

Juliane Würdig
Institut für Züchtungsforschung an Obst

Methodenentwicklung
zur Herstellung
cisgener Apfelpflanzen



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:
Juliane Schiffler
Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Züchtungsforschung an Obst
Pillnitzer Platz 3a
01326 Dresden

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates and completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

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

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website www.julius-kuehn.de (see Publications).

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.julius-kuehn.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.julius-kuehn.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.

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-048-7

DOI 10.5073/dissjki.2017.006

Herausgeber / Editor

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



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons – Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen – 4.0 Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

This work is licensed under a [Creative Commons – Attribution – ShareAlike – 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

Methodenentwicklung zur Herstellung cisgener Apfelpflanzen

DISSERTATION

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

**der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden**

von

**Diplom-Biologin Juliane Würdig
geboren am 03. April 1984 in Berlin**

Die Dissertation wurde in der Zeit von März / 2011 bis März / 2016 am Julius Kühn-Institut (JKI), im Institut für Züchtungsforschung an Obst (ZO) in Dresden-Pillnitz angefertigt.

Eingereicht am 13. April 2016

Angenommen am 08. Februar 2017

1. Gutachter (schriftliche Beurteilung): Frau Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller
2. Gutachter (schriftliche Beurteilung): Frau Prof. Dr. Magda-Viola Hanke

Tag der Disputation: 11. April 2017

Promotionskommission:

Herr Prof. Dr. Michael Rother (Vorsitzender)

Frau Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller

Frau Prof. Dr. Magda-Viola Hanke

Herr Prof. Dr. Michael Göttfert

„Der Weg ist das Ziel.“

(Konfuzius)

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Datum, Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

VERSICHERUNG	5
INHALTSVERZEICHNIS	6
ZUSAMMENFASSUNG	11
ABSTRACT	13
PUBLIZIERTE ERGEBNISSE AUS DER VORLIEGENDEN DISSERTATION ..	15
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	16
1 EINLEITUNG	19
1.1 DER APFEL	19
1.1.1 Systematik und Taxonomie.....	19
1.1.2 Herkunft und Bedeutung als Kultursorte	19
1.2 DER APFELSCHORF (<i>VENTURIA INAEQUALIS</i>)	20
1.2.1 Probleme im Apfelanbau.....	20
1.2.2 Systematik und Taxonomie.....	21
1.2.3 Lebenszyklus.....	21
1.2.4 Symptome	22
1.3 NATÜRLICHE APFELSCHORFRESISTENZEN VON <i>MALUS</i>	22
1.3.1 Überblick	22
1.3.2 Der Schorfresistenzlocus <i>Rvi6</i>	23
1.3.3 Der Schorfresistenzlocus <i>Rvi15</i>	25
1.4 DAS PATHOSYSTEM <i>V. INAEQUALIS-MALUS</i>	26
1.4.1 Gen-für-Gen Beziehung.....	26
1.4.2 <i>V. inaequalis</i> Rassen	26
1.4.3 Zusammenbruch der <i>Rvi6</i> Schorfresistenz	26
1.5 DIE APFELZÜCHTUNG	27
1.5.1 Überblick	27
1.5.2 Die Züchtung schorfresistenter Sorten.....	28
1.5.3 Gegenwärtige Ziele.....	28
1.5.4 Gentechnik in der Apfelmzüchtung	29
1.6 DAS KONZEPT DER CISGENETIK	29
1.6.1 Einleitung.....	29
1.6.2 Definition und Umsetzung beim Apfel	30
1.6.3 <i>Clean Vector</i> Technologie-Vektoren in der Apfelmzüchtung	31

1.6.3.1	Das Dexamethason induzierbare R/Rs Rekombinasesystem.....	32
1.6.3.2	Das hitzeinduzierbare Flp/ <i>FRT</i> Rekombinasesystem	33
1.7	<i>MYB10 (R6)</i> ALS ALTERNATIVE ZUM REKOMBINASESYSTEM FÜR DEN	
	CISGENETISCHEN ANSATZ BEIM APFEL	34
1.7.1	Einleitung.....	34
1.7.2	MYB Transkriptionsfaktoren in Pflanzen	35
1.7.3	Anthocyane in Pflanzen	36
1.7.4	Regulation der Anthocyanbiosynthese in Pflanzen	36
1.7.4.1	Transkriptionelle Steuerung der Anthocyanbiosynthese im Apfel	36
1.7.5	Anthocyananreicherung beim Apfel	37
1.7.5.1	Typ 1 für Rotfleischigkeit beim Apfel	37
1.7.5.2	Typ 2 für Rotfleischigkeit beim Apfel	38
1.8	ZIELSTELLUNG	39
2	MATERIAL UND METHODEN.....	41
2.1	MATERIAL.....	41
2.1.1	Puffer und Lösungen	41
2.1.2	Medien.....	42
2.1.3	Verwendete Programme.....	43
2.1.4	Verwendete binäre Vektoren	43
2.1.4.1	pB-Npt-Hsp-Flp-Gus	44
2.1.4.2	p9- <i>Dao1</i> -FLPi-HcrVf2	46
2.1.4.3	p9- <i>Dao1</i> -FLPi-MsMYB10.....	46
2.1.5	Pflanzenmaterial.....	46
2.1.5.1	Flp-Gus Linien.....	46
2.1.5.2	Linie 35S:: <i>gusA</i>	47
2.1.5.3	Apfelsorten für die stabile Transformation	47
2.1.5.4	<i>Malus</i> Sammlung der Obstgenbank Dresden.....	47
2.1.6	DNA-Material	48
2.1.6.1	<i>Malus</i> Sammlung der Obstgenbank Dresden.....	48
2.1.6.2	Kartierungspopulation 'Golden Delicious' x GMAL 2473.....	48
2.1.7	Weitere vorliegende Daten	48
2.1.7.1	<i>Malus</i> Sammlung der Obstgenbank Dresden.....	48
2.1.7.2	Kartierungspopulation 'Golden Delicious' x GMAL 2473.....	48
2.2	METHODEN	48
2.2.1	Pflanzenanzucht	48
2.2.1.1	<i>In vitro</i> Kultur	48
2.2.1.2	Mikroveredlung	49
2.2.1.3	Pflanzenanzucht und -kultivierung im Gewächshaus	49
2.2.2	Bakterienanzucht.....	49

2.2.2.1	Bakterienanzucht für die stabile Transformation von Apfelpflanzen.....	49
2.2.2.2	Kultivierung von Bakterien	50
2.2.3	Stabile Transformation von Apfelpflanzen.....	50
2.2.4	Gewebeaufschluss mit der Schwingmühle.....	51
2.2.5	DNA-Isolation	51
2.2.5.1	Isolation genomischer DNA aus Pflanzen (DNeasy Plant Mini Kit)	51
2.2.5.2	Isolation genomischer DNA aus Pflanzen (CTAB-Methode)	51
2.2.5.3	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	52
2.2.6	RNA-Isolation	52
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	52
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
2.2.8.1	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung	52
2.2.8.2	Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung	53
2.2.9	cDNA-Synthese	53
2.2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR)-Methoden	53
2.2.10.1	PCR.....	53
2.2.10.2	Fragmentgrößenanalyse.....	54
2.2.10.3	<i>Genome Walking</i>	55
2.2.10.4	RT-PCR.....	56
2.2.10.5	qRT-PCR.....	56
2.2.11	Reinigung von PCR-Produkten	57
2.2.11.1	Reinigung von PCR-Produkten nach gelelektrophoretischer Auftrennung	57
2.2.11.2	Direkte Reinigung von PCR-Produkten	57
2.2.12	Sequenzierung von PCR-Produkten	58
2.2.12.1	Direkte Sequenzierung eines PCR-Produktes.....	58
2.2.12.2	Sequenzierung eines PCR-Produktes nach Klonierung.....	58
2.2.13	Sequenzanalyse	58
2.2.14	Southern Blot Hybridisierung	59
2.2.15	Methoden zur Hitzeübertragung an Blättern/Blattexplantaten mit nachfolgender Sprossregeneration.....	60
2.2.16	Bewertung der Blattvitalität und der Regeneration am Blattexplantat nach Hitzebehandlung	61
2.2.17	Hitzebehandlung von Blättern für Expressionsanalysen.....	62
2.2.18	Produktion cisgener Pflanzen	62
2.2.19	Zugabe von selektiven Agenzien während der Pflanzenregeneration und Sprossproliferation	62
2.2.20	Schorfresistenztestung	62
2.2.21	Evaluierung der Fruchtfleischfarbe.....	63
2.2.22	Histochemischer GUS-Assay.....	63

3	ERGEBNISSE	65
3.1	CHARAKTERISIERUNG DES HITZEINDUZIERBAREN FLP/FRT REKOMBINASESYSTEMS MITTELS MONITORINGVEKTOR	65
3.1.1	Testung neuer Methoden zur Hitzeübertragung	65
3.1.1.1	Bewertung der Vitalität und der Regeneration	66
3.1.1.2	GUS-Assay an Explantaten mit Regeneration	68
3.1.1.3	Charakterisierung regenerierter Sprossen nach Hitzebehandlung	70
3.1.2	Expressionsanalysen bei Hitzegabe	72
3.1.2.1	Untersuchung der Ausgangslinien auf Chimerität	76
3.1.3	Zusammenfassung	78
3.2	ERZUGUNG CISGENER SCHORFRESISTENTER APFELSORTEN MIT EINEM HITZEINDUZIERBAREN FLP/FRT REKOMBINASESYSTEM	79
3.2.1	Herstellung und Charakterisierung transgener Linien	79
3.2.1.1	Pflanzentransformation und Etablierung transgener Linien	79
3.2.1.2	Anzahl der T-DNA-Integrationsorte	81
3.2.1.3	Genexpressionsanalysen (RT-PCR)	83
3.2.1.4	Evaluierung der Schorfresistenz	85
3.2.1.5	Genexpressionsanalyse (qRT-PCR)	88
3.2.1.6	Auswahl transgener Linien für eine weitere Charakterisierung	89
3.2.2	Weitere Charakterisierung gewählter transgener Linien	92
3.2.2.1	Untersuchungen zur Genauigkeit der T-DNA-Insertion und auf mögliche Vektorrückgrat-Integration	92
3.2.2.2	Bestimmung des T-DNA-Integrationsortes	93
3.2.3	Herstellung cisgener Apfelpflanzen	96
3.2.3.1	Hitzebehandlung für die Induktion des Rekombinasesystems	96
3.2.3.2	Identifikation cisgener Sprosse und Linienetablierung	96
3.2.4	Evaluierung cisgener Linien	99
3.2.4.1	Southern Blot Analysen	99
3.2.4.2	Charakterisierung cisgener Linien durch selektive Agenzien	100
3.2.4.3	Sequenzierung des Rekombinationsortes und Rückschluss auf die Größe der T-DNA in den cisgenen Linien	102
3.2.4.4	<i>Rvi6</i> Genexpression (qRT-PCR)	104
3.2.4.5	Schorfresistenz	105
3.2.5	Zusammenfassung	107
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM <i>Rvi15</i> SCHORFRESISTENZLOCUS	109
3.3.1	Ausgangslage	109
3.3.2	Aufgabenstellung	110
3.3.3	Primerentwicklung	111
3.3.4	PCR-Screening innerhalb der Kartierungspopulation	112

3.3.5	Zusammenfassung	113
3.4	<i>MYB10 (R6)</i> ALS ALTERNATIVE ZUM REKOMBINASESYSTEM FÜR DEN CISGENETISCHEN ANSATZ BEIM APFEL	115
3.4.1	Untersuchung von <i>MYB10</i> in der <i>Malus</i> Sammlung der Obstgenbank Dresden	115
3.4.1.1	PCR-Screening des <i>MYB10</i> Promotors.....	115
3.4.1.2	Sequenzanalyse verschiedener <i>MYB10</i> Allele	119
3.4.1.2.1	Sequenzanalyse der <i>MYB10 (R1)</i> Allele.....	122
3.4.1.2.2	Sequenzanalyse der <i>MYB10 (R6)</i> Allele.....	122
3.4.1.2.3	Sequenzanalyse der ~1 kbp Allele	123
3.4.1.2.4	Phylogenetische Stammbaumanalyse.....	123
3.4.1.3	Evaluierung der Fruchtfleischfarbe	125
3.4.1.4	Zusammenhang zwischen dem <i>MYB10 (R6)</i> Allel, rot pigmentierter Fruchtfleischfarbe und dem geografischen Ursprung der betreffenden <i>Malus</i> Spezies..	126
3.4.2	<i>MYB10 (R6)</i> als morphologischer Selektionsmarker	129
3.4.2.1	Transgene <i>MYB10</i> Linien	129
3.4.2.2	Regenerationsversuch mit transgenen <i>MYB10</i> Linien	130
3.4.3	Zusammenfassung	132
4	DISKUSSION	134
4.1	CHARAKTERISIERUNG DES HITZEINDUZIERBAREN <i>FLP/FRT</i> REKOMBINASESYSTEMS MITTELS MONITORINGVEKTOR	134
4.2	ERZEUGUNG CISGENER SCHORFRESISTENTER APFELSORTEN MIT EINEM HITZEINDUZIERBAREN <i>FLP/FRT</i> REKOMBINASESYSTEM.....	142
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM <i>Rvi15</i> SCHORFRESISTENZLOCUS.....	152
4.4	<i>MYB10 (R6)</i> ALS ALTERNATIVE ZUM REKOMBINASESYSTEM FÜR DEN CISGENETISCHEN ANSATZ BEIM APFEL	155
	LITERATURVERZEICHNIS	165
	DANKSAGUNG	176
	ANHANG.....	177
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	206
	TABELLENVERZEICHNIS	208

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation behandelt die Entwicklung von Methoden zur Herstellung cisgener Apfelpflanzen. Da die klassische Apfelzüchtung ein langwieriger Prozess ist, bietet das kürzlich vorgestellte cisgenetische Konzept eine vielversprechende Möglichkeit, um resistente Apfelsorten in relativ kurzer Zeit zu produzieren. Die Hauptziele der vorliegenden Arbeit sind: (1) die Entwicklung eines cisgenetischen Ansatzes unter Verwendung eines *Clean Vector* Technologie Verfahrens auf Basis eines hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems; (2) die Identifizierung des *Rvi15* Schorfresistenzgens von GMAL 2473, um ein weiteres apfeleigenes Resistenzgen für Transformationen verfügbar zu machen und (3) die Anwendung des apfeleigenen Transkriptionsfaktor-kodierenden Gens *MYB10* als potentiellen morphologischen Marker.

