LANGKAU B, TISCHER W, GHISLA S UND PILONE MS (1993) Kinetic mechanism of D-amino oxidases from *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (19), 13850-13857.
- PRÄNDL R, HINDERHOFER K, EGGERS-SCHUMACHER G UND SCHÖFFL F (1998) HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Molecular and General Genetics*, 258 (3), 269-278.
- PREALL JB UND SONTHEIMER EJ (2005) RNAi: RISC gets loaded. *Cell*, 123 (4), 543-545.
- PUCHTA H (2003) Marker-free transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74 (2), 123-134.
- PUITE KJ UND SCHAART JG (1996) Genetic modification of the commercial apple cultivars 'Gala', 'Golden Delicious' and 'Elstar' via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. *Plant Science*, 119, 125-133.
- REUVENI M (2000) Efficacy of trifloxystrobin (Flint), a new strobilurin fungicide, in controlling powdery mildews on apple, mango and nectarine, and rust on prune trees. *Crop Protection*, 19 (5), 335-341.
- ROCHESTER DE, WINER JA UND SHAH DM (1986) The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *The EMBO Journal*, 5 (3), 451-458.
- RÖDER FT, SCHMÜLLING T UND GATZ C (1994) Efficiency of the tetracycline-dependent gene expression system: complete suppression and efficient induction of the *rolB* phenotype in transgenic plants. *Molecular and General Genetics*, 243, 32-38.

-
- ROMANO N UND MACINO G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences- Molecular Microbiology, 6 (22), 3343-3353.
- RONCERO C (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. Current Genetics, 41, 367-378.
- ROBBERG D (2007) NEPTUN oder „wie oft wird gespritzt“. Gesunde Pflanzen, 59, 55-65.
- RUIZ-HERRERA J, GONZÁLEZ-PRIETO JM UND RUIZ-MEDRANO R (2002) Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. FEMS Yeast Research, 1, 247-256.
- RUIZ-HERRERA J UND SAN-BLAS G (2003) Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. Current Drug Targets – Infection Disorders, 3 (1), 77-91.
- SAITOU N UND NEI M (1987) The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4 (4), 406-425.
- SALAME TM, ZIV C, HADAR Y UND YARDEN O (2011) RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, 501-512.
- SALOHEIMO M, NIKU-PAAVOLA M-L UND KNOWLES JKC (1991) Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. Journal of General Microbiology, 137, 1537-1544.
- SCHAART JG, KRENS FA, PELGROM KTB, MENDES O UND ROUWENDAL GJA (2004) Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. Plant Biotechnology Journal, 2, 233-240.
- SCHANDER H (1958) Untersuchungen zur Entwicklung von Frühselektionsmethoden für die Apfelzüchtung, II. Der Züchter, 28, 105-132.
- SCHEID OM (2004) Either/or selection markers for plant transformation. Nature Biotechnology, 22, 398-399.
- SCHERMAUL E (2005) Paradiesapfel und Pastorenbirne. Thorbecke Verlag.

-
- SCHMÜLLING T, BEINSBERGER S, DE GREEF J, SCHELL J, VAN ONCKELEEN H, SPENA A (1989) Construction of a heat-inducible chimeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. *FEBS Letter*, 249 (2), 401-406.
- SCHRAMM G, STEGLICH W, ANKE T UND OBERWINKLER F (1978) Antibiotika aus Basidiomyceten, III. Strobilurin A und B, antifungische Stoffwechselprodukte aus *Strobilurus tenacellus*. *Chemische Berichte*, 111 (8), 2779-2784.
- SCORZA R (1991) Gene transfer for the genetic improvement of perennial fruit and nut crops. *HortScience*, 26, 1033-1035.
- SEEMANN JR, BERRY JA UND DOWNTON WJS (1984) Photosynthetic Response and Adaptation to High Temperature in Desert Plants. *Plant Physiology*, 75, 364-368.
- SHAN XY, LI B UND ZHANG JR (2006) Production of marker-free transgenic tobacco plants by Flp/*FRT* recombination system. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22 (5), 744-749.
- SIEROTZKI H, PARISI S, STEINFELD U, TENZER I, POIREY S UND GISI U (2000) Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc₁ enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science*, 56 (10), 833-841.
- SILBEREISEN R, GÖTZ G UND HARTMANN W (1996) Obstsorten Atlas. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 2. Auflage.
- SMITH NA, SINGH SP, WANG MB, STOUTJESKIJK PA, GREEN AG UND WATERHOUSE PM (2000) Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407, 319-320.
- SMITH SE, GIANINAZZI-PEARSON V, KOIDE R UND CAIRNEY JWG (1994) Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil*, 159, 103-113.
- SONG H UND NIEDERWEIS M (2007) Functional expression of the Flp recombinase in *Mycobacterium bovis* BCG. *Gene*, 399, 112-119.
- SORENSEN JG, KRISTENSEN TN UND LOESCHCKE V (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6, 1025-1037.

-
- SORRELL DA UND KOLB AF (2005) Targeted modification of mammalian genomes. *Biotechnology Advances*, 23 (7-8), 431-469.
- SOUTHERN EM (1975) Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98, 503-517.
- SPENA A, HAIN R, ZIERVOGEL U, SAEDLER H UND SCHELL J (1985) Construction of a heat-inducible gene for plants. Demonstration of heat-inducible activity of the *Drosophila hsp70* promoter in plants. *The EMBO Journal*, 4 (11), 2739-2743.
- SPOTTS RA, COVEY RP UND CHEN PM (1981) Effect of low temperature on survival of apple buds infected with the powdery mildew fungus. *HortScience*, 16 (6), 781-783.
- SRIVASTAVA V UND GIDONI D (2010) Site-specific gene integration technologies for crop improvement. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*, 46, 219-232.
- STACE CA (1991) *Plant Taxonomy and biosystematics*. Cambridge University Press.
- STACHEL SE UND ZAMBRYSKI PC (1986) *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell*, 46 (3), 325-333.
- STACHEL SE, TIMMERMAN B UND ZAMBRYSKI P (1986) Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature*, 322, 706-712.
- STEINER JJ, POKLEMB A CJ, FJELLSTROM RG UND ELLIOTT LF (1995) A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research*, 23 (13), 2569-2570.
- SUI G, SOOHOO C, AFFAR EB, GAY F, SHI Y, FORRESTER WC UND SHI Y (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *PNAS*, 99 (8), 5515-5520.
- SWEETMAN JP, CHU C, QU N, GREENLAND AJ, SONNEWALD U UND JEPSON I (2002) Ethanol vapor is an efficient inducer of the alc gene expression system in model and crop plant species. *Plant Physiology*, 129, 943-948.
- SZANKOWSKI I, BRIVIBA K, FLESCHHUT J, SCHÖNHERR J, JACOBSEN H-J UND KIESECKER H (2003) Transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) with the stilbene synthase

- gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Report*, 22 (2), 141-149.
- SZANKOWSKI I, WAIDMANN S, DEGENHARDT J, PATOCCHI A, PARIS R, SILFVERBERG-DILWORTH E, BROGGINI G UND GESSLER C (2009) Highly scab-resistant transgenic apple lines achieved by introgression of *HcrVf2* controlled by different native promoter lengths. *Tree Genetics and Genomes*, 5 (2), 349-358.
- TAKAHASHI T UND KOMEDA Y (1989) Characterization of two genes encoding small heat-shock proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, 219 (3), 365-372.
- TAKESHITA N, YAMASHITA S, OHTA A UND HORIUCHI H (2006) *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Molecular Microbiology*, 59 (5), 1380-1394.
- TARTARINI S, GIANFRANCESCHI L, SANSAVINI S UND GESSLER C (1999) Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding*, 118 (2), 183-186.
- TERAUCHI R UND KAHL G (2000) Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5'-flanking regions of *Pal* and *Pgi* genes from yams (*Dioscorea*). *Molecular and General Genetics*, 263 (3), 554-560.
- THOMPSON AJ UND MYATT SC (1997) Tetracycline-dependent activation of an upstream promoter reveals transcriptional interference between tandem genes within T-DNA in tomato. *Plant Molecular Biology*, 34 (4), 687-692.
- THOMPSON CJ, MOWA NR, TIZARD R, CRAMERI R, DAVIES JE, LAUWEREYS M UND BOTTERMAN J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal*, 6 (9), 2519-2523.
- THOMSEN JG, YAU YY, BLANVILLAIN R, CHINIQUY D, THILMONY R UND OW DW (2009) ParA resolvase catalyzes site-specific excision of DNA from *Arabidopsis* genome. *Transgenic Research*, 18 (2), 237-248.

-
- TIJSTERMAN M, KETTING RF UND PLASTERK RH (2002) The genetics of RNA silencing. *Annual Review of Genetics*, 36, 489–519.
- TIJSTERMAN M UND PLASTERK RHA (2004) Dicers at RISC: The mechanism of RNAi. *Cell*, 117 (1), 1-3.
- TOMILOV AA, TOMILOVA NB, WROBLEWSKI T, MICHELMORE R UND YODER JI (2008) Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *The Plant Journal*, 56, 389-397.
- TRIFONOVA A, DEDICOVA B UND MANKIN L (2009b) D-Amino acid a selectable marker for barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation. United States Patent Application 20090300800.
- TRIFONOVA A, MANKIN L, DEDICOVA B, LINDEMANN B UND ANDERSON F (2009a) Selection system for Wheat. United States Patent Application 20090106856.
- URBANIETZ A UND DUNEMANN F (2005) Isolation, identification and molecular characterization of physiological races of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). *Plant Pathology*, 54 (2), 125-133.
- VAN LAREBEKE N, ENGLER G, HOLSTERS M, VAN DEN ELSACKER S, ZAENEN I, SCHILPEROORT R UND SCHELL J (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252, 169-170.
- VAVILOV NI (1930) Wild progenitors of the fruit trees of Turkestan and the Caucasus and the problem of the origin of fruit trees. *Proc 9th International Horticultural Congress*, 271-286.
- VETTER D, ANDREWS BJ, ROBERTS-BEATTY L UND SADOWSKI PD (1983) Site-specific recombination of yeast 2- μ m DNA *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 80, 7284-7288.
- VIERLING E (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 579-620.
- VOINNET O (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, 17 (8), 449-459.

-
- WALLIN A UND JOHANSSON L (1989) Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *in vitro* cultured shoots of a columnar apple. *Journal of Plant Physiology*, 135, 565-570.
- WALLY O, JAYARAJ J UND PUNJA Z (2008) Comparative resistance to foliar fungal pathogens in transgenic carrot plants expressing genes encoding for chitinase, β -1,3-glucanase and peroxidase. *European Journal of Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10658-008-9370-6.
- WANG K, STACHEL SE, TIMMERMANN B, VAN MONTAGU M UND ZAMBRYSKI PC (1987) Site-specific nick in the T-DNA border sequence as a result of *Agrobacterium vir* gene expression. *Science*, 235 (4788), 587-591.
- WANG W, VINOCUR B, SHOSEYOV O UND ALTMAN A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9 (5), 244-252.
- WANG Y, YAU Y-Y, PERKINS-BALDING D UND THOMSON JG (2010) Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant Cell Report*, 30 (3), 267-285.
- WARD ER UND BARNES WM (1988) VirD2 Protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science*, 242 (4880), 927-930.
- WARD ER, RYALS JA UND MIFLIN BJ (1993) Chemical regulation of transgene expression in plants. *Plant Molecular Biology*, 22, 361-366.
- WARING RB, MAY GS UND MORRIS NR (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene*, 79, 119-130.
- WATERHOUSE PM, GRAHAM MW UND WANG MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *PNAS*, 95, 13959-13964.
- WATERHOUSE PM UND HELLIWELL CA (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Natur Reviews Genetics*, 4, 29-38.

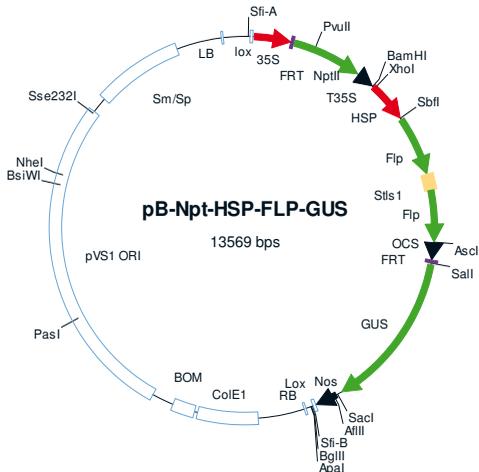
-
- WATSON B, CURRIER TC, GORDON MP, CHILTON MD UND NESTER EW (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 123 (1), 255-264.
- WEBER I, ABMANN D, THINES E UND STEINBERG G (2006) Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 18, 225-242.
- WELANDER M, PAWLICKI N, HOLEFORS A UND WILSON F (1998) Genetic transformation of the apple rootstock M26 with the Ro/B gene and its influence on rooting. *Journal of Plant Physiology*, 153 (3-4), 371-380.
- WERNER S, STEINER U, BECHER R, KORTEKAMP A, ZYPRIAN E UND DEISING HB (2002) Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS Microbiology Letters*, 208 (2), 169-173.
- WERNER S, SUGUI JA, STEINBERG G UND DEISING HB (2007) A Chitin Synthase with a Myosin-Like Motor Domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (12), 1555-1567.
- WESLEY SV, HELLIWELL CA, SMITH NA, WANG M, ROUSE DT, LIU Q, GOODING PS, SINGH SP, ROBINSON SP, GLEAVE AP, GREEN AG UND WATERHOUSE PM (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27 (6), 581-590.
- WESSELS JH (1993) Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytology – Transley review no. 45*, 123, 397-413.
- WESTWOOD JH, RONEY JK, KHATIBI PA UND STROMBERG VK (2009) RNA translocations between parasitic plants and their hosts. *Pest Management Science*, 65 (5), 533-539.
- WILDE RJ, SHUFFLEBOTTOM D, COOKE S, JASINSKA I, MERRYWESTHER A, BERI R, BRAMMAR WJ, BEVAN M UND SCHUCH W (1992) Control of gene expression in tobacco cells using a bacterial operator-repressor system. *The EMBO Journal*, 11, 1251-1259.