Im den ersten beiden Teilen der Arbeit wurden die Apfelsorten 'Brookfield Baigent', 'Mitchgla', 'Novajo' und 'Pinova' durch einen cisgenetischen Ansatz gentechnisch verändert. Dabei wurde das apfeleigene Schorfresistenzgens *Rvi6* aus der Wildapfelakzession *Malus floribunda* No. 821 in diese Sorten übertragen. Durch die Anwendung eines Monitoringvektors konnten im Vorfeld drei neue Methoden zur Aktivierung des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems etabliert und das System durch Expressionsanalysen molekular genauer charakterisiert werden. Bei den neuen Methoden erfolgte die Hitzebehandlung von Blättern bzw. Blattexplantaten bei 42 °C für 4 h bei 100 % Luftfeuchte (Methode „Feuchtekammer“), auf festem Nährmedium (Methode „Mediumplatte“) bzw. in Flüssigkeit (Methode „ddH₂O“/„MSO“).

Zwei cisgene Apfelinien, iM879-68 und iM946-193, wurden erzeugt. Die cisgene Linie iM879-68 der Sorte 'Pinova' wurde mit Methode „Feuchtekammer“ und die cisgene Linie iM946-193 der Sorte 'Brookfield Baigent' mit der Methode „MSO“ generiert. Beide cisgene Linien zeigten einen einzelnen T-DNA-Integrationsort. Das präzise Ausschneiden der Rekombinasekassette aus der im Apfelgenom integrierten T-DNA wurde per Sequenzierung belegt. Beide cisgene Linien besaßen eine verbesserte Schorfresistenz gegenüber dem *Venturia inaequalis* Isolat 104 (Rasse 1) im Gewächshaus und zeigten ein vergleichbares *Rvi6*

mRNA-Expressionlevel zu traditionell gezüchteten *Rvi6* tragenden Sorten. Die vorliegende Arbeit belegt die erstmalige Produktion cisgener Apfelpflanzen über Anwendung des Flp/*FRT* Rekombinasesystems.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die Präsenz der drei Schorfresistenzkandidatengene *Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C* des *Rvi15* Locus in gewählten schorfresistenten und schorfanfälligen Nachkommen einer Kartierungspopulation GMAL 2473 × *M. ×domestica* 'Golden Delicious' durch einem PCR-basierten Ansatz untersucht. Fünf analysierte Sämlinge der Kartierungspopulation zeigten eine Rekombination innerhalb des *Rvi15* Locus. Da in allen begutachteten schorfresistenten und schorfanfälligen Nachkommen die drei Schorfresistenzkandidatengene anwesend bzw. abwesend waren, konnte keines der drei Kandidatengene als Schorfresistenz vermittelndes Gen identifiziert werden.

Der vierte Teil der Arbeit fokussierte das apfeleigene *MYB10* Gen, von dem ein natürliches Allel (*MYB10 (R6)*) eine sichtbare Anthocyananreicherung in allen Geweben des Apfels verursacht. Das *MYB10 (R6)* Allel weist eine Insertion im Promotor des *MYB10* Gens auf, ursächlich für die Autoinduktion der *MYB10* Genexpression. Das Vorkommen des *MYB10 (R6)* Allels wurde in genetischen Ressourcen des Apfels artübergreifend untersucht. Diese molekularen Daten wurden mit phänotypischen Daten zur Fruchtfleischfarbe und roter Pigmentierung abgeglichen. Für eine Vielzahl von Akzessionen und Sorten wurde ein definierter Abschnitt des *MYB10* Promotors sequenziert und offenbarte drei verschiedene *MYB10* Promotorhaupttypen: das am häufigsten vorkommende *MYB10 (R1)* Allel, das *MYB10 (R6)* Allel und das bisher unbekannte ~1 kb *MYB10* Allel. Alle rotfleischigen Akzessionen der *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden besaßen das *MYB10 (R6)* Promotorallel und sind Apfelarten zugeordnet, die ursprünglich in Asien beheimatet waren. Ein Regenerationsversuch mit *MYB10 (R6)* transgenen Apfelinien zeigte eine eingeschränkte Verwendbarkeit des *MYB10 (R6)* Allels als morphologischen Marker für die Sorte 'Pinova'.

Abstract

This thesis studies the development of methods to generate cisgenic apple plants. As classical apple breeding is a time consuming process, the concept of cisgenesis, recently presented, is a promising opportunity to develop resistant apple cultivars in a relatively short time frame. The major objectives of this study are (1) to develop a cisgenic approach via the Clean Vector Technology exploiting a heat inducible Flp/*FRT* recombinase system, (2) to identify a further apple specific scab resistant gene *Rvi15* of GMAL 2473 to be used in transformations, and (3) to utilize the apple specific transcription factor coding gene *MYB10* as a potential morphological marker.

In the first two parts, the apple cultivars 'Brookfield Baigent', 'Mitchgla', 'Novajo' and 'Pinova' were genetically engineered in a cisgenic approach using the apple own scab resistance gene *Rvi6* of the wild apple accession *Malus floribunda* No. 821. In Advance, three new methods to activate the heat inducible Flp/*FRT* recombinase system were tested by means of a monitoring vector, and a molecular characterisation of the system followed by analysing the expression of transferred genes. During the new methods, heat induction treatment of leaves/leaf explants was conducted at 42 °C for 4 h at 100 % humidity (method "wet chamber"), on solid media (method "plate surface") and in liquid media (method "ddH₂O"/"MSO").

Two cisgenic apple lines were generated, namely iM879-68 and iM946-193. Cisgenic line iM879-68 of the cultivar 'Pinova' was produced using the method "wet chamber" and cisgenic line iM946-193 of the cultivar 'Brookfield Baigent' was produced using the method "MSO". Both cisgenic lines showed one T-DNA integration site. The correct excision of the recombinase cassette out of the T-DNA located in the apple genome was confirmed by sequencing. Both cisgenic lines were proofed to be resistant against *Venturia inaequalis* isolate 104 (race 1) in greenhouse tests and showed *Rvi6* expression levels comparable to traditional bred *Rvi6* harbouring cultivars. This study reports for the first time about generation of cisgenic apple plants based on a Flp/*FRT* recombinase system.

In the third part, the candidate genes *Vr2-A*, *Vr2-B* and *Vr2-C* at the *Rvi15* locus were investigated by PCR in selected scab resistant, respectively scab

susceptible descendants of a mapping population GMAL 2473 × *M. xdomestica* 'Golden Delicious'. Five investigated seedlings of the mapping population showed a recombination event within the *Rvi15* locus. Due to the presence of the three candidate genes in all investigated resistant descendants and the absence of the three candidate genes in all investigated susceptible descendants, none of the candidate genes was identified as the resistance mediating gene.

In the fourth part, the *MYB10* gene of apple, exhibiting a natural allele (*MYB10 (R6)*) that causes a visible anthocyanin accumulation in all tissues of apple, was used. The *MYB10 (R6)* allele has an insertion in the promoter region of the *MYB10* gene, responsible for autoinduction of the *MYB10* gene expression. The incidence of the *MYB10 (R6)* allele was studied in genetic resources of the genus *Malus*. These molecular data were compared to phenotypic data for fruit flesh colour and red pigmentation. A defined promoter region of *MYB10* was sequenced for numerous apple accessions and cultivars and revealed three main types of the *MYB10* promoter: the most frequent *MYB10 (R1)* allele, the *MYB10 (R6)* allele and the previously unknown ~1 kb *MYB10* allele. All red fleshed accessions of the *Malus* genebank collection carried the *MYB10 (R6)* allele and belong to *Malus* species native to Asia. A regeneration experiment with *MYB10 (R6)* transgenic apple lines showed a restricted usability of the *MYB10 (R6)* allele as a morphological marker for the cultivar 'Pinova'.

Publizierte Ergebnisse aus der vorliegenden Dissertation

Würdig J, Flachowsky H, Hanke M-V (2013) Studies on heat shock induction and transgene expression in order to optimize the Flp/FRT recombinase system in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Cell Tiss Org* 115:457-467 doi:DOI 10.1007/s11240-013-0376-1

Würdig J, Flachowsky H, Höfer M, Peil A, Eldin Ali MAMS, Hanke M-V (2014) Phenotypic and genetic analysis of the German *Malus* Germplasm Collection in terms of type 1 and type 2 red-fleshed apples. *Gene* 544:198-207 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045

Würdig J, Flachowsky H, Saß A, Peil A, Hanke M-V (2015) Improving resistance of different apple cultivars using the Rvi6 scab resistance gene in a cisgenic approach based on the Flp/FRT recombinase system. *Mol Breeding* 35:1-18 doi:10.1007/s11032-015-0291-8

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Atemp	Annealingtemperatur
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AT	Österreich
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
BE	Belgien
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	copy-DNA = revers transkribierte mRNA
CH	Schweiz
CNRQ	<i>Calibrated Normalized Relative Quantities</i>
CTAB	Cetyltrimethylammonium-bromid
d	Tag
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser aus der Reinstwasseranlage
DE	Deutschland
D-Ile	D-Isoleucin
D-Ser	D-Serin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Pol	DNA-Polymerase
dpi	Tage nach der Inokulation (<i>days past inoculation</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA-Na ₂	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (<i>European Food Safety Authority</i>)
EMBL-EBI	<i>European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute</i>
EtOH	Ethanol
Ezeit	Elongationszeit
FG	Frischgewicht
FK	Feuchtekammer
FR	Frankreich
FRT	Flp-Erkennungssequenz (<i>Flp recognition target site</i>)
g	Gramm
G	Guanin
GB	Großbritannien
gDNA	genomische DNA
GDR	<i>Genome Database for Rosaceae</i>

GfG	Gen-für-Gen
GM	genetisch verändert (<i>genetically modified</i>)
GOI	Zielgen (<i>gene of interest</i>)
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
GW	<i>Genome Walking</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
<i>HcrVf</i>	Gene des <i>Rvi6</i> Schorfresistenzlocus (<i>homologs to C. fulvum resistance genes of the Vf region</i>)
HSP	hitzeinduzierbarer Promotor <i>GmHsp 17.5-E</i> aus <i>Glycine max</i>
HÜ	Hitzeübertragung
IBA	Indol-3-Buttersäure
JKI	Julius Kühn-Institut
JP	Japan
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin-Monosulfat
l	Liter
LB	<i>left border</i> Region der T-DNA
LG	Kopplungsgruppe (<i>linkage group</i>)
LLR	<i>leucine-rich repeat</i>
LT	Litauen
LV	Lettland
min	Minute
Mio.	Millionen
mRNA	<i>messenger-RNA</i> /Boten-RNA
MSC	<i>multiple cloning site</i>
n	Anzahl
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	<i>nucleotide binding site</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ni	nicht induziert
NL	Niederlande
nm	nicht messbar
<i>nptII</i>	Neomycinphosphotransferase II kodierendes Gen
NTWG	<i>New Techniques Working Group</i>
nu	nicht untersucht
PCR	Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RB	<i>right border</i> Region der T-DNA
Rif	Rifampicin
RLP	Rezeptor-ähnliches Protein (<i>receptor like protein</i>)
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
<i>Rvi</i>	Bezeichnung der Schorfresistenzgene nach der überarbeiteten Nomenklatur. (<i>resistance to V. inaequalis</i>)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
Sp	Spectinomycin-Dihydrochlorid-Pentahydrat
STAB	Standardabweichung
t	Tonnen
T	Thymin
TDZ	Thidiazuron
T-DNA	Transfer-DNA
TF	Transkriptionsfaktor
Ti	Timentin (Ticarcillin 2NA:Clavulanate K (15:1) (v:v))
TIR	<i>Drosophila Toll and mammalian interleukin-1 receptor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
U	Einheit für die Enzymaktivität (<i>unit</i>)
ÜN	über Nacht
UPOV	Internationale Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen (<i>Union internationale pour la protection des obtentions végétales</i>)
US	Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Vf</i>	alte Bezeichnung des Schorfresistenzgens <i>Rvi6</i> (<i>Venturia floribunda</i>)
vgl.	Vergleich
Vol	Volumen
Wdh	Wiederholung
X-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure
ZKBS	Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit
ZP	Probennahmezeitpunkte
ZR	Zeitreihe

1 Einleitung

1.1 Der Apfel

1.1.1 Systematik und Taxonomie

Die Gattung Apfel (*Malus*) gehört zu der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*), welche innerhalb der Ordnung Rosenartige (*Rosales*) den zweikeimblättrigen Bedecktsamern zugeordnet wird (März, 2011). Innerhalb der Rosengewächse wird der Apfel in die Subfamilie *Spiraeoideae* eingeordnet und dort, über den Supertribus *Pyrodae* und den Tribus *Pyreae*, in den Untertribus *Pyrinae* eingegliedert (Potter et al, 2007). Dem Untertribus *Pyrinae* sind neben dem Apfel 29 andere Gattungen zugeordnet, unter anderen *Pyrus* (Birnen), *Sorbus* (Mehlbeeren), *Mespilus* (Mispeln) und *Aronia* (Apfelbeeren) (Potter et al, 2007). Eine klare Artabgrenzung innerhalb der Gattung *Malus* ist schwierig und noch nicht endgültig geklärt. Neben den Primärarten, die in Sektionen eingeteilt werden, beinhaltet die Gattung *Malus* Arthybriden. Diese Arthybriden können auf natürlichem Wege oder künstlich entstanden sein (Luby, 2013). In der vorliegenden Arbeit folgt die botanische Nomenklatur der Apfelarten einem Klassifizierungssystem nach Rehder (1949), Langenfeld (1991) und Forsline et al (2003).

1.1.2 Herkunft und Bedeutung als Kultursorte

Der kultivierte Apfel, *Malus xdomestica* Borkh., ist aus interspezifischen Hybridisierungen hervorgegangen, wobei *Malus sieversii* schon seit längerem als ein Hauptvorfahr gilt (Janick et al, 1996). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass die Evolution des Kulturapfels über einen langen Zeitraum verlief und dabei mindestens zwei Wildarten involvierte (Cornille et al, 2012). Die Wildapfelart *M. sieversii* wurde auch bei diesen Arbeiten als initialer Stammvater identifiziert. Nachfolgend trug – zumindest in Westeuropa – der europäische Wildapfel *Malus sylvestris* zum Genpool des domestizierten Apfels bei (Cornille et al, 2012).