-
- WILLIAMS EB UND KUC J (1969) Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. Annual Reviews of Phytopathology, 7, 223-246.
- WOHLLEBEN W, ARNOLD W, BROER I, HILLEMANN D, STRAUCH E UND PUHLER A (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene, 70, 25-37.
- WOO H-J, CHO H-S, LIM S-H, SHIN K-S, LEE S-M, LEE K-J, KIM D-H UND CHO Y-G (2009) Auto-excision of selectable marker genes from transgenic tobacco via stress inducible Flp/*FRT* site-specific recombination system. Transgenic Research, 18, 455-465.
- WOOLF AB UND FERGUSON IB (2000) Postharvest responses to high fruit temperatures in the field. Postharvest Biology and Technology, 21, 7-20.
- XU X-M (1999) Modelling and forecasting epidemics of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). Plant Pathology, 48 (4), 462-471.
- YEPES LM UND ALDWINKLE HS (1994) Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 37, 257-269.
- YIN C, JURGENSON J UND HULBERT S (2011) Development of a Host-induced RNAi system in the Wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis f. sp. tritici*. Molecular Plant-Microbe Interactions, accepted for publication.
- YOO B-C, KRAGLER F, VARKONYI-GASIC E, HAYWOOD V, ARCHER-EVANS S, LEE YM, LOUGH TJ UND LUCAS WJ (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. The Plant Cell, 16, 1979-2000.
- YOSHIDA K, KASAI T, GARCIA MRC, SAWADA S, SHOJI T, SHIMIZU S, YAMAZAKI K, KOMEDA Y UND SHINMYO A (1995) Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the HSP18.2 promotor of *Arabidopsis thaliana*. Applied Microbiology Biotechnology, 44, 466-472.

-
- ZAMORE PD, TUSCHL T, SHARP PA UND BARTEL DP (2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101 (1), 25-33.
- ZEYEN RJ, CARVER TLW UND LYNGKJAER MF (2002) Epidermal cell papillae. The powdery mildews: a comprehensive treatise, 107-125.
- ZHANG ZIGUO, HALL A, PERFECT E UND GURR SJ (2000) Differential expression of two *Blumeria graminis* chitin synthase genes. *Molecular Plant Pathology*, 1 (2), 125-138.
- ZHOU Z (1999) The apple genetic resources in China: The wild species and their distributions, informative characteristics and utilization. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46, 599-609.
- ZHU Y UND BARRITT BH (2008) Md-ACS1 and Md-ACO1 genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. *Tree Genetics and Genomes*, 4 (3), 555-562.
- ZHU YJ, AGBAYANI R, MCCAFFERTY H, ALBERT HH UND MOORE PH (2005) Effective selection of transgenic papaya plants with the PMI/Man selection system. *Plant Cell Report*, 24, 426-432.

9 Anhang

9.1 Der transformierte Monitoringvektor zur Erzeugung von *nptII*-freien Apfelsprossen



Anfang	Ende	Bezeichnung	Beschreibung
58	91	lox	LoxP511
107	527	35S	Promotor-Region
528	561	FRT	Erkennungssequenz
573	1376	NptII	Kanamycin-Resistenz
1389	1590	T35S	Terminator 35S
1610	2075	HSP	Hitzestress-induzierbarer Promoter
2097	2779	Flp	Rekombinase
2777	2777	mut	Label
2780	2968	Stls1	Intron
2969	3556	Flp	Rekombinase
3564	3759	OCS	Terminator
3762	3795	FRT	Erkennungssequenz
3815	5626	GUS	Reportergen
5697	5950	Nos	Terminator
5957	5990	Lox	LoxP511
6075	6098	RB	Rechte Border
6633	7330	ColE1	ColE1 ORI
7367	7626	BOM	Bom site
7879	11584	pVS1 ORI	pVS1 ORI
11768	12778	Sm/Sp	Strep/Spec Resistenz
13299	13322	LB	Linke Border

Abbildung A.1 Vektorkarte des Monitoringvektors. Diese Kasette wurde zur Etablierung des Flp-Rekombinationsystems an Apfel erstellt. Jedes Rekombinationsereignis kann mit Hilfe des *gusA*-Reportergens und einem histologischen Gus-Test nachgewiesen werden.

9.2 Verwendete Puffer, Medien und Chemikalien

Anilinblau

- 12 % (v/v) Phenol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 30 % (w/v) Glycerin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 30 % (v/v) Milchsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ddH₂O

BAP-Stammlösung

- 0,2 g l⁻¹ BAP (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) in 1 N Natriumhydroxid

Bewurzelungsmedium nach Murashige & Skoog

- 2,3 g l⁻¹ MS- Fertignährboden M0222 (Duchefa Biochemica, Hamburg)
- 20 g l⁻¹ Saccharose
- 15 ml l⁻¹ IBA-Stammlösung¹
- 8,0 g l⁻¹ Agar (Difco, Heidelberg)
- pH 5,8

¹Zugabe zur Induktion der Wurzelbildung

Co-Medium

- LSG-Medium
- 1 M Betainhydrochlorid (Duchefa Biochemica, Hamburg)
- 100 mM Acetosyringon (Duchefa Biochemica, Hamburg)

DNA-Ladepuffer 6X

- mM Tris-HCl (pH 7,6)
- 0,03 % (w/v) Bromphenolblau (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 0,03 % (w/v) Xylene Cyanol FF (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 60 % (v/v) Glycerol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 60 mM EDTA (Sigma)

Ethidiumbromid

- 10 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Farbpuffer 20X

- 6,0 mM Tatrazingelb (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 3,5 mM Kresolrot (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 30 % (w/v) Saccharose (Merck KGaA, Darmstadt)

Gus-Puffer

- 5,0 ml 1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0)
- 200 µl 0,5M EDTA (Sigma)
- 200 µl Triton X 100 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 250 µl 20 % (w/v) SDS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 666 µl 5 % (w/v) N-Lauroyl-Sarcosine (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 200 µl 0,5 M Kaliumferricyanid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 94,4 ml ddH₂O
- 1,0 ml X-Gluc-Stammlösung*

*immer frisch herstellen

IBA-Stammlösung

- 0,2 g l⁻¹ IBA (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) in 1 N NaOH

LB Medium

- 10,0 g l⁻¹ Natriumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt)
- 10,0 g l⁻¹ BactoTM-Trypton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 5,0 g l⁻¹ BactoTM-Hefe-Extrakt (BD)
- 20,0 g l⁻¹ Agar (Difco, Heidelberg)
- pH 7,2

LSG-Medium

- 4,4 g l⁻¹ LS-Fertignährboden L0230 (Duchefa Biochemica, Hamburg)
- 30,0 g l⁻¹ Saccharose

- 1,5 ml l⁻¹ IBA-Stammlösung
- 2,0 ml l⁻¹ TDZ-Stammlösung
- 3,0 g l⁻¹ Gelrite (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- pH 5,8

Maleinsäurepuffer

- 0,1 M Maleinsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 0,15 M Natriumchlorid
- pH 7,5

MSO-Medium

- 2,15 g l⁻¹ MS- Fertignährboden M0221 (Duchefa Biochemica, Hamburg)
- pH 5,8

NaP-Puffer (1 M)

- 1 M Na₂HPO₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
- 1 M NaH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
- pH 7,0

Neutralisationspuffer

- 1 M TRIS-HCl
- 1,5 M Natriumchlorid
- pH 7,5

Selektionsmedium

- LSG-Medium
- 100 mg l⁻¹ Kanamycin (Duchefa Biochemica, Hamburg)
- 500 mg l⁻¹ Cefotaxim (Duchefa Biochemica, Hamburg)
- 500 mg l⁻¹ Timitim (Duchefa Biochemica, Hamburg)

SIM-Medium

- 5,88 g l⁻¹ Natriumcitrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- 20 g l⁻¹ Saccharose

- 1 M Betainhydrochlorid (Serva Feinbiochemica, Heidelberg)
- 100 mM Acetosyringon (Serva Feinbiochemica, Heidelberg)

50X TAE-Puffer

- 40 mM Tris Acetat (Sigma)
- 0,5 M EDTA (Sigma)
- pH 8,0

TDZ-Stammlösung

- TE-Puffer
- 1 M Tris (Sigma)
- 0,5 M EDTA (Sigma)

Vermehrungsmedium M8 nach Murashige & Skoog

- 4,4 g l⁻¹ MS- Fertignährboden M0222 (Duchefa Biochemica, Hamburg)
- 30 g l⁻¹ Sorbitol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- 5,0 ml l⁻¹ BAP-Stammlösung
- 5,0 ml l⁻¹ IBA-Stammlösung
- 8,0 g l⁻¹ Agar (Difco, Heidelberg)
- pH 5,8

X-Gluc-Stammlösung

- 50 µg µl⁻¹ X-Gluc (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- in DMSO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) lösen

9.3 Verwendete Primer

Tabelle A.1 Verwendete Primer. Die im Folgenden aufgeführten Primer wurden für die Durchführung von PCR-Reaktionen, zur Genisolierung oder Herstellung von Hybridisierungs sonden eingesetzt. Dargestellt sind die Primerbezeichnung- und Richtung, Primer-Sequenz sowie die Schmelztemperatur T_m (Ermittelt mit <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

Primer	Richtung	Sequence 5'→3'	T_m [°C]*
35S	F	CCCACTATCCTTCGCAAGACCC	63,8
AD1	-	(AGCT)TCGA(GC)T(AT)T(GC)G(AT)GTT	41,5
AD2.1	-	(AGCT)GACGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)GAA	46,2
AD2.2	-	(AGCT)GACGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)GTT	46,2
AD2.3	-	(AGCT)GACGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)GAC	48,6
AD2.4	-	(AGCT)GACGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)CAA	46,2
AD2.5	-	(AGCT)GACGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)GTT	46,2
EF1a	F	ATTGTGGTCATGGYCA YGT	55,3
	R	CCAATCTTGTAVACATCCTG	54,6
flp	1F	CTTGTTCGTCA GTTTGTGGAAA	56,5
	1R	TCTTCCGATGATT CGAACTGTA	56,5
gusA	F	GTTCTGCGACGCTCACACCGATACC	68,7
	R	TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG	64,9
nptII	F	ACAAGATGGATTGCACGCAGG	59,2
	F1	AGAGGCTATTCGGCTATG	51,8
	R	AACTCGTCAAGAAGGCGATAG	57,5
	R1	AAGGTGAGATGACAGGAG	51,8
PIITS	F	ATCATTACTGAGCGTGAGGCCA	60,1
	R	AGAGGATGTTCTGACGCTCGAA	60,1
S10T1	1F	AATGTTGCGAATTGGTGGTGC	58,1
	1R	CCACTCTCAATTCAAGACG	53,0
	2F	TGCATTTCGAGTCCATGGGAG	60,1
	2R	TACATCTTCAGACACACGC	56,4
	3F	TTGCTAGGTTGTAGTGTACGCG	60,1
	3R	CGCACCCGATACCATGAAGATT	60,1
S10T2	1F	CTGCATCAAGGGTCAAACCTG	56,4
	1R	CTTGCAATCTATCCCTCTG	56,4
	2F	TAGATCGGAACCGAAAAGAG	56,4
	2R	GAGGTGTTGATATTCCCATCCTG	60,9
	3F	AAACAGGTTACGACCGAGT	56,4
	3R	ATTCTCAGGAACAGCCCTTCTG	60,1
S10T3	1F	GGATCAACGGCGTAGGAATGTA	60,1
	2F	AGGTCAGTAGCCAGATGAAG	56,4
	3F	AACGTTTGC GACTGCCTGAGA	59,2
S10T4	1F	GTCAAACGGGCCATTCTATCGT	60,1
	2F	ATACTGGGCATTCGCATAGGCT	60,1
	3F	GTAAAACAGCAGTGGGCTCT	56,4
ViChsV	F	TACTACCTCATGGCTGGCACAA	60,1
	R	GAAATCGTCCGTGACCAGAAG	60,1
ViRACE	1F	ATCTACGGTCTCCAAGCCATCA	60,1
	1R	TGGATTGCCTAGATACCGCCAT	60,1
	2F	TCGGTGAAAACCCGCTTTATCGT	60,1
	2R	TCGGTGAAAACCCGCTTTATCGT	60,1
virG	F	GCCGGGGCGAGACCATAGG	64,1
	R	CGCACGCGCAAGGCAACC	60,9

9.4 Sonstige Daten

9.4.1 Sequenztraces (Exemplarisch).



Abbildung A.2 Sequenztrace zur Überprüfung der Sequenzqualität. Ein solches Sequenztrace wurde bei jeder Sequenzierung mitgeschickt. Damit konnte die Qualität der erhaltenen Sequenz überprüft und Ungenauigkeiten ggf. korrigiert werden.

9.4.2 Chitinsynthese-Datenbank

Tabelle A.2 Zusammenstellung der Referenzsequenzen in der Chitinsynthese-Datenbank.

Diese Sequenzen wurden für die Verrechnung eigener Sequenzdaten im Alignment verwendet.

NCBI Nummer	Organismus	Chs-Klasse
AAF05595	<i>Blumeria graminis</i>	N/A
AAM14606	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	3
AAB71411	<i>Magnaporthe oryzae</i>	4
AAF19527	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	4
AAR88368	<i>Coccidioides immitis</i>	5
AAF04279	<i>Blumeria graminis</i>	N/A
BAA74449	<i>Magnaporthe oryzae</i>	CsmI
AAO49384	<i>Fusarium oxysporum</i>	5
AAL23719	<i>Colletrichum graminicola</i>	ChsC
Q4P9K9	<i>Ustilago maydis</i>	8
AAB84285	<i>Ustilago maydis</i>	5
AAL55424	<i>Glomerella graminicola</i>	5
AAQ10290	<i>Coccidioides immitis</i>	5
BAE78841	<i>Emericella nidulans</i>	N/A
AAB60781	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6
ACH58563	<i>Magnaporthe oryzae</i>	7

9.4.3 Sequenzanalyse der isolierten *Chs*-Genfragmente

Die Standard-PCR mit den degenerierten Primern (WERNER *et al.* 2007) und genomischer DNA aus dem Apfelschorf-Erreger *Venturia inaequalis* offenbarte ein PCR-Fragment. Die Sequenzanalyse ergab, dass das Fragment S10 eine sehr hohe Ähnlichkeit zu Chitinsynthase Klasse V-Genen anderer Ascomyceten zeigte. Exemplarisch ist hier nun der Sequenzvergleich der putativen Proteinsequenz (S10) mit einer in der NCBI-GenBank hinterlegten *ChsV*-Sequenz aus *Neotyphodium lolii* (NCBI: ABF20219) dargestellt. Auch aus der hochamplifizierten genomischen DNA des Apfelmehltau-Erregers *Podosphaera leucotricha* wurden bei der Standard-PCR mit degenerierten Primern Fragmente amplifiziert. Insgesamt wurden drei putative *ChsV*-Genfragmente isoliert: Mil7, Mil23 und Mil30. Die Genfragmente wurden alle drei sequenziert und mit der BlastX-Funktion innerhalb der NCBI-Datenbank auf homologe Proteinsequenzen hin überprüft. Aufgeführt ist die höchste Übereinstimmung einer jeden Sequenz.