Der Ursprung des kultivierten Apfels liegt in den Wäldern des Tian Shan Gebirges in Zentralasien, im Speziellen an der Grenze zwischen Westchina und der ehemaligen Sowjetunion bis hin zum Rand des Kaspischen Meeres (Janick et al, 1996). Diese Region, insbesondere das Gebiet um das heutige Almaty, ist das

Genzentrum der Wildapfelart *M. sieversii* (Janick et al, 1996). Die Selektion und Vermehrung von Wildäpfeln erfolgten durch die einheimische Bevölkerung bereits 6 500 v. Chr. (Pereira-Lorenzo et al, 2009). Die Apfelkultivierung wurde ebenfalls durch die Griechen und Römer praktiziert, welche den kultivierten Apfel unter anderem nach Europa verbreiteten, wo er seit der Antike angebaut wird (Janick et al, 1996). Heutzutage wird Apfelanbau in der gesamten gemäßigten Klimazone betrieben (FAO, 2015).

Im Jahr 2012 betrug die weltweite Apfelproduktion 76,4 Mio. t. Davon wurden 48 % in China (Hauptproduzent) und 20 % in Europa produziert (FAO, 2015). Der Apfel ist somit die am zweitstärksten produzierte Fruchtart nach der Banane (FAO, 2015). Gegenwärtig wird die globale Apfelproduktion von nur wenigen Sorten dominiert: 'Delicious', 'Golden Delicious', 'McIntosh', 'Jonagold', 'Braeburn', 'Gala', 'Granny Smith' und 'Fuji' (Luby, 2013).

1.2 Der Apfelschorf (*Venturia inaequalis*)

1.2.1 Probleme im Apfelanbau

Die Produktivität des kommerziellen Apfelanbaus wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Für die Erzielung eines guten Ertrages sind zahlreiche Maßnahmen erforderlich. Pilzliche Schaderreger sind für den Apfelanbau ein großes Problem, wobei der Apfelschorf die bedeutendste pilzliche Apfelerkrankung weltweit ist (Bus et al, 2011). Die meisten kommerziell angebauten Apfelsorten sind gegenüber Apfelschorf anfällig (Gessler et al, 2006; Gessler und Patocchi, 2007).

Der Apfelschorf wird durch den Ascomyceten *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. verursacht (MacHardy, 1996). Die Krankheit ist in allen Apfelanbaugebieten der Welt präsent (MacHardy, 1996; Gladieux et al, 2008). Der geografische Ursprung des Pathogens liegt in Zentralasien und ist somit mit dem geografischen Ursprung seines Wirtes identisch (Gladieux et al, 2008).

Aus ökonomischer Sicht ist der Apfelschorf für die größten Verluste im Apfelanbau verantwortlich (Bus et al, 2011). Eine Apfelschorfinfektion kann die Apfelproduktion um bis zu 70 % vermindern (Jha et al, 2009). Um eine Infektion mit Apfelschorf zu verhindern, werden in Deutschland im konventionellen Anbau

16 bis 19 Fungizidapplikationen im Jahr durchgeführt (Roßberg, 2009; Roßberg, 2013).

1.2.2 Systematik und Taxonomie

Die Meiosporen bildende Hauptfruchtform des Erregers des Apfelschorfes ist *V. inaequalis*. Im Reich der Pilze wird *V. inaequalis* dem Phylum *Ascomycota* zugeordnet. Von dort aus erfolgt die Einordnung in das Subphylum *Euascmycota*, in die Klasse *Dothideomycetes*, in die Familie *Venturiaceae* und dann in die Gattung *Venturia* (Bowen et al, 2011). Die Spezies der Gattung *Venturia* infizieren verschiedene Obstbaumgattungen, wie beispielsweise *V. pirina* die Europäische Birne (*Pyrus*), *V. nashicola* die Asiatische Birne (*Pyrus*), *V. carpophila* den Pfirsich (*Prunus*), *V. cerasi* die Kirsche (*Prunus*) und *V. inaequalis* den Apfel (*Malus*) (Bowen et al, 2011). Zwischen einer pathogenen *Venturia* Spezies und seinem Wirt (Obstbaumgattung) findet eine enge Co-Evolution statt (Bowen et al, 2011). Die verschiedenen *Venturia* Spezies grenzen sich klar voneinander ab, wahrscheinlich als eine Konsequenz aus der jährlichen sexuellen Reproduktion, wodurch bei dieser heterothallischen Spezies zwingend eine Auskreuzung erfolgt (Bowen et al, 2011). Die Erkrankung Apfelschorf ist strikt auf die Gattung *Malus* beschränkt (MacHardy, 1996). Die Mitosporen bildende Nebenfruchtform von *V. inaequalis* ist *Fusicladium pomi* (Fr.) Lind. bzw. *Spilocaea pomi* (Fr.) (alte Bezeichnung) (Bowen et al, 2011).

1.2.3 Lebenszyklus

V. inaequalis überwintert – vorwiegend in Form von Pseudothecien – im abgefallenen Laub. Dort findet, nach einer kurzen Phase saprophytischer Aktivität mit vegetativem Wachstum, der sexuelle Entwicklungsabschnitt des Pilzes statt (MacHardy, 1996). Im Frühjahr erfolgt die Primärinfektion der jungen Blätter und der Kelchblätter durch Ascosporen, welche durch die Pseudothecien bei Niederschlag abgegeben werden (MacHardy, 1996). Die Keimschläuche der Ascosporen penetrieren die Kutikula und dringen in den subkutikularen Raum ein, wo der Pilz sich etabliert und seine Nährstoffe vom Wirt bezieht (Bowen et al, 2011). Der etablierte Pilz bildet Konidien und verursacht die typischen Blatt- und Fruchtläsionen, welche für die Krankheit namensgebend sind: Schorf bzw. *black spot* (Bowen et al, 2011). Im Zuge der Saison erfolgt die Sekundärinfektion von Blättern, Früchten und Sprossen über Konidien, die durch Wind und Regen aus

den Blatt- bzw. Fruchtläsionen gelöst werden (Bowen et al, 2011). In einer Saison kommt es zu mehreren Schorfinfektionszyklen (Vaillancourt und Hartman, 2000).

1.2.4 Symptome

Die Symptome einer Apfelschorfinfektion treten bei anfälligen Genotypen an Blattspreite und -stiel, Früchten, Kelchblättern, Blüten, jungen Sprossen und Knospenschuppen auf (MacHardy, 1996). Die Ausbildung von Läsionen ist ein typisches Krankheitssymptom am Laub (MacHardy, 1996). Die Läsionen können auf allen Teilen des Blattes einzeln oder auch in großer Anzahl auftreten. Die Farbe der Blattläsionen ist anfänglich grün (etwas heller als die normale Blattfarbe) und später von dunklen Linien durchzogen (sich entwickelndes Myzel). Die Vergrößerung einer Blattläsion erfolgt zirkulär. Aufgrund der sich entwickelnden Konidiophoren und Konidien wirken die Läsionen später samtig und werden olivfarben bis hin zu schwarz. Im Verlauf der Infektion wird das Zentrum der Blattläsionen braun oder grau. Der Pilz ist dort bereits abgestorben und das Blattgewebe zerstört (MacHardy, 1996). Im Herbst entstehende Blattläsionen haben ein abweichendes Erscheinungsbild (MacHardy, 1996). Bei einer Schorfinfektion der Früchte sind junge Früchte am anfälligsten (MacHardy, 1996). Die Fruchtläsionen sind anfänglich sehr klein und befinden sich vorwiegend am Kelchende der Frucht. Im Vergleich zu Blattläsionen wachsen Fruchtläsionen langsamer, sind dunkler gefärbt und schärfer umgrenzt. Ältere Fruchtläsionen brechen auf, werden braun und verkorken im Zentrum. Der Rand einer Fruchtläsion ist immer schwarz. Das Ausmaß einer Fruchtläsion kann die Hälfte der Frucht umfassen (MacHardy, 1996).

1.3 Natürliche Apfelschorfresistenzen von *Malus*

1.3.1 Überblick

In der Gattung *Malus* sind natürlich vorkommende Resistenzen gegenüber *V. inaequalis* vorhanden, wobei zwischen quantitativen und qualitativen Schorfresistenzen unterschieden wird (Gessler et al, 2006).

Eine quantitative Schorfresistenz eines Genotyps bewirkt eine verminderte Sporulation des Pathogens im Vergleich zu einem anfälligen Referenzgenotyp. Die quantitative Resistenz ist wahrscheinlich polygen bedingt und wird durch die Kombination vieler Faktoren moduliert (Gessler et al, 2006). Die

Zusammensetzung der lokalen Pathogenpopulation hat ebenfalls Einfluss auf die quantitative Resistenz, wobei es sich stets um ein Rassengemisch mit variierenden Virulenzeigenschaften handelt (Gessler et al, 2006).

Eine qualitative Schorfresistenz zeichnet sich durch die Abwesenheit von Sporulation nach Pathogeninfektion aus. Nach der Infektion sind entweder keine Symptome sichtbar oder Resistenzreaktionen, wie *pinpoint pits*, chlorotische Läsionen bzw. Chlorosen und Nekrosen, zu sehen. Diese qualitative Resistenz kann oft auf einen oder wenige Genloci zurückgeführt werden und wird, entsprechend den Mendelschen Regeln, an die Nachkommen vererbt (Gessler et al, 2006). Im Jahr 2011 waren für den Apfel 17 verschiedene qualitative, monogene Schorfresistenzen bekannt, die entsprechend einer überarbeiteten Nomenklatur als *Rvi* (*resistance to V. inaequalis*) Gene 1 bis 17 bezeichnet werden (Bus et al, 2011). Die 17 monogenen Apfelschorfresistenzen stammen aus 'Golden Delicious' (*Rvi1*), *Russian apple* R12740-7A (*Rvi2*, *Rvi4*), 'Geneva' (*Rvi3*), *Malus xmicromalus* 245-38 (*Rvi5*), *M. floribunda* No. 821 (*Rvi6*, *Rvi7*), *M. sieversii* Akzession GMAL3631-W193B (*Rvi8*), 'Dolgo' (*Rvi9*), Antonovka Akzession PI 172623 (*Rvi10*), *Malus baccata* jackii (*Rvi11*), Hansen's *baccata* #2 (*Rvi12*), 'Durello di Forli' (*Rvi13*), 'Dülmener Rosenapfel' (*Rvi14*), GMAL 2473 (*Rvi15*), Selektion MIS op 93.051 G07-098 (*Rvi16*) und Antonovka APF22 (*Rvi17*) (Bus et al, 2011). Für die vorliegende Arbeit sind die qualitativen Schorfresistenzloci *Rvi6* sowie *Rvi15* relevant und werden anschließend genauer vorgestellt.

1.3.2 Der Schorfresistenzlocus *Rvi6*

Von den bekannten Schorfresistenzloci ist *Rvi6* (alte Bezeichnung: *Vf*) am besten charakterisiert. Die *Rvi6* Schorfresistenz stammt aus der Akzession *M. floribunda* No. 821, die bereits vor 100 Jahren für initiale Kreuzungen mit Apfelsorten genutzt wurde (Gessler und Pertot, 2012). Erst 1966 erhielt der Resistenzlocus seinen früheren Namen *Vf* (*Venturia floribunda*), nachdem das Potenzial zweier schorfresistenter Nachkommen dieser Kreuzungen als Donor für Schorfresistenz erkannt wurde (Gessler und Pertot, 2012). Die Infektion von *Rvi6* tragenden Genotypen mit einer avirulenten *V. inaequalis* Rasse kann zu verschiedenen Resistenzreaktionen führen, welche entsprechend Chevalier et al (1991) den Klassen 0 (keine Symptome), 2 (chlorotische Läsionen) und 3a (Chlorosen und Nekrosen ohne Sporulation) zugeordnet werden können (Gessler und Pertot

2012). Im Jahr 1999 wurde die *Rvi6* Resistenzregion erstmals auf einen Genombereich von 870 kb beschränkt (Patocchi et al, 1999a). Im gleichen Jahr konnte die *Rvi6* Region weiterhin auf 350 kb minimiert werden, die durch 5 BAC Klone einer BAC Bibliothek von der *Rvi6* tragenden Sorte 'Florina' (Vinatzer et al. 1998) abgedeckt wurde (Patocchi et al, 1999b). Vinatzer und Mitarbeiter (2001) identifizierten in dieser Region ein Cluster von vier Resistenzkandidatengenen, die homolog zu den *Cladosporium fulvum* (*Cf*) Resistenzgenen der Tomate sind, und bezeichneten diese als *HcrVf* (*homologs to C. fulvum resistance genes of the Vf region*) Gene 1 bis 4. Die Kandidatengene *HcrVf1*, *HcrVf2* und *HcrVf3* wurden komplett sequenziert. Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen offenbarte 7 konservierte Domänen (Domänen A-G), die ebenfalls in den homologen Resistenzgenen aus der Tomate vorhanden sind (Vinatzer et al, 2001). Die Domäne F ist hydrophob und wird als Transmembrandomäne eingestuft. Domäne C ist eine *leucine-rich repeat* (LRR) Domäne, die extrazellulär lokalisiert ist und vermutlich bei der Pathogenerkennung eine Rolle spielt. Die Kandidatengene *HcrVf1*, *HcrVf2* und *HcrVf4* werden in den *Rvi6* tragenden Sorten 'Prima' und 'Florina' exprimiert, bei *HcrVf3* hingegen scheint es sich um ein Pseudogen zu handeln (Vinatzer et al, 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse schlossen Vinatzer und Mitarbeiter (2001) *HcrVf3* als Kandidatengene für die *Rvi6* Resistenz aus. In einem vergleichbaren Ansatz konstruierten Xu und Korban (2002a) einen 290 kb großen BAC Contig, der den *Rvi6* Resistenzlocus überspannt. Die Grundlage bildete eine BAC Bibliothek von *M. floribunda* No. 821 (Xu et al. 2001). Insgesamt konnten drei exprimierte Resistenzkandidatengene identifiziert werden (*Vfa-1*, *Vfa-2* und *Vfa-4*), wovon *Vfa-1* und *Vfa-2* identisch zu *HcrVf1* bzw. *HcrVf2* sind (Xu und Korban 2002b). Der *Rvi6* Resistenzlocus ist auf Kopplungsgruppe (LG, *linkage group*) 1 lokalisiert (Gessler et al, 2006). Die Transformation des Kandidatengens *HcrVf2* unter Kontrolle des *CaMV* 35S Promotors in die schorfanfällige Sorte 'Gala' führte zu schorffresistenten transgenen Linien und belegte somit *HcrVf2* als ausreichend, um Schorffresistenz zu vermitteln (Barbieri et al. 2003, Belfanti et al, 2004). Die essentiellen regulatorischen Promotorsequenzen der drei Resistenzkandidatengene *HcrVf1*, *HcrVf2* und *HcrVf4* wurden identifiziert (Silfverberg-Dilworth et al, 2005). Für eine genauere Charakterisierung des endogenen *HcrVf2* Promotors transformierten Szankowski und Mitarbeiter (2009) die schorfanfälligen Sorten 'Gala' und 'Elstar' mit *HcrVf2* unter Kontrolle unterschiedlich langer nativer *HcrVf2*

Promotorsequenzen, gekoppelt an einen *nos* Terminator. Die Übertragung des *HcrVf2* Gens mit 288 bp seiner nativen Promotorsequenz ist ausreichend, um vollständig schorffresistente Linien zu erzeugen (Szankowski et al, 2009). Kurze Zeit später wurden die Gene *HcrVf1* sowie *HcrVf2* mit verschiedenen definierten endogenen Promotorlängen und einer definierten Länge des endogenen Terminators in die schorfanfällige Sorte 'Gala' transformiert und die Schorffresistenz der transgenen Linien untersucht (Joshi et al, 2011). Die erzeugten *HcrVf2* tragenden 'Gala'-Pflanzen zeigten eine Schorffresistenz, die mit der Resistenz der traditionell gezüchteten *Rvi6* tragenden Sorte 'Santana' vergleichbar war (Joshi et al, 2011). Im Gegensatz dazu konnte kein übertragendes *HcrVf1* Konstrukt eine Schorffresistenz in 'Gala' vermitteln (Joshi et al, 2011). Diese Untersuchungen belegten *HcrVf2* eindeutig als das *Rvi6* Schorffresistenz vermittelnde Gen, welches im Weiteren als *Rvi6* bezeichnet wird.

1.3.3 Der Schorffresistenzlocus *Rvi15*

Im Jahr 2004 wurde erstmals der Schorffresistenzlocus *Rvi15* (alte Bezeichnung: *Vr2*) der *Malus* Akzession GMAL 2473 beschrieben, welcher auf dem oberen Ende von LG 2 kartiert werden konnte (Patocchi et al, 2004). Die Sequenzierung eines *Rvi15* Locus überspannenden BAC Klons beschränkte den *Rvi15* Locus auf eine genomische Region von 48,6 kb. Die *Rvi15* Region wird durch die zwei Marker ARGH17 und 77G20RP begrenzt und beinhaltet drei putative Resistenzkandidatengene (*Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C*), die alle drei in jungen Blättern transkribiert werden (Galli et al, 2010a). Alle drei Kandidatengene zeigen eine N-terminale Homologie zur interzellularen Domäne des *Drosophila Toll* and *mammalian interleukin-1 receptor* (TIR) Proteins, eine zentrale *nucleotide binding site* (NBS) und eine LRR Domäne am C-Terminus (Galli et al, 2010a); allesamt typische Domänen pflanzlicher Krankheitsresistenzgene der TIR-NBS-LRR (TNL) Klasse (Dangl und Jones, 2001; Meyers et al, 2005). Die ermittelte 1:1 Segregation von *Rvi15* in einer Kartierungspopulation von 'Golden Delicious' × GMAL 2473 (989 ausgewertete Nachkommen), sprach für eine dominante monogene Resistenz oder nah beieinanderliegende Resistenzgene (Galli et al, 2010b). Der *Rvi15* Schorffresistenzlocus vermittelt eine langsame hypersensitive Reaktion, die sich in Form von *pinpoint pits* (Klasse 1) (Chevalier et al, 1991) nach Schorfinokulation manifestiert (Galli et al, 2010b).

1.4 Das Pathosystem *V. inaequalis*-*Malus*

1.4.1 Gen-für-Gen Beziehung

Seit langem wird für das Pathosystem *V. inaequalis*-*Malus* die Pathogen-Pflanzen-Interaktion studiert und belegt eine klare Gen-für-Gen (GfG) Beziehung zwischen dem Apfel (Wirt) und seinem Pathogen *V. inaequalis* (Bowen et al, 2011). In einer GfG Wechselwirkung erkennt der Wirt durch das Produkt eines vorhandenen Resistenzgens (*R* Gen) das Produkt des dazu passenden Avirulenzgens (*Avr* Gen) des Pathogens, was Avirulenz zur Folge hat (Boone, 1971; Dangl und Jones, 2001; Flor, 1971). Für das *V. inaequalis*-*Malus* Pathosystem waren zu Beginn der Arbeiten (2011) 17 verschiedene GfG Beziehungen beschrieben (Bus et al, 2011). Entsprechend einer überarbeiteten Nomenklatur werden die zu den Apfelschorfresistenzgenen (*Rvi* Gene) zugehörigen *V. inaequalis* Avirulenzgene als *AvrRvi* Gene bezeichnet (Bus et al, 2011).

1.4.2 *V. inaequalis* Rassen

Die genetische Hypervariabilität von *V. inaequalis* bedingt die Bildung physiologischer Rassen, die sich in ihrer Pathogenität gegenüber bestimmten Apfelsorten bzw. Apfelspezies unterscheiden (Jha et al, 2009; MacHardy, 1996). Als Rasse wird ein Einzelspor-Isolat des Pathogens bezeichnet, wenn das Isolat die Resistenz eines Wirtes komplett überwinden kann. Der Rassenstatus ist an die Voraussetzung geknüpft, dass die Mutation eines *AvrRvi* Gens (*avrRvi*) im Pathogen zu einer Nichterkennung durch den Wirt und somit zur Anfälligkeit führt. Das Rassenspektrum ergibt sich aus möglichen Kombinationen von *R* Genen, die überwunden werden können (Bus et al, 2011). Ein Beispiel für die Hypervariabilität von *V. inaequalis* ist der Zusammenbruch der *Rvi6* Schorfresistenz durch die neu entdeckten physiologischen *V. inaequalis* Rassen 6 und 7 (Parisi et al, 1993; Roberts und Crute, 1994; Benaouf und Parisi, 1997; Benaouf und Parisi, 2000).

1.4.3 Zusammenbruch der *Rvi6* Schorfresistenz

Erste Hinweise auf die Überwindung der *Rvi6* Schorfresistenz kamen aus Ahrensburg, wo Schorfbefall an *Rvi6* tragenden Sorten in den Jahren 1984 und 1988 beobachtet werden konnte (Gessler und Pertot, 2012). Versuche mit dem

Inokulum aus Ahrensburg offenbarten die neue physiologische *V. inaequalis* Rasse 6, welche *Rvi6* tragende Sorten, jedoch nicht *M. floribunda* No. 821 befallen kann (Parisi et al, 1993). Kurze Zeit später wurde die physiologische *V. inaequalis* Rasse 7 beschrieben, die *Rvi6* tragende Sorten und *M. floribunda* No. 821 infizieren kann (Roberts und Crute, 1994; Bénaouf und Parisi, 1997; Bénaouf und Parisi, 2000). In *M. floribunda* No. 821 ist neben *Rvi6* noch ein weiteres dominantes Resistenzgen (*Rvi7*, frühere Bezeichnung *Vfh*) vorhanden (Bénaouf und Parisi, 2000), das durch *V. inaequalis* Rasse 7 gebrochen wird. Im Gegensatz zu den meisten anderen physiologischen *V. inaequalis* Rassen kann Rasse 7 die *Rvi1* Schorfresistenz aus 'Golden Delicious' (alte Bezeichnung: *Vg*) nicht überwinden (Bénaouf und Parisi, 1997; Bénaouf und Parisi, 2000).

1.5 Die Apfelzüchtung

1.5.1 Überblick

Die kontrollierte Apfelzüchtung wurde 1800 durch Thomas Andrews begründet, der als erster geplante Kreuzungen zwischen gewählten Eltern durchführte (Peil et al, 2011). Bis Mitte des 20. Jahrhundert waren die meisten Apfelsorten selektierte Zufallssämlinge (Janick et al, 1996). Um 1900 wurden die ersten Züchtungsprogramme initiiert, aus denen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts eine Reihe von neuen Sorten hervorging (Peil et al, 2011). Die Ziele der Züchtungsprogramme bestanden meist darin, den Ertrag und die Fruchtqualität zu steigern sowie die Fruchterscheinung und die Lagerfähigkeit zu verbessern (Peil et al, 2011; Galli et al, 2010b). Für viele Kreuzungen wurden Abkömmlinge der Sorten 'Cox Orange Pippin', 'Golden Delicious', 'Delicious', 'Jonathan' und 'McIntosh' verwendet, wodurch die genetische Diversität vorhandener Sorten gering ist (Brown und Maloney, 2003). In vielen aktuellen Züchtungsprogrammen werden die Hauptanbausorten 'Braeburn', 'Delicious', 'Fuji', 'Gala', 'Golden Delicious', 'Granny Smith', 'Jonagold' und 'McIntosh' genutzt (Luby, 2013).

Die Apfelzüchtung ist ein langwieriger und kostspieliger Prozess. Der Apfel ist eine mehrjährige Kulturpflanze, die sich durch eine lange juvenile Phase sowie Selbstinkompatibilität auszeichnet. Zusätzlich wird durch den Frischmarkt eine hohe Fruchtqualität verlangt (Galli et al, 2010a). Die Erzeugung einer neuen Sorte

– von der anfänglichen Kreuzung bis hin zur Markteinführung – dauert bestenfalls 30 bis 40 Jahre (Peil et al, 2011).

1.5.2 Die Züchtung schorfresistenter Sorten

Die meisten im Hauptanbau verwendeten Apfelsorten sind gegenüber Apfelschorf anfällig (Gessler et al, 2006; Gessler und Patocchi, 2007). Der massive Fungizideinsatz, wie er gegenwärtig im konventionellen Apfelanbau angewendet wird, ist kostenintensiv und belastet die Umwelt stark. Eine mögliche Lösung liegt im Anbau von resistenten Sorten. Eine Quelle für qualitative Schorfresistenzen sind Wildapfelarten (Gessler und Patocchi, 2007; Galli et al, 2010a; Peil et al, 2011). Die Züchtung von schorfresistenten Apfelsorten wurde durch Crandall vor 90 Jahren initiiert (Crandall, 1926), indem er die Sorte 'Rome Beauty' mit der kleinfrüchtigen Wildapfelakzession *M. floribunda* No. 821 kreuzte. Die meisten Züchtungsprogramme für die Erstellung schorfresistenter Sorten beruhen nach wie vor auf der *Rvi6* Schorfresistenz (frühere Bezeichnung: *Vf*) von *M. floribunda* No. 821 (Gessler und Pertot, 2012). Die Einbringung einer Resistenz aus einem Wildapfel verlängert den Züchtungsprozess enorm. Um ungewollte Eigenschaften des Wildapfels aus dem Endprodukt zu verdrängen und eine ausreichende Fruchtqualität zu erhalten, sind mehrere Pseudo-Rückkreuzungen notwendig (Gessler und Patocchi, 2007; Gessler und Pertot, 2012). Gegenwärtig sind ca. 80 schorfresistente Sorten verfügbar, deren Resistenz auf *Rvi6* basiert (Gessler und Pertot, 2012), die jedoch in Qualität und Geschmack meist nicht mit den im Anbau befindlichen Sorten vergleichbar sind (Gessler et al, 2006). Obwohl in den letzten Jahren einige resistente Sorten mit guter Fruchtqualität auf den Markt gebracht wurden, ist ihre Bedeutung in Europa im konventionellen Apfelanbau sehr gering (ca. 0,5 % der Apfelproduktion in 2007). Im ökologischen Anbau hingegen ist der Anteil an angebauten schorfresistenten Sorten deutlich höher (Gessler und Pertot, 2012). Für die Züchtung schorfresistenter Apfelsorten werden neben *Rvi6* die Schorfresistenzgene *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi13* verwendet (Patocchi et al, 2009; Baumgartner et al, 2015).

1.5.3 Gegenwärtige Ziele

Ein gegenwärtiges Hauptziel der Apfelzüchtung ist die Kombination von einer hohen Fruchtqualität mit der Resistenz gegenüber Krankheiten und Schädlingen (Peil et al, 2011). Für den Erhalt von Sorten mit einer langlebigen Resistenz wird die Pyramidisierung von zwei oder mehreren Resistenzgenen in einem Genotyp

fokussiert (Peil et al, 2011). So wurden bereits in verschiedenen Zuchtklonen bis zu drei unterschiedliche Schorfresistenzgene im homozygoten Zustand vereinigt (Baumgartner et al, 2015). Um eine effiziente Apfelzüchtung zu betreiben, wird ständig nach Möglichkeiten gesucht, den Züchtungsprozess zu beschleunigen und die Selektion zu optimieren (Peil et al, 2011). Hier werden insbesondere die markergestützte Selektion für die Pyramidisierung von Resistenzgenen angewendet sowie verschiedene Methoden umgesetzt, um die juvenile Phase eines Apfelsämlings zu reduzieren (Flachowsky et al, 2009; Peil et al, 2011; Van Nocker und Gardiner, 2014).

1.5.4 Gentechnik in der Apfelzüchtung

Das Aufkommen gentechnischer Verfahren eröffnete auch in der Apfelzüchtung neue Möglichkeiten. Im Jahr 1989 wurde die erste genetisch veränderte (GM, *genetically modified*) Apfelpflanze durch James et al (1989) publiziert. Dabei werden dem Apfelgenom durch rekombinante DNA-Technologien ein oder mehrere Gene hinzugefügt (Gessler und Patocchi, 2007). Seitdem erfolgte eine Vielzahl von Experimenten zur Herstellung von GM Apfelpflanzen (Gessler und Patocchi, 2007; Hanke und Flachowsky, 2010). Die Methode der Wahl ist die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation von Blattexplantaten oder Kallusgewebe. Beim Apfel wird für die Selektion von GM Zellen/Geweben am häufigsten das Neomycinphosphotransferase II (*nptII*) Gen verwendet (Gessler und Patocchi, 2007; Hanke und Flachowsky, 2010), dessen Genprodukt unter anderem Kanamycin-Resistenz vermittelt.