9.4.3.1 BlastX von PCR-Produkt S10

Höchste Übereinstimmung mit Chitinsynthase NCBI: ABF20219

		+PGNRGKRDSQMI LMRFLNRVHYNLAM+P+ELEM+HQIRNI IGVNPTFYEF FQIDADTV	
S10	660	KPGNRGKRDSQMI LMRFLNRVHYNLAMTPMELEMHHQIRNI IGVNPTFYEF CFQIDADTV	481
ABF20219	1348	RPGNRGKRDSQMI LMRFLNRVHYNLAMSPLELEMYHQIRNI IGVNPTFYEF MFQIDADTV	1407
		VAPDSATRMVSFAF+DDTRLI VCGETALTNAK+S +TM+QVYEYYISHNL KAFESLFGS	
S10	480	VAPDSATRMVSFAFVDDTRLIGVCGETALTNAKSMVTMMQVYEYYISHNLKAFESLFGS	301
ABF20219	1408	VAPDSATRMVSFAF IDDTRLI AVCGETALTNAKSSFITMIQVYEYYISHNLAKAFESLFGS	1467
		VTCLPGCFSMYRIRAAETGKPLFVS+EVV+AYS IRVDTLHMKNLLHLGEDRYLTTLLLK	
S10	300	VTCLPGCFSMYRIRAAETGKPLFVSKEVVEAYSEIRVDTLHMKNLLHLGEDRYLTTLLLK	121
ABF20219	1468	VTCLPGCFSMYRIRAAETGKPLFVSREVVDAYSTIRVDTLHMKNLLHLGEDRYLTTLLLK	1527
		+HS++KTKY+F AHAWTIAPD+ K+FLSQRRRWINSTVHN	
S10	120	FHSQFKTKYIFRAHAWTIAPDTMKIFLSQRRRWINSTVHN 1	
ABF20219	1528	YHSKYKTKYLFNAHAWTIAPDSWKVFLSQRRRWINSTVHN 1567	

9.4.3.2 BlastX von PCR-Produkt Mil7

Höchste Übereinstimmung mit Chitinsynthase NCBI: O12394

		KPGNRGKRDSQV+LMAFMQKVMFDERMTAFE++FFNS+WRVTGVS PDNIEIVL VDADTK	
Mil7	732	KPGNRGKRDSQV LMAFMQKVMFDERMTAF EFDFFNLSLWRVTGVS PDNIEIVL MVDADTK	553
O13394	803	KPGNRGKRDSQV LMAFMQKVMFDERMTAF EYEFFNISLWRVTGVS PDNIEIVL CVDADTK	862
		VFPDLSLRMV+CMVED EIMGLCGETKIANK+ETVWTMIQ	
Mil7	552	VFPDLSLRMVSCMVEDTEIMGLCGETKIANKTETVWTMIQ GESHCI CVRIEQYI*HLFSA	373
O13394	863	VFPDLSLRMVACMVEDPEIMGLCGETKIANKSETVWTMIQ-----	902

		VFEYYISHH TKAFEACFGGVTCLPGCFSAYRIKAPKG +GYWVPILANPDIVEHYSENV	
Mil17	372	VFEYYISHHSTKAFEACFGGVTCLPGCFSAYRIKAPKGGNGYWVPILANPDIVEHYSENV	193
013394	903	VFEYYISHHQTKAFEACFGGVTCLPGCFSAYRIKAPKGPBGYWVPILANPDIVEHYSENV	962
		VDTLHKKNLLLLGEDRYLTTLMKTFPKRKMFMVFPQAVCKTIVPDTFR+LLSQRRRWINS	
Mil17	192	VDTLHKKNLLLLGEDRYLTTLMKTFPKRKMFMVFPQAVCKTIVPDTFRVLLSQRRRWINS	13
013394	963	VDTLHKKNLLLLGEDRYLTTLMKTFPKRKMFMVFPQAVCKTIVPDTFRILLSQRRRWINS	1022
		TVHN	
Mil17	12	TVHN 1	
013394	1023	TVHN 1026	

9.4.3.3 BlastX von PCR-Produkt Mil23

Höchste Übereinstimmung mit Chitinsynthase NCBI: EAK84434

		+PGNRGKRDSQL+LMRFLNKVHFGLPMPN+ELE+YHQIKNVIGVNP SFYEY+LQVDADT	
Mil123	723	KPGNRGKRDSQLIMRFLNKVHFGLPMPNLELEMYHQIKNVIGVNP SFYEYVLQVDADTT	544
EAK84434	1381	RPGNRGKRDSQLVLMRFLNKVHFGLPMPNMELEIYHQIKNVIGVNP SFYEYILQVDADTE	1440
		V+A SLNRF+SAF DKK+IG+CGET+LSNAK SIITMLQVYEYYISHYLAKAFESLFGS	
Mil123	543	VDAFSLNRFVSAFTNDKKIIGMCGETSLSNAKSIITMLQVYEYYISHYLAKAFESLFGS	364
EAK84434	1441	VEAMSLNRFISAFTRDKKVIIGLGETALSNAKASIITMLQVYEYYISHYLAKAFESLFGS	1500
		VTCLPGCFSMFR+R TPDTHRPLFIA+ +V++Y+ENRVDT	
Mil123	363	VTCLPGCFSMFRVR*VSI*PCVR*CLSADLVCSNSTPDTHRPLFIATSVVDEYSENRVDT	184
EAK84434	1501	VTCLPGCFSMFRIR-----TPDTHRPLFIASQIVEDYAENRVDT	1539
		LHTKNLLHLGEDRYLTTVLKHFYG YKT+FVRD KA T AP+DW VLLSQRRRWINSTVH	
Mil123	183	LHTKNLLHLGEDRYLTTVLKHFGNKYTFVVRDAKAQTAPEDWGVLLSQRRRWINSTVH	4
EAK84434	1540	LHTKNLLHLGEDRYLTTVLKHFYGKYTFVVRDCAWTVAPDDWKVLLSQRRRWINSTVH	1599
		N	
Mil123	3	N 1	
EAK84434	1600	N 1600	