1.6 Das Konzept der Cisgenetik

1.6.1 Einleitung

Um das Problem der verminderten Fruchtqualität bei traditionell gezüchteten schorfresistenten Apfelsorten zu umgehen, ist eine Möglichkeit ein einzelnes Schorfresistenzgens (aus einer Wildapfelart) in eine kommerziell erfolgreiche Sorte, unter Anwendung von rekombinanten DNA-Technologien, zu übertragen. Dieser Ansatz kann eine am Markt etablierte Sorte verbessern, ohne ihren Grundcharakter zu verändern (Borejsza-Wysocka et al, 2010; Gessler und Pertot, 2012; Jänsch et al, 2014). Ein erfolgreicher Gentransfer beinhaltet die Klonierung des Zielgens und setzt die Identifizierung des gewünschten Gens voraus. Zu

Beginn der experimentellen Arbeiten (2011) war für den Apfel nur das *Rvi6* Schorfresistenz vermittelnde Gen identifiziert (Barbieri et al. 2003; Belfanti et al, 2004; Vinatzer et al. 2001) und stand somit für einen gentechnischen Ansatz, für die Verbesserung der Schorfresistenz einer Sorte, zur Verfügung.

Im Zuge der *Rvi6* Resistenzgenidentifizierung und -charakterisierung wurden verschiedene GM Apfelpflanzen mit einer verbesserten Schorfresistenz – auf Basis von *Rvi6* – erzeugt (Barbieri et al, 2003; Belfanti et al, 2004; Szankowski et al, 2009; Joshi et al, 2011). Diese Pflanzen enthalten noch artfremde DNA-Sequenzen, wie beispielsweise Promotor-, Terminator- oder Markergensequenzen, die nicht aus dem natürlichen Genpool des Apfels stammen. Eine Einführung solcher GM Apfelpflanzen in den europäischen Markt wurde bisher nicht fokussiert, da von einer fehlenden Verbraucherakzeptanz ausgegangen wird (Bonny, 2003; Gessler und Patocchi, 2007; Gaskell et al, 2010).

Um die Verbraucherakzeptanz gegenüber GM Pflanzen zu erhöhen, wurde das cisgenetische Konzept (Schouten et al, 2006a; Schouten et al, 2006b) entwickelt. Bei dieser Strategie werden rekombinante DNA-Technologien für die Verbesserung von Sorten genutzt, wobei jedoch ein Endprodukt ohne artfremde Gensequenzen angestrebt wird. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Methodenentwicklung zur Herstellung cisgener Apfelpflanzen.

1.6.2 Definition und Umsetzung beim Apfel

Im Jahr 2006 wurde das cisgenetische Konzept erstmals durch Schouten et al (2006a; 2006b) vorgestellt. Dabei wird ein Zielgen (GOI, *gene of interest*) in seinem natürlichen Zustand (mit Introns) inklusive seiner endogenen regulatorischen Sequenzen (Promotor- und Terminatorsequenz) ausschließlich zwischen sexuell kompatiblen Spezies transferiert. Der Gentransfer erfolgt unter Anwendung von rekombinanten DNA-Technologien. Solche Gene, die aus dem natürlichen Genpool der zu transformierenden Spezies stammen, werden als „Cisgene“ bezeichnet. Ein Beispiel ist der Transfer eines Resistenzgens aus einer Wildapfelart in eine am Markt etablierte Apfelsorte. Laut Definition enthält eine cisgene Pflanze keine artfremden Gene und ist somit einer traditionell gezüchteten Pflanze sehr ähnlich (Jacobson und Schouten, 2007).

Um das cisgenetische Konzept für den vegetativ vermehrten Apfel umzusetzen, gibt es drei Möglichkeiten: (A) Die Verwendung von Transformationsvektoren, die entsprechend der *Clean Vektor* Technologie konzipiert sind, und eine induzierte Entfernung von artfremden Genen aus dem Pflanzengenom nach einer erfolgreichen Selektion von GM Pflanzen ermöglichen (Schaart et al, 2004). (B) Der Einsatz von arteigenen Markern für die Selektion von cisgenen GM Pflanzen (Kortstee et al, 2011). (C) Die Durchführung von Transformationen für die Erstellung von cisgenen GM Pflanzen ohne die Verwendung von Selektionsmarkern (De Vetten et al, 2003; Malnoy et al, 2010).

1.6.3 *Clean Vector* Technologie-Vektoren in der Apfelzüchtung

Für den Erhalt von cisgenen Apfelpflanzen werden binäre Transformationsvektoren verwendet, die entsprechend der *Clean Vector* Technologie konzipiert sind.

Die Basis für die *Clean Vector* Technologie bilden natürlich vorkommende, zielgerichtete Rekombinasesysteme. Die zielgerichtete Rekombination erfolgt dabei ortsspezifisch zwischen Erkennungssequenzen, die für jede Rekombinase charakteristisch sind (Wang et al, 2011). Ein Rekombinationsereignis umfasst das Schneiden und die anschließende Ligation von DNA, was die Integration, Deletion bzw. Inversion eines DNA-Stranges bewirken kann. Durch die Orientierung der Erkennungssequenzen wird primär bestimmt, welcher Aktionsmodus eintritt (Wang et al, 2011). Die bidirektionalen Tyrosin-Rekombinasen sind am besten charakterisiert, zu ihnen gehören die Rekombinasen Cre, Flp und R mit ihren zugehörigen Erkennungssequenzen *loxP*, *FRT* bzw. *RS* (Wang et al, 2011). Die Rekombinasesysteme *R/RS*, *Cre/loxP* und *Flp/FRT* stammen ursprünglich aus *Zygosaccharomyces rouxii*, dem Bakteriophagen P1 bzw. der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Entsprechend der *Clean Vector* Technologie ist für das gesteuerte Ausschneiden einer DNA-Sequenz die Konstruktion von induzierbaren bzw. aktivierbaren Rekombinasesystemen notwendig. Die Funktion verschiedener induzierbarer Konstrukte konnte in Pflanzen belegt werden, wobei die Induktion beispielweise chemisch durch Ethanol, Glucocorticoid oder Tetracylin (Aoyama und Chua, 1997; Caddick et al, 1998; Salter et al, 1998; Padidam, 2003; Park und Morschhäuser, 2005) oder durch Hitze (Hoff et al, 2001) erfolgte. Die korrekte Funktion aller drei Rekombinasesysteme als induzierbare

Varianten konnte für Gehölze, anhand von Pappeln, belegt werden (Matsunaga et al, 2002; Fladung et al, 2005).

Für die Produktion cisgener GM Apfelpflanzen werden Vektoren verwendet, deren T-DNA das GOI – in diesem Fall das Cisgen – und eine Rekombinasekassette enthält. Das Cisgen liegt in seiner natürlichen Konstitution vor (mit Introns an der korrekten Position und in *sense* Orientierung) und wird durch seine endogene Promotor- und Terminatorsequenz gesteuert. Die Rekombinasekassette wird durch zwei gleich orientierte Rekombinase spezifische Erkennungssequenzen begrenzt. Die Rekombinasekassette beinhaltet das Rekombinase kodierende Gen sowie alle für eine Selektion notwendigen Markergene (Transgene). Die T-DNA des Vektors wird in das Genom des Empfängers (Apfelsorte) durch Transformation eingebracht. Nach der Etablierung von GM Pflanzen wird die Rekombinasekassette zu einem gewählten Zeitpunkt durch Induktion des Rekombinasesystems deletiert und somit die unerwünschten DNA-Sequenzen (Rekombinasegen und Markergene inklusive Promotoren und Terminatoren) aus dem pflanzlichen Genom entfernt. Das Endprodukt ist frei von artfremden Genen, enthält jedoch immer noch das arteigene Cisgen. Die Abwesenheit von artfremden Genen im Endprodukt sollte die Verbraucherakzeptanz für diese neue Generation von GM Apfelpflanzen erhöhen (Vanblaere et al, 2011). Vom wissenschaftlichen Standpunkt aus gesehen, sind cisgene Apfelpflanzen genauso sicher wie traditionell gezüchtete Apfelpflanzen (Jacobson und Schouten, 2007; Schouten et al, 2006a; Schouten et al, 2006b). Für den Apfel sind zwei verschiedene induzierbare Rekombinasesysteme etabliert.

1.6.3.1 Das Dexamethason induzierbare R/Rs Rekombinasesystem

Ein Dexamethason induzierbares R/Rs Rekombinasesystem (Schaart et al, 2004) wurde kürzlich für die Herstellung der ersten cisgenen GM Apfelpflanze angewendet (Vanblaere et al, 2011). Dabei wurde die Sorte 'Gala' in einem cisgenen Ansatz mit dem Schorfresistenzgen *Rvi6*, unter Verwendung des Grundvektors pMF1 (Schaart et al, 2004), ausgestattet.

Der pMF1 Vektor gehört zu den pMF Vektoren, die durch *Plant Reserche International* (Wageningen) unter dem Thema *Marker-free Technology* entworfen und patentiert wurden (Plant Research International, 2015). Die T-DNA des pMF1 Vektors beinhaltet eine Rekombinasekassette und eine *multiple cloning site*

(MSC), wodurch das Einbringen eines beliebigen GOI in die T-DNA des Vektors ermöglicht wird. Die Rekombinasekassette des pMF1 Vektors umfasst ein konstitutiv exprimiertes *codA-nptII* Fusionsgen sowie die konstitutiv exprimierte Rekombinase R, gekoppelt mit der Ligandenbindedomäne des Glucocorticoid Rezeptors (rec-LBD). Eine positive Selektion transformierter Zellen erfolgt durch das *nptII* Gen, beispielweise auf Basis von Kanamycin. Die Rekombinasekassette kann durch die Aktivierung der R Rekombinase zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt aus dem pflanzlichen Genom entfernt werden. Die Aktivierung der Rekombinase erfolgt durch eine Dexamethasonbehandlung. Die Selektion von Zellen ohne Rekombinasekassette wird durch eine negative Selektion auf Basis von nicht-toxischem 5-Fluorocystein erreicht. Ein vorhandenes *codA* Genprodukt wandelt 5-Fluorocystein in cytotoxisches 5-Fluorouracil um und führt zum Absterben von Zellen mit Rekombinasekassette (Plant Research International, 2015).

1.6.3.2 Das hitzeinduzierbare Flp/FRT Rekombinasesystem

Für die Herstellung Markergen-freier GM Apfelpflanzen wurde am Julius Kühn-Institut (JKI) Dresden-Pillnitz ein weiteres Vektorsystem entwickelt, welches auf der Verwendung eines hitzeinduzierbaren Flp/FRT Rekombinasesystems basiert (Herzog, 2012; Herzog et al, 2012).

Die Etablierung des Systems erfolgte anhand des Monitoringvektors pB-Npt-Hsp-Flp-Gus (Abbildung 1 B, Abschnitt 2.1.4.1). Die T-DNA des Vektors umfasst einen *CaMV* 35S Promotor und ein promotorloses *gusA* Gen, welche durch die Rekombinasekassette getrennt sind. Die Induktion des Rekombinasesystems durch Hitze führt zum Ausschneiden der Kassette, wodurch der *CaMV* 35S Promotor und das *gusA* Gen in räumliche Nähe gelangen (Herzog et al, 2012). Die Aktivität des komplettierten *gusA* Gens hat β -Glucoronidasebildung zur Folge, nachweisbar durch einen GUS-Assay (Herzog et al, 2012). Um Markergen-freie GM Apfelpflanzen zu produzieren, ist eine Hitzebehandlung von 42 °C über 4 h ausreichend (Herzog et al, 2012).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde der binäre Transformationsvektor p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 (Abbildung 1 C, siehe Abschnitt 2.1.4.2) für die Herstellung cisgener Apfelpflanzen am JKI Dresden-Pillnitz entwickelt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollen cisgene Apfelpflanzen unter Verwendung des Vektors

p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 erzeugt werden. Die T-DNA des Vektors umfasst das Schorfresistenzgen *Rvi6* als GOI und eine Rekombinasekassette. Die Rekombinasekassette beinhaltet die konstitutiv exprimierten Markergene *nptII* und *dao1* sowie das hitzeinduzierbare Flp Rekombinase kodierende Gen *flp*. Das *flp* Gen steht unter Kontrolle des *GmHsp 17.5-E* Promotors aus *Glycine max* (Czarnecka et al, 1985), welcher nachweislich die Expression des *flp* Rekombinasegens bei Hitzebehandlung induziert, wodurch das Flp/*FRT* Rekombinasesystems aktiviert wird (Herzog et al, 2012). Die Transformation von Apfelsorten mit der T-DNA soll unter positiver Selektion durch das Markergen *nptII* erfolgen. Nach der Aktivierung des Flp/*FRT* Rekombinasesystems ist eine negative Selektion auf Grundlage des *dao1* Gens geplant. Das *dao1* Gen stammt aus der Hefe *Rhodotorula gracilis* und kodiert für eine D-Aminosäureoxidase (DAAO), die in Pflanzen auf Basis von D-Aminosäuren sowohl für eine positive als auch für eine negative Selektion eingesetzt werden kann (Erikson et al, 2004). Die nicht-phytotoxische Aminosäure D-Isoleucin (D-Ile) wird durch DAAO in ein phytotoxisches Produkt umgewandelt. Im Gegensatz dazu konvertiert DAAO die phytotoxische Aminosäure D-Serin (D-Ser) in ein nicht-phytotoxisches Produkt (Erikson et al, 2004). Im Apfel wurde die Funktion des DAAO-Systems im Jahr 2009 evaluiert (Hättasch et al, 2009). Die Untersuchungen zeigten, dass 20 mM D-Ser bzw. 13 mM D-Ile ausreichend sind, um *dao1* transgene Apfelsprosse bzw. Apfelsprosse ohne *dao1 in vitro* zu selektieren. Nach Induktion des Rekombinasesystems soll der Einsatz von D-Ile die Selektion von Zellen ohne *dao1* und somit ohne Rekombinasekassette ermöglichen.