9.4.3.4 BlastX von PCR-Produkt Mil30

Höchste Übereinstimmung mit Chitinsynthase NCBI: EAU38076

		+PGNRGKRDSQM+LMRFLNRIHYNLPMSPMELEMHHQIRNIIGVNP TFYE+ILQVDADT+	
Mil130	1	KPGNRGKRDSQMILMRFLNRIHYNLPMSPMELEMHHQIRNIIGVNP TFYEYILQVDADTM	180
EAU38076	1325	RPGNRGKRDSQMVLMRFLNRIHYNLPMSPMELEMHHQIRNIIGVNP TFYEFILQVDADTV	1384
		VAPD+ATR VS+FLSDTRLIGVCGETAL+NAKTS VTMIQVYEYYISHNLKAFESLFS	
Mil130	181	VAPDSATRFVSAFLSDTRLIGVCGETALSNAKTSVMVTMIQVYEYYISHNLKAFESLFS	360
EAU38076	1385	VAPDAATRMVSSFLSDTRLIGVCGETALNAKTSAVTMIQVYEYYISHNLKAFESLFS	1444
		+	
Mil130	361	L 363	
EAU38076	1445	V 1445	

9.4.4 Genomische Sequenz des putativen *ChsV*-Gens aus *V. inaequalis*

Promotorregion Nukleotid 354 bis 405

Intron Nukleotid 4230 bis 4262

ViChsV.0001...AGACGAGTGATATCAATCCCATTTCCTCCGGCGTGGACAGCGACCCCTTCTCCTACTTGGC
ViChsV.0061...CAGGAGCGCCAAA**CAATGTC**TCTCAACTGCACAAGATGACCTCTCTGGCGCTGCCAGAGCAT
ViChsV.0121...CTACAGTCAGACAGGACTCGGAACACATTTAGCTGCAGATTTCCATGCCCATCTACCA
ViChsV.0181...ACTGCTCGTTAAGCTFCGACGCCACAATAGCAATAAACAGATTGATCATCTCAGCGAGA
ViChsV.0241...GGTCCCAATGGCGACGAGACGGGAAGTGCAATGGCTTCTATGAAGGATGTTGCATCGAGA
ViChsV.0301...TTGTGGCAAGACTTGGCTACAGAAATGAGAACCAGGCCGTGATATTCTGTGGA**GTAATC**
ViChsV.0361...**AAGATATGGGAGAACGGGAGGTGCAGAATGAACACTAACCACTC**GCAAAATACAGAGGAGA
ViChsV.0421...GTCCGGTGTGGTAAGACGACACTCAGATCACATTTACTCTCGAACTT**ATG**GACTTGC
ViChsV.0481...GGGCACACCACCTTCCAACAGACTCTCGAACCGAGCCCTCATTTTCGATTCCCTCAGCAAC
ViChsV.0541...CACAAAGACGGCTACGACACATACAGCCTCGAGAGCGGGCTTGTCTACGAGCTTCAGTA
ViChsV.0601...TGAACATTCTGCTCGACGAATCCCCTTTGATTTGGTGGCAAACCTGCTAGATACCCGTCT
ViChsV.0661...CGAGCGGCAGAGAAATCAACTGTCCCATCGGCGAACCGCACTCCACGTTTTATACTA
ViChsV.0721...CCTCATGGCTGGCACAGTGAGAAAAGAGAAGAGCTCATCTTGGTCTGGATTACCCAGGATT
ViChsV.0781...TCTCTCAGATCACAAAGCATCTTTCAGGGGCAAGAGATGGCGGTATCTAGGCAATCCAAA
ViChsV.0841...GATGCTCAACATTTGGATCGACGATAAAGCGGGTTTCACCGATTTCAGGAAAGCTTTGCA
ViChsV.0901...GAAGTCCAGTTCTCCAACCAGAGATCGGCGAGATTTGGCAGGTCTTGGCCGCTGTCT
ViChsV.0961...CCATATGGGCCAATTCGAGTTTCATACCACCTTGGGACACCGCCAGCTGCTGATGATAG
ViChsV.1021...TGCCGATATTCTCATGAAGGAGGCGAGAACAATAACCAGATCAGCAATCCGGATCACT
ViChsV.1081...CGGAGTAATCGCTGCCTTCTTGGGCGTGTCCGCAATGATTTGGAACAGTGCCTGGGCTA
ViChsV.1141...CAAGACGAAGAACTGCACAATGAGCGTGTGACTGTCTGCTGACCTGAAGGAGCTCG
ViChsV.1201...ACAGAATGCAGATGAAATGGCCCGACCTTGTACTCTTTACTCGTGGCCCTGGGTCGTGGA
ViChsV.1261...GTCCATGAATTTCTCAATCAGTGTGCCCGAAGAACTTCTTACCGCAACAATCTCCATTTGT
ViChsV.1321...AGACTTCCCCGGATTTGCTGTTTCAGCCATCTCCGATGATGTTCTGGATCAACTTCTGAA
ViChsV.1381...CAACGCTGTACCGAGGCGCTGTATCATGTCTGCTGCAAAACTTCTTCGAGCGACAAGT
ViChsV.1441...GGACATGCTTGACACCGAAGAGGTGGTCATTTCTGTACGAGCTATTTGCACAATTCGGA
ViChsV.1501...TGGCGTCAAGAGGCTGCTCAAGTCTGGAAATGGTGTGCTGGCAATCCCTGGACGGCAGAC
ViChsV.1561...CAGAAAAGGAAAGACGGATCATCAGTTCCTAGAGACGCTCAAGAGGCGATTGAAAACAA
ViChsV.1621...AAATCCTTCAATCGTGGTTGGCAGCACCCTACAGTCAATGCCAGGAAGCAATTTTGCTAC
ViChsV.1681...TCGTAACGCTCGCCCTCGTTCTCTATCAAGCACTTTGCTGGAGAGGTCGATTACCCAT
ViChsV.1741...TGAAGTCTTACTGGAAGCCAACGCTGAGTCAATTTCTGGAGATGTGATGAACATGATGG
ViChsV.1801...CTCAACTCAAAACGATTTCTATCGGAGAACTTTTCGCTCAAGAAGCTCTAAGCAAAGTCCA
ViChsV.1861...CCACCCAAAGAGCCCACTGCTGTTTTACAGGACGCTGTGGCCCTCAAAGCCTATGCGAAT
ViChsV.1921...GCCAGTATGGCTAAGAAAAGTACGATAGAATGGCCCGTTGACGGCAGAGAGACCAGC
ViChsV.1981...TCGCGATGCCGGCAGCATGAGTGACGATGGCAAGAGTAGCATTTCGGAGGACGTACC
ViChsV.2041...TAAAGATGTAGGAGCTCAAGCAGGAATTGCTCGCAATTTCTTACGGCCATGCAAAATGT
ViChsV.2101...GACCAAAGCCCTTGGCGCGCCGAACACAACTCGCACTACATCTTTGTCTCAAATCCAA
ViChsV.2161...CGACCGACGAATTCGCAATTCCTTCGACAGCAATGTATTTCGACAACAGATTCAAACATT
ViChsV.2221...TGGCATAGTCAGATCAGCCAACGCCTCCGCAATGCGCACTCAGCGTCTTCATGCCCTT
ViChsV.2281...TGACGATTTCAACACGTCAGCTGAGGAGATGCTATTTTACTTGGCAGCCCAAGGAGAA
ViChsV.2341...GGCCGAGAATATTTGGACGAGCGAGGGTGGCGAGGCAACGAAGCTCAGGCCGTTGCAAC
ViChsV.2401...TGGCGTGTCTTATGAGGCGATGTTGGTTGGACATTGCGAGCGTGGCAACTCGCGCTGT
ViChsV.2461...TCTGCTGGAGGCAAACGTTTCTGAGAAGCGGAGAACGACAGTGGCCACCCTTACGCGC
ViChsV.2521...CGGCACGCCTGGCTTCAGTATTCCCGTGTACGCTCTGCTGAACCTCAGACACCTTCCCC
ViChsV.2581...TGGCGGATTTACAGCGGATGACAAAACCGGTAGTATTTTGGCGGCTGATGTTGATGC
ViChsV.2641...CAAGTCCGATGCGGGTGTATCTGCTATTAATGGAGGAGACATGTTCCGCAATTTTCGAGAC
ViChsV.2701...TCGGGAGCACATGGCCGAGAAAGGCAACGAGGCCAAATGGAGACTGTTGAAGAGCACCC
ViChsV.2761...AGTCTCAGGCAGTCGCAAAACGTTGGATGTTCTTCACTCGGCTACTGACCTTTTACATCTC
ViChsV.2821...TACGCGATTGATCCGTTTGGCGGAGGCTGGAAGGAGGACATCTTCCGCAAGTGTGAAGACCGC
ViChsV.2881...GTGGCGAGAAAAGCTTGGCATCAATATTCTCATCTGGCTTAGTTGGCTTTTCGTCATCTT
ViChsV.2941...CTTCATGAGTAGTACCAATTCCTCGAAAATACAGAGCAGCACTAACAGTATCAGTTGG
ViChsV.3001...TTTCCAGAGTGTGATTTGCCCTAAACAGGATGTATTTTCGCCCGCAGAAATTCAGCTCGTA
ViChsV.3061...TAATAACAAAGGCAAAAGCGGTGCCTACGTGCTCATCCGTTGGTGGTTTACGACCTGAA
ViChsV.3121...AGCCTTTCCGGCCGCTCACTACCCGAACATCATCTCGCAAGTCTCTCTCAAGTACTC
ViChsV.3181...CGGTCTTGATGCTACTACTCTGTTCCTGTCCAAGTCTCGGCGCTATGTGCAGGAAAGGA

ViChsV.3241...CGGCTCTATTGACCCCGGGTTCACACTGGACTATTCCAGCACGAATTACACTGGAACCAC
ViChsV.3301...CACCTCCACATCTACCTTAGATGTGAACGCCAGATACCATGACTTCCGGTGGTTCACAAA
ViChsV.3361...CGATTACGACCAGACTGTGGTGTGAGCAGCAGTATATGCTGAAGCACAACACTACCTGA
ViChsV.3421...AAAGGTCCGGTCCGGTTACACCCCTACATATGTGCATACATCTGGTACAACCAAGCAGAAA
ViChsV.3481...TCCATTGGAATAATACACAGCAAGATTTACGACATGACATCATACTCGTTGGGGGACGA
ViChsV.3541...ACCCCCGATATCCCGTGGAAAGCAACAGATCTGACCAAGCACACCTGATTCACACTTC
ViChsV.3601...ATGGATGACTCGGTCTGTGAACCTGTTTCAAACCTTTTCCGGTTCGGATCTATCCAAGTTA
ViChsV.3661...TGGGACAGTTTGACCCTTGATGCAGGAATGAAAGACCCGGATGCTAACCTGCCTCAACAAT
ViChsV.3721...TTGTTCTATGTGGAGATGTGGATACGGCGAACTCAACCCAATGTCTATTCCGCAAGTAT
ViChsV.3781...CTCCTGTTGCCATCACGATTCTGTTGGTCAGTGTCAATTGGATTCAAGTTTCTAGCCGCG
ViChsV.3841...CTGCAATTCCGCAAAAAAAGCTGTCCCGGAGAACCTCGACAAAATTTGTCATGTGTATT
ViChsV.3901...CTGCATATACCGAGGACGAAGATTCTCTGCGACGTGCGATGGACTCTATTGCCCGCATG
ViChsV.3961...CGTTACGATGATAAAAAGAAAAGCTGATGGTGGTCACTCTGTGACGGAATGATCGTAGGACAG
ViChsV.4021...GGCAATGACCGTCCAACACCTCGCATCTGCTTTGACATCTTGGGAGTTCGAGAATCGATG
ViChsV.4081...AACTCAGAAGCTCTCAGCTTTGAGAGTTGGGGGAAGGCATGAAGCAACACAATATGGCC
ViChsV.4141...AAGGTCTACTCCGGTTTGTATGAGGTTCCAAGGTCACATCGTACCTTTTATGGTGATAGTC
ViChsV.4201...AAAGTCGGCAAGCCTCCGAGGTTCAGAAGTAAGTGGTCCGATGCTCCCTATAATACACA
ViChsV.4261...AGAAATGCTAAATCAACATAGACCCGGCAATCGTGGCAAGCTGACCTCAACCCGAGATGCTT
ViChsV.4321...GATGCGTTTCTTGAACCCGCTACACTACAACCTAGCAATGACTCCCATGGAACCTCGAAAT
ViChsV.4381...GCACCACCAAAATTCGCAACATTATCGGGCTAAACCCTACGTTTTACGAATTTTGGCTTTCA
ViChsV.4441...GATTGATGCCGATACCGCTGTTGCACCCGATTCTGCCACTCGCATGGTCTCCGCTTTCCGT
ViChsV.4501...CGACGACACCCGCTTATCGGGTGTATGTGGTGAGACTGCCCTCACAACCCGAGTACTTC
ViChsV.4561...CATGGTCACTATGATGCAAGTGTACGAATACTACATCTCACACAATCTCACAAAAGCCTT
ViChsV.4621...CGAGAGTTTGTTCGGCTCTGTCACCTGTCTTCCCGTTGTTTTCAATGTACCGTATCCG
ViChsV.4681...TGCAGCTGAGACCCGGAAGCCACTCTTCGTAAGCAAGGAAGTCGTGGAAGCCTATTCCGA
ViChsV.4741...AATCCGTGTGATACTCTACACATGAAGAATTTGACCTTGGTGAGGACGATACCT
ViChsV.4801...CACAACGCTGTTGCTCAAGTCCACTCTCAATTCAGACGAAAATACATCTTCAGAGCACA
ViChsV.4861...CGCTGGACCATCGCACCCGATACCATGAAGATTTTCTTGTCCACAAGCTCGTCGATGGAT
ViChsV.4921...TAACTCCACGGTACACAATCTCATCGAGTTGATCCCACTCCAACAGCTTTGCGGATTCTG
ViChsV.4981...TTGCTCAGTATGCGATTCATCGTCTTTGTGCACTTGCTCTCCACAATCGTGCAACCCGT
ViChsV.5041...CATTGTCCGCTATCTCGCCCTACCTCGTCTACATATGCTCAAGACACCCGCGTCAATTC
ViChsV.5101...TACCACCCTTCACTTCTTCTCGGTGCCATCTACGGTCTCCAAGCCATCATCTTTATCCT
ViChsV.5161...ACGTCGCAAAATGGGAAATGATCGGCTGGATGGTGTCTACATCCTCGCAACACCTATGTT
ViChsV.5221...CGCCTGCGCCCTACCTCTACTCCTTCTGGTACCGGACGATTTCTCCTGGGAAATAC
ViChsV.5281...CGGTGTCGACCCGCGAGAAAAGGGTCAAAAAGTCATCATTCCGCAAGAAAGAAAATTCGA
ViChsV.5341...TCCTGCCTCCATCCCCAAGAAGAAGTGGGAAGAATACCAAGAAGAAGCTTTGGGATGCCCA
ViChsV.5401...AACCGAACACGGCGAAAACAGATCAATGGTCTCGGGCATCTCCTACGCAACGAAATCATG
ViChsV.5461...GCATATGACTGGATCTGGTCCACAAATCGGAATATAACATGCAACCCAGCAACCCATGTC
ViChsV.5521...GCATCTGACCGCCCAACAGGATGGGATAGGATGCTATGGCGCTAGTCAACATAT
ViChsV.5581...GAGTGAAATGGAGATGAGCGAGTTGCCGATGGCTGCGCAGGGTGAAGGACCTGGACAAGA
ViChsV.5641...TGTTCTGCTGGCTGAGATTCCGGATATCCTGAGTAAAGCTGATTTGATGACGATCACTAA
ViChsV.5701...GAAGGTTGTCAAACAGGAGCTCGAGAGGAGATTTGGTGTCAACCTTTGGGCGCAGAGGGC
ViChsV.5761...GTATATTGGGATGCAACGGAGTCGATTTCAAACGGGACGTTGTAGCGCCGTTTGTCTT
ViChsV.5821...TTTGGCCGCTTTTCTCCTAATCTCGATTGCAATGCGATTGGGAATACTGGAATAATGCGT
ViChsV.5881...CTTGGCGATGGGATGTGGGATTTAATGTGTTGTTGGGGCCTCTGCATCGACTGACACA
ViChsV.5941...CTCCTTTGTGCTATCTGGATTGGGGGATGGGAAGGTTTGGTGGTGTGGGTTG
ViChsV.6001...TATATTTGGTTAGGACGTCATGTTAGGTAGGGCATGGAACAATATGTGTACTATTGTAAT
ViChsV.6061...AAAATCTGGCAATCTATCCCTCTGTATTTGTTCTGTGGAATACTGGAATAATGCGG
ViChsV.6121...ATCTTGAGGTGTTGATATTTCCATCCTGAGTATCATTAAATGATTCTCAGGAACAGCCCTT
ViChsV.6181...CTGGTGCCACCATCTTCTCCTCTTTACCTCTTGACTTAGTCCGATTTCTCTCTTTT
ViChsV.6241...CCTCTCCATCTTCGCTCTCATCTCTGGTAAACAGTATGTCGAC


```

...++.....*+.....*++++*****+*..*****
ViChsV      ( 1639) EMSELPMAAQGEG-----PGQDVLLEAIEIRDILSKADLMTITKKGVKQELERRFGV
GgChsV      ( 1786) MGGNRNRNQFGGSQFFSPEDMVGLFSDDALLAEIREILRTADLMTVTKKGIKQELERRFGV

*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*
ViChsV      ( 1689) NLWAQRAYIGSATESILNGTL
GgChsV      ( 1846) PLDAKROHINSATEALLSQGL
    
```