1.7 MYB10 (R6) als Alternative zum Rekombinase-system für den cisgenetischen Ansatz beim Apfel

1.7.1 Einleitung

Für die Anwendung der Cisgen-Technologie in der Apfelzüchtung würde der Einsatz eines apfeleigenen Selektionsmarkers einen enormen Vorteil bedeuten. Ein apfeleigener Selektionsmarker könnte als Cisgen kloniert werden, wodurch die Verwendung eines Rekombinasesystems nicht mehr notwendig wäre. Die T-DNA solcher Vektoren würde lediglich aus zwei aneinander gekoppelten Cisgenen bestehen: dem apfeleigenen Selektionsmarker und dem apfeleigenen

GOI (beispielsweise einem Resistenzgen aus einer Wildapfelart). Die Verbesserung einer etablierten Apfelsorte durch einen cisgenetischen Ansatz wäre mit solchen Vektoren bereits nach der erfolgreichen Selektion von GM Apfelpflanzen – auf Basis des apfeleigenen Selektionsmarkers – abgeschlossen. Der gesamte Prozess für die Herstellung einer cisgenen GM Apfelpflanze würde zeitlich deutlich beschleunigt werden. Wie bei einer klassischen Transformation könnten cisgene GM Apfelpflanzen bereits nach sechs Monaten etabliert sein.

Diese Strategie setzt das Vorhandensein eines geeigneten apfeleigenen Gens voraus, welches im cisgenen Zustand als Selektionsmarker fungieren könnte. Ein guter Kandidat ist das *MYB10* Gen aus dem Apfel. Das Gen kodiert für einen MYB Transkriptionsfaktor (TF), der die Anthocyanbiosynthese in allen Geweben des Apfels reguliert (Espley et al, 2007). Ein natürlich vorkommendes Allel dieses Gens, *MYB10 (R6)*, bewirkt eine starke *MYB10* Expression (Espley et al, 2009). Eine starke *MYB10* Expression ist beim Apfel phänotypisch in Form von Anthocyananreicherung ersichtlich, was sich in rot pigmentierten Geweben äußert (Espley et al, 2007; Espley et al, 2009). Eine optische Selektion von rot pigmentierten Geweben auf Grundlage von *MYB10 (R6)* wäre denkbar, weshalb dieses natürliche Allel von *MYB10* als apfeleigener Selektionsmarker getestet werden sollte. Ein vergleichbarer Ansatz wurde zu Beginn der experimentellen Arbeiten publiziert (Kortstee et al, 2011). Diese Untersuchungen ergaben, dass das apfeleigene *MYB (R6)* Allel als optischer Selektionsmarker für eine erfolgreiche Transformation im Apfel funktioniert, allerdings keine konsistenten Ergebnisse liefert. Nach der Transformation konnte *MYB10 (R6)* über PCR-Analysen in allen rot pigmentierten Sprossen, jedoch auch in einigen grünen Sprossen nachgewiesen werden (Kortstee et al, 2011).

1.7.2 MYB Transkriptionsfaktoren in Pflanzen

In Pflanzen sind MYB TFs an der Regulierung unterschiedlichster Prozesse beteiligt, wie beispielweise der Entwicklung, der Signaltransduktion und des Sekundärmetabolismus, wozu die Anthocyanbiosynthese gehört (Allan et al, 2008). MYB TFs haben eine charakteristische, strukturell konservierte DNA-Bindedomäne, die aus einem bis mehreren imperfekten Wiederholungen besteht (Allan et al, 2008). In Abhängigkeit von der Anzahl dieser Wiederholungen werden die MYB TFs in die Gruppen R3 MYB (eine Wiederholung), R2R3 MYB (zwei Wiederholungen) und R1R2R3 MYB (drei Wiederholungen) eingeteilt

(Lin-Wang et al, 2010). Die MYB TFs haben in Pflanzen eine herausragende Bedeutung; so konnten beispielsweise in *Arabidopsis* 126 R2R3 MYB TFs identifiziert werden, wohingegen das menschliche Genom nur drei TFs der MYB Klasse aufweist (Lin-Wang et al, 2010). Anthocyanbiosynthese-regulierende MYBs wurden aus vielen pflanzlichen Spezies isoliert und gehören zur Klasse der R2R3 MYBs (Lin-Wang et al, 2010). Durch phylogenetische Untersuchungen konnte eine konservierte Domäne und einige konservierte Aminosäuren für Anthocyan regulierende MYB TFs identifiziert werden (Lin-Wang et al, 2010).

1.7.3 Anthocyane in Pflanzen

Die Farbe einer Pflanze wird in erster Linie durch die Anthocyankonzentration bestimmt. Für die Ausbildung fast aller Fruchtfarben sind Anthocyane in Kombination mit Carotinoiden und Chlorophyllen verantwortlich (Allan et al, 2008). Anthocyane sind wasserlösliche Pigmente, die zur Flavonoidfamilie gehören und eine orange bis blaue Färbung von Blüten, Früchten, Laub, Samen und Wurzeln bewirken (Tanaka et al, 2008). Die Funktionen von Anthocyanen sind vielfältig, wie zum Beispiel Schutz gegen Lichtstress und Pathogenbefall sowie die Anlockung von tierischen Interaktionspartnern für die Bestäubung und die Samenverbreitung (Tanaka et al, 2008, Lin-Wang et al, 2010).

1.7.4 Regulation der Anthocyanbiosynthese in Pflanzen

In Pflanzen erfolgt die Steuerung der Anthocyanbiosynthese auf transkriptioneller Ebene, indem die Expression der betreffenden Strukturgene koordiniert reguliert wird (Allan et al, 2008; Lin-Wang et al, 2010). In allen bisher untersuchten Pflanzenspezies erfolgt diese Regulierung über einen ternären Komplex (MYB-bHLH-WD40), der die Transkription von Strukturgenen für die Anthocyanbiosynthese direkt aktivieren kann (Koes et al, 2005; Hichri et al, 2011). Der ternäre Komplex setzt sich aus einem TF mit MYB Domäne, einem TF mit basic helix-loop-helix (bHLH) Domäne und einem WD40 Protein zusammen (Baudry et al, 2004; Koes et al, 2005).

1.7.4.1 Transkriptionelle Steuerung der Anthocyanbiosynthese im Apfel

Im letzten Jahrzehnt wurden einige Studien zur transkriptionellen Regulation der Anthocyanbiosynthese beim Apfel durchgeführt (Espley et al, 2009). Fast zeitgleich konnten drei MYB TFs identifiziert werden, die eine Rolle in der Regulierung der Anthocyanbiosynthese im Apfel spielen (Tako et al, 2006; Ban

et al, 2007; Espley et al, 2007). Zwei dieser TFs, MYB1 (Tako et al, 2006) und MYBA (Ban et al, 2007), sind an der Steuerung der Anthocyanbildung in der Fruchtschale involviert. Der dritte TF, MYB10 (Espley et al, 2007), ist an der Regulation der Anthocyanbiosynthese im Fruchtfleisch und im Laub beteiligt. Die Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene, *MYB1*, *MYBA* und *MYB10*, sind zu mindestens 98 % identisch (Espley et al, 2009). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von MYB1 und MYBA sind identisch und unterscheiden sich in drei Aminosäuren zur Sequenz von MYB10 (Ban et al, 2007; Espley et al, 2009). Die Gene *MYB1* und *MYB10* wurden an fast gleicher Position distal auf LG 9 kartiert (Chagné et al, 2007; Lin-Wang et al, 2010) und auch *MYBA* wurde an ähnlicher Stelle auf LG 9 lokalisiert (Ban et al, 2007). Erst 2010 konnte gezeigt werden, dass die drei isolierten Gene (*MYB10*, *MYB1*, *MYBA*) allelisch zueinander sind und es sich nicht um eng beieinander liegende Genduplikationen handelt (Lin-Wang et al, 2010). Im Weiteren wird der Begriff *MYB10* für dieses Gen verwendet.

1.7.5 Anthocyananreicherung beim Apfel

Verschiedene natürlich vorkommende Apfelgenotypen, wie *M. pumila* var. *Niedzwetzkyana* und *M. xdomestica* 'Red Field', zeigen eine starke, optisch gut erkennbare Anthocyananreicherung (Espley et al, 2007; Espley et al, 2009). Um diese exzessive Bildung von Anthocyanen als morphologischen Marker zu nutzen, ist sowohl eine phänotypische Beschreibung solcher Genotypen als auch die Aufklärung des zugrunde liegenden genetischen Mechanismus notwendig.

1.7.5.1 Typ 1 für Rotfleischigkeit beim Apfel

Für die Genotypen *M. pumila* var. *Niedzwetzkyana* und *M. xdomestica* 'Red Field' ist eine Rotfärbung aller vegetativen (Blatt, Sprossachse und Wurzel) und floralen Gewebe sowie der gesamten Frucht charakteristisch, wobei die Rotfleischigkeit ein sehr markantes Merkmal ist. Die betreffenden Genotypen werden dem Typ 1 für Rotfleischigkeit beim Apfel zugeordnet (Volz et al, 2006; Volz et al, 2009). Untersuchungen an der rotfleischigen Apfelsorte *M. xdomestica* 'Red Field' und der weißfleischigen Apfelsorte *M. xdomestica* 'Pacific Rose' zeigten, dass die gesteigerte Anthocyananreicherung von *M. xdomestica* 'Red Field' mit einer enorm erhöhten *MYB10* Expression korreliert (Espley et al, 2007). Beide Sorten bilden identische MYB10 Proteine, wodurch die erhöhte *MYB10* Expression in *M. xdomestica* 'Red Field' als Ursache für die Anthocyananreicherung

angenommen wurde (Espley et al, 2007). Die starke *MYB10* Expression in der rotfleischigen Apfelsorte *M. xdomestica* 'Red Field' konnte auf einen strukturellen Unterschied im *MYB10* Promotor zurückgeführt werden (Espley et al, 2009). Diese allelische Neuordnung im Promotor des *MYB10* Gens führte zur Bildung eines autoregulatorischen Locus. Die Neuordnung besteht aus einem fünffach wiederholten, 23 bp großen *MYB10* Promotorsegment, wodurch eine Minisatelliten-ähnliche Struktur entstanden ist (Espley et al, 2009) und wird folgend als *MYB10 (R6)* Allel bezeichnet. Die positive Autoregulation des *MYB10 (R6)* Allels führt zu einem Anstieg des *MYB10* Transkriptlevels, was durch die starke Akkumulation von Anthocyanen in allen Teilen der Pflanze sichtbar wird (Espley et al, 2009). Das *MYB10 (R6)* Allel konnte in weiteren rotfleischigen Genotypen nachgewiesen werden (Espley et al, 2009). Untersuchte Sorten mit weißer Fruchtfleischfarbe zeigten keine Minisatelliten-ähnliche Struktur im *MYB10* Promotor, im Folgendem als *MYB10 (R1)* Allel bezeichnet (Espley et al, 2009).

1.7.5.2 Typ 2 für Rotfleischigkeit beim Apfel

Der Typ 2 rotfleischiger Äpfel wurde für aus Nordamerika stammendes Zuchtmaterial, erstellt durch Albert Etter in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts, beschrieben (Würdig et al, 2014). Im Gegensatz zum Typ 1 zeigt der Typ 2 rotfleischiger Äpfel lediglich rot pigmentiertes Fruchtfleisch im Fruchtkortex. Sowohl die Kernzone des Fruchtfleisches, die Fruchtschale als auch die vegetativen Gewebe zeigen kaum oder keine rote Pigmentierung (Volz et al, 2009). Das Material entspringt einem Zuchtprogramm, das auf der Sorte 'Surprise' basiert. Der genaue Ursprung von 'Surprise' ist unbekannt. Die Sorte besitzt pink pigmentiertes Fruchtfleisch, zeigt jedoch keine weiteren rot pigmentierten Gewebe. Etter selektierte mindestens 30 rotfleischige Zuchtklone, wovon die meisten frei-abgeblühte Sämlinge von 'Surprise' sind. Nur einer dieser Zuchtklone erlangte unter dem Sortennamen 'Pink Pearl' größere Bedeutung (Würdig et al, 2014). Obwohl 'Pink Pearl' rot pigmentiertes Fruchtfleisch aufweist, konnte das *MYB10 (R6)* Allel für diese Sorte nicht nachgewiesen werden (Sekido et al, 2010). Somit wurde auf einem weiteren genetischen Mechanismus als Ursache für den Typ 2 für Rotfleischigkeit beim Apfel geschlossen.

1.8 Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll an der Methodenentwicklung zur Herstellung cisgener Apfelpflanzen gearbeitet werden.

Ein Schwerpunkt der Arbeit wird die Verwendung von *Clean Vector* Technologie-Vektoren fokussieren, die auf einem hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystem basieren. Anhand eines Monitoringvektors soll die Effektivität der Induktion des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems verbessert werden, indem drei neue Methoden für die Hitzeübertragung auf Blätter- bzw. Blattexplantate getestet und bewertet werden. Um das System molekular genauer zu charakterisieren, soll zusätzlich die Expression der T-DNA lokalisierten Gene des Monitoringvektors im Zuge von zwei verschiedenen Hitzebehandlungen untersucht werden.

In einem weiteren Ansatz soll die Schorfresistenz von verschiedenen kommerziell relevanten Apfelsorten unter Nutzung eines neu konzipierten *Clean Vector* Technologie-Vektors, auf Basis des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems, durch das apfeleigene Schorfresistenzgen *Rvi6* verbessert werden. Ziel ist die Herstellung von cisgenen Apfelpflanzen, die eine erhöhte Schorfresistenz aufweisen. Bei diesem Prozess werden erst transgene Linien hergestellt, die im Detail beschrieben werden sollen (Zustand der T-DNA(s); Expression der T-DNA transferierten Gene; Evaluierung der Schorfresistenz). Eine Auswahl erzeugter transgener Linien soll für die Herstellung cisgener Apfelpflanzen verwendet werden. Die Strategie für die Induktion des Rekombinasesystems soll auf Grundlage der Ergebnisse des ersten Abschnitts angepasst werden. Entstandene cisgene Apfelpflanzen sollen – analog zu den transgenen Linien – im Detail charakterisiert werden.

Um weitere apfeleigene Gene für den cisgenetischen Ansatz verfügbar zu machen, wird sich ein Teilabschnitt der Arbeit mit der Identifizierung des apfeleigenen *Rvi15* Schorfresistenz vermittelnden Gens befassen. Durch einen PCR-basierten Ansatz soll die Präsenz von drei Kandidatengenen in gewählten Nachkommen einer Kartierungspopulation untersucht werden. Die Nachkommen umfassen fünf rekombinante Pflanzen für den *Rvi15* Locus, die sich zusätzlich in ihrer Schorfresistenz unterscheiden.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wird die mögliche Nutzung eines apfeleigenen morphologischen Selektionsmarkers für die Erzeugung cisgener Apfelpflanzen als Alternative zum Rekombinasesystem thematisieren. Im Zentrum der Untersuchungen steht das apfeleigene *MYB10* Gen. Im Zuge der Arbeit soll das *MYB10* Gen im Apfel artübergreifend näher charakterisiert und im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfarbe betrachtet werden. Ein deutlicher Fokus wird dabei auf einem natürlichen Allel des *MYB10* Gens, *MdMYB10 (R6)*, liegen, dessen Präsenz mit einer starken optisch sichtbaren Anthocyananreicherung assoziiert ist. Die Eignung des *MYB10 (R6)* Allels als morphologischer Marker soll für das in Dresden-Pillnitz etablierte Transformationsprotokoll abgeschätzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Angaben zu den Bezugfirmen (Tabelle A 1), verwendeten Chemikalien (Tabelle A 2), technischen Geräten (Tabelle A 3) und Verbrauchsmaterialien (Tabelle A 4) befinden sich im Anhang.

2.1.1 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in ddH₂O angesetzt.

Blockierungslösung

0,5 % Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics) (w/v)
In Maleinsäurepuffer lösen.

Denaturierungspuffer

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Detektionspuffer; pH-Wert: 9,5

0,1 M Tris
0,1 M NaCl

DNA-Extraktionspuffer; pH-Wert: 7,5

0,35 M Sorbitol
0,1 M Tris
5 mM EDTA

20X Farbpuffer

6 mM Tartrazin
3,5 mM Kresolrot
30 % Saccharose (w/v)

GUS-Puffer (frisch ansetzen)

5 ml 1 M Natriumphosphat-Puffer (pH-Wert: 7,0)
200 µl 500 mM EDTA
50 mg SDS
33,3 mg N-Lauroylsarcosin
2 ml 50 mM Kaliumferricyanid
200 µl Triton X-100
50 mg X-Gluc
ad 100 ml

Hybridisierungspuffer

2 % Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics) (w/v)
0,1 % N-Lauroylsarkosin (w/v)
0,2 % SDS (w/v)
In 5X SSC 1 h bei 60 °C lösen.
Zugabe von 1 Vol Formamid (deionisiert).

Neutralisationspuffer; pH-Wert: 7,5

0,5 M	Tris-HCL
1,5 M	NaCl

Maleinsäurepuffer; pH-Wert: 7,5

0,1 M	Maleinsäure
0,15 M	NaCl

Maleinsäurewaschpuffer

Maleinsäurepuffer + 0,3 % Tween 20 (v/v)

Microprep-Puffer (frisch ansetzen)

0,417 Teile	DNA-Extraktionspuffer
0,417 Teile	Nuklei-Lysis-Puffer
0,166 Teile	5 % N-Lauroylsarkosin (v/v)

Zugabe von 1,58 g/l Natriumbisulfid.

Nuclei-Lysis-Puffer

0,2 M	Tris
0,05 M	EDTA
2 M	NaCl
2 %	CTAB (w/v)

20X SSC; pH-Wert: 7,0

3 M	NaCl
0,3 M	Tri-Natriumcitrat

5X SSC

20X SSC:ddH₂O (v/v) (1:4)

2X SSC

20X SSC:ddH₂O (v/v) (1:10)

50X TAE-Puffer; pH-Wert: 8,0

242 g	Tris
57,1 ml	Essigsäure 99 % (Eisessig)
100 ml	0,5 M EDTA-Na ₂

ad 1 l

1X TAE-Puffer

50X TAE-Puffer:ddH₂O (v/v) (1:50)

1X TE-Puffer; pH-Wert: 8,0

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

0,1X TE-Puffer

1X TE-Puffer:ddH₂O (1:10) (v/v)

2.1.2 Medien

Alle Medien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in ddH₂O angesetzt.

Co-Kultivierungsmedium (fest)

LSG-Medium + 1 mM Betain-Hydrochlorid + 100 µM Acetosyringon

LB-Medium (flüssig und fest); pH-Wert: 7,2; autoklavieren

10,0 g/l	Trypton/Pepton aus Casein (Carl Roth)
5,0 g/l	Bacto-Hefeextrakt; ArtNr.: 212750 (OTTO NORDWALD)
10,0 g/l	NaCl

fest: Zugabe von 20,0 g/l Difco™ Agar; Artikelnummer: 214510 (OTTO NORDWALD).

LSG-Medium (Regenerations-Medium, fest); pH-Wert: 5,8; autoklavieren

4,4 g/l	Linsmaier & Skoog Medium L0230 (DUCHEFA)
30,0 g/l	Saccharose
2,0 mg/l	TDZ
0,3 mg/l	IBA
3,4 g/l	GELRITE® (Carl Roth)

M8-Medium (Sprossproliferations-Medium, fest); pH-Wert: 5,8; autoklavieren

4,4 g/l	Murashige & Skoog Medium M0222 (DUCHEFA)
30,0 g/l	Sorbitol
1,0 mg/l	BAP
1,0 mg/l	IBA
9,0 g/l	Difco™ Agar; Artikelnummer: 214510 (OTTO NORDWALD)

Malzextraktagar (fest)

1,5 g/l	Malzextrakt (Merck)
12,0 g/l	Difco™ Agar; Artikelnummer: 214510 (OTTO NORDWALD)

MSO-Medium (flüssig); pH-Wert: 5,8; autoklavieren

2,15 g/l	Murashige & Skoog Medium M0221 (DUCHEFA)
----------	--

SIM-Medium; pH-Wert: 5,2; autoklavieren

5,88 g/l	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
20,00 g/l	Saccharose

Vor Gebrauch, Zugabe von 100 µM Betain-Hydrochlorid (sterilfiltriert) + 1 mM Acetosyringon (sterilfiltriert).

Vermehrungssubstrat

4 Vol	Tonerde 3 (Brill)
1 Vol	Sand

2.1.3 Verwendete Programme

Es wurden die Programme Office 2007 (Microsoft), BioEdit (Ibis Biosciences), SAS 9.4 (SAS), qbase⁺ (Biogazelle), GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter), Image Lab™ (Bio-Rad), Adobe Photoshop (Adobe Systems) und MEGA 6.06 (Tamura et al, 2013) verwendet.

2.1.4 Verwendete binäre Vektoren

Die Erstellung der binären Vektoren erfolgte durch den DNA Cloning Service. Alle Vektoren wurden nach der *Clean Vector* Technologie konzipiert und basieren auf dem FIp/*FRT* Rekombinasesystem aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Abbildung 1). Die T-DNA der Vektoren besteht aus dem zu übertragenden GOI und einer

Rekombinasekassette (Abbildung 1 A). Die Rekombinasekassette wird durch zwei gleich orientierte Flp-Erkennungssequenzen (FRT, *Flp_recognition target site*) begrenzt. Sie beinhaltet das Flippase (Flp) Rekombinase kodierende Gen *flp* sowie Markergene. Die Expression des *flp* Gens steht unter Kontrolle des hitzeinduzierbaren Promotors *GmHsp 17.5-E* (HSP) aus *Glycine max*. Um eine ungewollte Expression im Bakterium zu unterbinden, wurde das *flp* Gen durch das zweite Intron des *ST-LS1* Gens aus der Kartoffel in zwei künstliche Exons untergliedert. Im folgenden Abschnitt werden die T-DNAs der verwendeten Vektoren genauer beschrieben.

2.1.4.1 pB-Npt-Hsp-Flp-Gus

Für die Evaluierung des Flp/FRT Rekombinasesystems im Apfel wurde der Monitoringvektor pB-Npt-Hsp-Flp-Gus konzipiert (Abbildung 1 B). Um eine Selektion bei der Pflanzentransformation zu ermöglichen, enthält die Rekombinasekassette neben dem Rekombinasegen (*flp*) den Selektionsmarker *nptII*. Die Expression von *nptII* wird durch einen *CaMV 35S* Promotor gesteuert, der stromaufwärts der Rekombinasekassette lokalisiert ist. Stromabwärts der Rekombinasekassette, jedoch innerhalb der T-DNA, befindet sich ein *gusA* Gen ohne Promotor. Die Entfernung der Rekombinasekassette bringt das *gusA* Gen in räumliche Nähe zum *CaMV 35S* Promotor und sollte dann die Expression des *gusA* Gens ermöglichen. Die Expression von *gusA* führt zur Bildung von β -Glucuronidase, was durch ein GUS-Assay nachgewiesen werden kann.

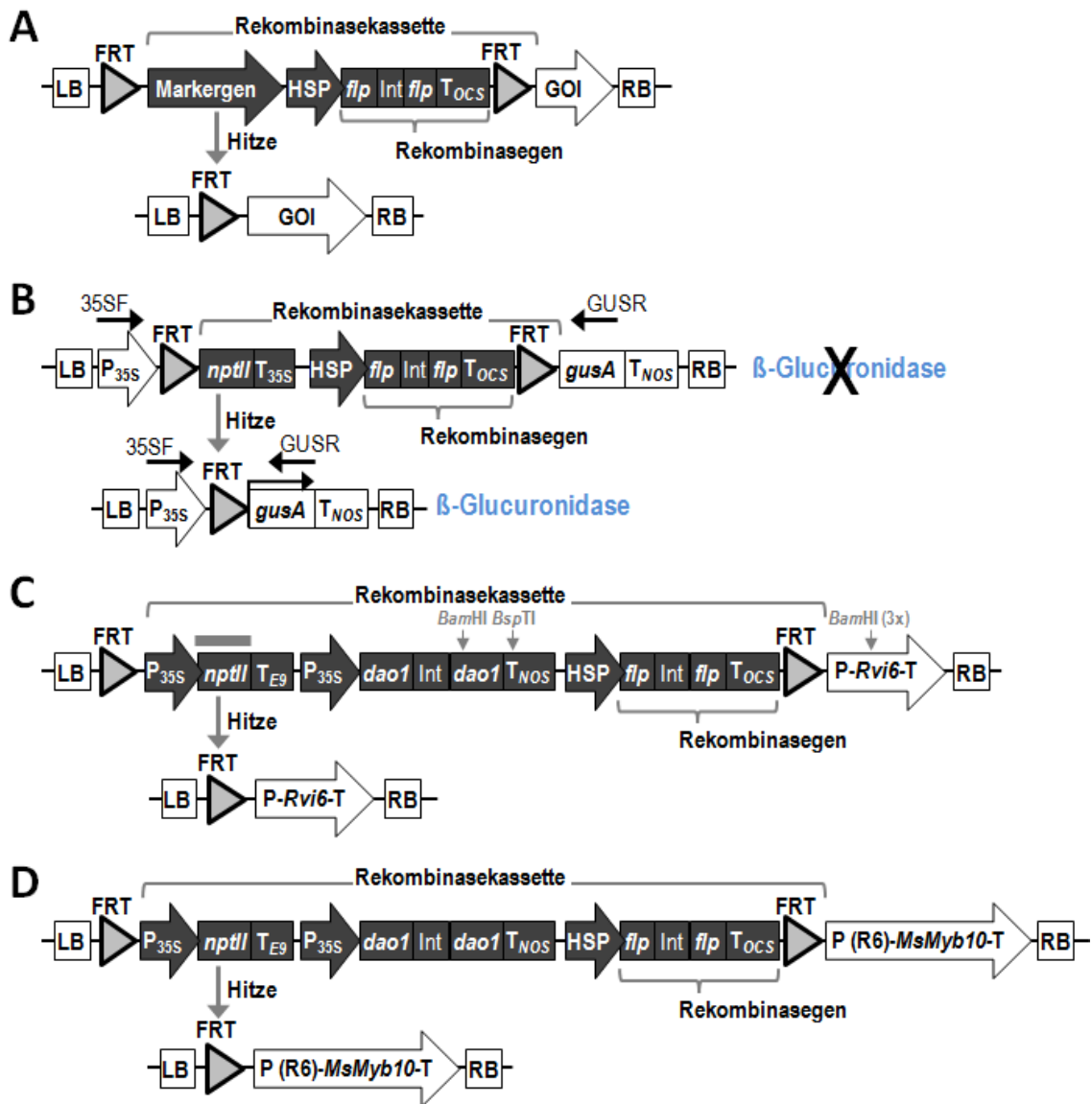


Abbildung 1 Schematische Darstellung der T-DNA verwendeter binärer Transformationsvektoren vor und nach Induktion der Flp Rekombinase durch Hitze. **A** Allgemeiner Aufbau und Funktionsweise der verwendeten Vektoren. **B** Vektor pB-Npt-Hsp-Flp-Gus. Die Bindeposition der Primer 35SF und GUSR sind verzeichnet. **C** Vektor p9-Dao1-FLPi-HcrVf2. Die Bindeposition der *nptII* spezifischen Sonde (grauer Balken) und Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Bsp*TI sind verzeichnet. **D** Vektor p9-Dao1-FLPi-MsMYB10. *dao1* – D-Aminosäureoxidase (DAAO) kodierendes Gen, in zwei künstliche Exons unterteilt; HSP – Hitzeschock induzierbarer Promotor *GmHsp 17.5-E* aus *Glycine max*; *flp* – Flippase (Rekombinase) kodierendes Gen, in zwei künstliche Exons unterteilt; FRT – Flp-Erkennungssequenz (graue Dreiecke); GOI – *gene of interest*; *gusA* – β -Glucuronidase kodierendes Gen; *Int* – zweites Intron des *ST-LS1* Gens aus der Kartoffel; LB – *left border* Region; *nptII* – Neomycinphosphotransferase II kodierendes Gen; P (R6)-*MsMYB10-T* – MYB10 Transkriptionsfaktor kodierendes Gen aus TNR 31-35 mit endogener Promotorsequenz (R6-Allel) und endogener Terminatorsequenz; P-*Rvi6-T* – Schorfresistenzgen *Rvi6* von *M. floribunda* No. 821 mit endogener Promotor- und Terminatorsequenz; P_{35S} – *CaMV* 35S Promotor; RB: *right border* Region; T_{35S} – *CaMV* 35S Terminator; T_{E9} – Terminator des RubisCO Gens *E9*; T_{NOS} – Terminator des Nopalinsynthese Gens; T_{OCS} – Terminator des Octopinsynthese Gens.