9.4.6 Vergleich der Sequenzen Mil30 und CKChsV

9.4.6.1 Vergleich der Nukleotidsequenzen

```

++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+....+.
Mil30      ( 1) AAACCGGGGAATCGGGGAAACGTGACTCTCAGATGATTCTCATGCGTTTCCTCAACCGC
CKChsV     ( 1) AAGCCGGGGAATAGGGGAAACGGGACTCACAGATGGTCTGATGCGTTTCTTAAACAGG

+.++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+.++++.
Mil30      ( 61) ATTCACTACAATCTGCCCATGAGCCCTATGGAGCTGGAGATGCACCATCAAATTCGCAAT
CKChsV     ( 61) GTCCATTACAATGCTCCCATGAGTCCACTTGAGCTCGAAATGTATCACCAAATAAGAAAT

++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+.++++.
Mil30      ( 121) ATTATCGGTGTCAACCCAACTTTCTACGAATACATTTCTACAGGTGATGCCGATACAATG
CKChsV     ( 121) ATCATAGGCGTTAACCCCTACCTTTTACGAATACATGCTACAATTTAGCCGAGATACAGTT

++++.....+.+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+.++++.
Mil30      ( 181) GTTGACACGGATTCCGCCACTCGGTTCTGTTTCGGCATTCTCTCTGATACACGCCTCATC
CKChsV     ( 181) GTTGGTGCCGATTACAGCTTCTCGTATGGTGTGACGCCTTCTTAGATGATACACGACTTATC

++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....++++.
Mil30      ( 241) GTTGTGTTGTGGAGAGACTGCCCTATCCAACGCGAAAACATCCATGGTCACGATGATCCAG
CKChsV     ( 241) GGAGTTGTGGGAAACTGCTTTATCAAATGCCAAATCTTCGTTTGTCACTATGATTCAA

++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+.++++.
Mil30      ( 301) GTTTACGAGTACTATATTTCCACAACTTGATCAAGGCATTTCGAGAGTCTATTTCGCTTCC
CKChsV     ( 301) GTTTACGAATATTATATATCCACAACTTTCAAAGGCCTTCGAGAGTTTGTTCGGAAGT

+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.+.
Mil30      ( 361) CTCGATTCCCCGGTT-----
CKChsV     ( 361) GTCACGTGTTTACCTGGCTGCTTCACCATGTACCGAATTCGAGCAGTAAATTCAGGTTAA
    
```

9.4.6.2 Vergleich der putativen Proteinsequenzen

```

*****+*****+*****+*****+*****+*****+*****+*****+
Mil30      ( 1) KPGNRGRKDSQMLMRF LNRIHYNLFMSPMELEMHHQIRNIIGVNPTFYEYILQVDADTM
CKChsV     ( 1) KPGNRGRKDSQVMLMRF LNRVHYNAPMSPLELEMYHQIRNIIGVNPTFYEYMLQIDADTV

+++++*****+*****+*****+*****+*****+*****+*****+
Mil30      ( 61) VAPDSATRFVSAFLSDTRLIGVCGETALSNAKTSMTVMIQVVEYYIISHNLKAFESLFS
CKChsV     ( 61) VGADSASRMVSAFLDDTRLIGVCGETALSNAKTSFVTMIQVVEYYIISHNLKAFESLFLGS

+
Mil30      ( 121) L
CKChsV     ( 121) V
    
```

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Landau (Pfalz), den 19. August 2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Landau (Pfalz), den 19. August 2011

Lebenslauf

Geburtsdatum: 12.06.1982 in Radebeul
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig; 1 Tochter

Schulbildung und Studium

2001 Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Dresden Cotta
2001 –2006 Studium Diplom-Biologie an der Universität Bayreuth
Diplomarbeit am Lehrstuhl Pflanzensystematik, Abt. Mykologie bei Prof. Dr. Gerhard Rambold

Berufstätigkeit

09/ 2007 – 08/ 2010 Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst in Dresden-Pillnitz, Doktorandin
11/ 2010 bis heute Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen, Postdoktorandin