2.1.4.2 p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2

Für die Produktion cisgener schorfresistenter Sorten wurde der binäre Vektor p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2 konstruiert (Abbildung 1 C; für eine detaillierte Vektorkarte siehe Abbildung A 1; GenBank: KM232746). Das GOI des Vektor p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2 ist das Schorfresistenzgen *Rvi6* (früher *HcrVf2*), welches ursprünglich aus der Wildapfelakzession *M. floribunda* No. 821 stammt. Das Schorfresistenzgen *Rvi6* wurde vom BAC Klon M18-5 der Sorte 'Florina' (Vinatzer et al, 2001), inklusive 1315 bp und 536 bp seiner nativen Promotor- bzw. Terminatorsequenz, kloniert. Die Rekombinasekassette enthält neben dem Rekombinasegen die beiden *CaMV* 35S Promotor gesteuerten Selektionsmarker *nptII* und *dao1*. Um eine ungewollte Expression im Bakterium zu unterbinden, wurde das *dao1* Gen – analog zum *flp* Gen – in zwei künstliche Exons untergliedert. Die positive Selektion von Zellen mit eingebauter T-DNA inklusive Rekombinasekassette soll durch *nptII* erfolgen. Der zweite Selektionsmarker *dao1* soll primär für eine negative Selektion von Zellen ohne *dao1*, auf Basis der Aminosäure D-Ile, eingesetzt werden. Eine positive Selektion von Zellen mit *dao1* sollte über die phytotoxische Aminosäure D-Ser möglich sein.

2.1.4.3 p9-*Dao1*-FLPi-MsMYB10

Für die Produktion cisgener rotfleischiger Apfelsorten wurde der binäre Vektor p9-*Dao1*-FLPi-MsMYB10 konstruiert. Mit Ausnahme des GOIs ist der Vektor identisch zum Vektor p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2 aufgebaut (Abbildung 1 D). Das GOI im Vektor p9-*Dao1*-FLPi-MsMYB10 ist das apfeleigene *MYB10* Gen im R6-Allelzustand. Das *MYB10* Gen kodiert für einen TF, der die Anthocyanbiosynthese im Apfel als Schlüsselregulator beeinflusst. Das Gen wurde von genomischer DNA (gDNA) der rotlaubigen und rotfleischigen *Malus*-Hybride TNR 31-35 (siehe Abbildung 31), inklusive 1796 bp und 1078 bp seiner nativen Promotor- bzw. Terminatorsequenz, kloniert.

2.1.5 Pflanzenmaterial

2.1.5.1 Flp-Gus Linien

Für die Evaluierung des Flp/*FRT* Rekombinasesystems wurden *in vitro* Kulturen von neun transgenen Apfellinien durch das JKI Dresden-Pillnitz bereitgestellt. Die Linien stammen aus Transformation eines Sämlings der Sorte 'Pinova' ('PinS') mit dem Vektors pB-Npt-Hsp-Flp-Gus (Abbildung 1°B). Acht Linien (T781, T782,

T789, T790, T791, T792, T793 und T794) tragen eine einzelne Kopie der T-DNA. Im Gegensatz dazu trägt die Linie T670 vier Kopien der T-DNA. Eine detaillierte Beschreibung der Linien liegt vor (Herzog et al, 2012; Herzog, 2012).

2.1.5.2 Linie 35S::*gusA*

Als Kontrolle für die *Flp-Gus* Linien wurde die transgene Apfelinie 35S::*gusA* als *in vitro* Kultur durch das JKI Dresden-Pillnitz bereitgestellt. Die Linie exprimiert das *gusA* Gen unter dem *CaMV* 35S Promotor konstitutiv; eine detaillierte Linienbeschreibung befindet sich in Flachowsky et al (2008) unter der Linienbezeichnung T355.

2.1.5.3 Apfelsorten für die stabile Transformation

Für die geplanten Transformationen wurden *in vitro* Kulturen der Apfelsorten 'Brookfield Baigent' ('Royal Gala' Mutante), 'Kanzi', 'Mariri Red' ('Braeburn' Mutante), 'Mitchgla' ('Gala' Mutante), 'Novajo' ('Jonagold' Mutante), 'Pinova' und 'Red Jonaprince' ('Jonagold' Mutante) durch das JKI Dresden-Pillnitz bereitgestellt. Die Sorten 'Novajo' und 'Red Jonaprince' sind Farbmutanten der Sorte 'Jonagold'. Bei 'Brookfield Baigent' und 'Mitchgla' handelt es sich um Farbmutanten, die ursprünglich auf die Sorte 'Gala' zurückzuführen sind.

2.1.5.4 *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden

Um den Promotor des *MYB10* Gens für den Apfel artübergreifend zu untersuchen, wurden 357 Akzessionen der *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden zur Verfügung gestellt. Die Bäume sind 10 bis 15 Jahre alt und auf 'Bittenfelder Sämling' veredelt. Die Sammlung befindet sich am Standort Dresden-Pillnitz des JKI (51° 00' 07" N, 13° 52' 59" O). Die botanische Nomenklatur folgt dem Klassifizierungssystem von Rehder (1949), Langenfeld (1991) und Forsline et al (2003), wobei nach Primärarten und Arthybriden unterschieden wird. Von den 357 Akzessionen repräsentieren 153 Akzessionen 26 verschiedenen Primärarten und 169 Akzessionen 20 verschiedenen Arthybriden. Die restlichen 35 Akzessionen sind synthetische Hybriden mit bekannten Eltern (27 Akzessionen) und unbestimmte Genotypen, welche unter *Malus* sp. geführt werden (8 Akzessionen).

2.1.6 DNA-Material

2.1.6.1 *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden

Für PCR-Analysen wurden von 357 Akzessionen der *Malus* Sammlung gDNA-Proben mit einer Konzentration von je 20 ng/µl durch das JKI Dresden-Pillnitz bereitgestellt.

2.1.6.2 Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473

Für PCR-Analysen wurden von dreizehn Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473 (Galli et al, 2010b) gDNA-Proben mit einer Konzentration von je 20 ng/µl durch Andrea Patocchi zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Weitere vorliegende Daten

2.1.7.1 *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden

Von insgesamt 357 Akzessionen der *Malus* Sammlung liegen Boniturdaten von 70 verschiedenen phänotypischen Merkmalen vor (Ali, 2011). Im Rahmen der Arbeit wurden die Boniturdaten für die Fruchteigenschaft „Farbe des Fruchtfleisches“ gemäß dem Deskriptor Nr. 53 (UPOV, 2005) verwendet.

2.1.7.2 Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473

Für dreizehn Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' (schorfanfällig) × GMAL 2473 (schorfresistent) (Galli et al, 2010b) wurden Boniturdaten zur Resistenz gegenüber einem *V. inaequalis* Rassengemisch (gewonnen in Wädenswil, Schweiz) sowie molekulare Markerdaten für LG 2 durch Andrea Patocchi zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

2.2.1.1 *In vitro* Kultur

Apfelpflanzen wurden *in vitro* als Sprossspitzenkultur auf M8-Medium in Weck-Gläsern unter Langtagbedingungen (16 h Licht (0,65 klx) bei 23 °C/8 h Dunkelheit bei 17 °C) erhalten. Eine Erneuerung der Kulturen fand alle vier Wochen statt. Dazu wurden je Glas 10 Sprossspitzen auf frisches Medium aufgesetzt.

2.2.1.2 Mikroveredlung

Für die Mikroveredlung von Apfelpflanzen wurden ca. sechs Wochen alte, im Gewächshaus angezogene 'Golden Delicious'-Sämlinge als Unterlage verwendet. Als Reiser dienten lange Sprosse von ca. vier Wochen alten *in vitro* Kulturen. Für die Mikroveredelung wurde ein V-Schnitt angewendet. Dafür wurde die Sprossspitze der Unterlage unterhalb eines Internodiums gekappt und der Spross mittig ca. 1 cm tief eingeschnitten. Das Reis wurde bis auf die apikalen Blätter entlaubt und basal V-örmig angespitzt. Das präparierte Reis wurde anschließend auf die vorbereitete Unterlage aufgesetzt und die Verbindungsstelle mit luftdurchlässiger BR SEALTEX Latex-Bandage (Reitsport Springer) fixiert. Um eine hohe Luftfeuchte sicherzustellen, wurden die mikroveredelten Pflanzen mit Wasser besprüht und mit einer feuchten Tüte überzogen. Die Akklimatisierung der veredelten Pflanzen an das Gewächshausklima erfolgte sukzessive über einen Zeitraum von 15 Tagen. Um das Wachstum des Edelreises zu fördern, wurden anschließend alle Seitentriebe der Unterlage entfernt.

2.2.1.3 Pflanzenanzucht und -kultivierung im Gewächshaus

Für die Apfelsämlingsanzucht wurden Samen in autoklaviertem Sand bei 6 °C für 90 d stratifiziert und anschließend 1 cm tief in Vermehrungssubstrat eingebracht. Die Anzucht der Apfelsämlinge und die Kultivierung mikroveredelter Apfelpflanzen erfolgte im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht bei 23 °C/8 h Dunkelheit bei 17 °C).

2.2.2 Bakterienanzucht

2.2.2.1 Bakterienanzucht für die stabile Transformation von Apfelpflanzen

Für die stabile Transformation von Apfel lag der binäre Vektor p9-Dao-FLPi-HcrVf2 in den *A. tumefaciens* Stämmen GV3101 und EHA105 vor. Der binäre Vektor p9-Dao-FLPi-MsMYB10 lag ausschließlich im Stamm EHA105 vor. Die *A. tumefaciens* Stämme besitzen eine Rifampicin-Resistenz im Genom. In beiden binären Vektoren liegt eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz im Vektorrückgrat und eine Kanamycin-Resistenz in der T-DNA vor. Die *A. tumefaciens* Anzucht für die Transformation erfolgte steril, ausgehend von einer Einzelkolonie über Nacht (ÜN) bei 28 °C in 2 ml flüssigem LB-Medium versetzt mit 100 mg/l Rifampicin (Rif) und 50 mg/l Spectinomycin-Dihydrochlorid-Pentahydrat (Sp). Je 30 µl der ÜN-Kultur wurden in insgesamt fünf LB-Platten,

versetzt mit 100 mg/l Rif und 50 mg/l Sp, eingearbeitet und für 3 d bei 28 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2 Kultivierung von Bakterien

Bakterienkulturen (*Escherichia coli* und *A. tumefaciens*) wurden auf LB-Platten, versetzt mit selektiven Antibiotika, bei optimalen Wachstumsbedingungen für 24 h angezogen und dann bei 6 °C erhalten. Das Medium wurde alle vier Wochen erneuert.

2.2.3 Stabile Transformation von Apfelpflanzen

Die stabile Transformation von Apfelpflanzen erfolgte *A. tumefaciens* vermittelt. Alle Schritte wurden steril durchgeführt. Für die Herstellung des Inokulums wurden die gewachsenen Bakterien der fünf LB-Platten (Punkt 2.2.2.1) in insgesamt 25 ml SIM-Medium geerntet und anschließend schüttelnd im Wasserbad für 4 bis 5 h bei 28 °C inkubiert. Für die Inokulation wurden junge Blätter von vier Wochen alten *in vitro* Kulturen geerntet, verletzt und mit der Blattoberseite nach oben für 7 min im Inokulum schwenkend inkubiert. Anschließend wurden die Blätter zur Trocknung auf Filterpapier überführt und dann mit der Blattoberseite nach oben auf Co-Kultivierungsmedium aufgelegt. Die Blätter wurden für 3 d bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Behandlung der Blätter mit drei Waschschritten (10' in MSO-Medium mit 500 mg/l Timentin (Ti); 5' in ddH₂O; 10' in MSO-Medium mit 500 mg/l Ti). Anschließend wurde die restliche Flüssigkeit von den Blättern auf Filterpapier abgezogen und die Blätter dann mit der Blattoberfläche nach unten in Feuchtekammern überführt. Jedes Blatt wurde in drei Explantate geschnitten und mit der Blattoberfläche nach unten auf LSG-Medium (Regenerations-Medium) mit 500 mg/l Ti und 100 mg/l Kanamycin-Monophosphat (Km) aufgelegt. Km diente der Selektion von Zellen mit stabil eingebauter T-DNA, Ti war für die Abtötung verbliebener *A. tumefaciens* Zellen notwendig. Während des gesamten Regenerationsprozesses bis hin zur Linienetablierung wurden beide Antibiotika allen verwendeten Medien zugesetzt. Die Explantate wurden erst für drei Wochen bei 25 °C im Dunkeln und dann unter Langtagbedingungen (16 h Licht (1,3 klx) bei 23 °C/8 h Dunkelheit bei 17 °C) kultiviert, wobei innerhalb der ersten zwei Wochen eine sukzessive Akklimatierung an die volle Lichtintensität stattfand. Acht Wochen nach der Inokulation wurden abgestorbene Explantate entsorgt, lebende Explantate auf neues LSG-Medium aufgesetzt und regenerierte Pflanzen (Regenerate) auf

M8-Medium überführt, wobei eine eindeutige Nummer vergeben wurde. Dieser Prozess wurde anschließend alle vier Wochen wiederholt.

2.2.4 Gewebeaufschluss mit der Schwingmühle

Zum Gewebeaufschluss mit der Schwingmühle MM 300 (RETSCH) wurde Blattmaterial in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt, ein bis zwei sterilisierte Stahlkugeln (Durchmesser: 5 mm) hinzugegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Gewebeaufschluss erfolgte in vorgekühlten Einsätzen (flüssiger Stickstoff) bei 20 Hz für 2 min. Die aufgeschlossenen Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.5 DNA-Isolation

2.2.5.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen (DNeasy Plant Mini Kit)

Für PCR-Analysen bzw. *Genome Walking* wurde gDNA aus 50 mg bzw. 100 mg jungem *in vitro* Blattmaterial, je Frischgewicht (FG), mit dem DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert. Der Gewebeaufschluss erfolgte mit der Schwingmühle. Isolierte gDNA-Proben wurde bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.5.2 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen (CTAB-Methode)

Für Southern Blot Analysen bzw. *Genome Walking* wurde 150 mg junges *in vitro* Blattmaterial (FG) geerntet und mit der Schwingmühle aufgeschlossen. Die Isolation der gDNA erfolgte mit einer modifizierten CTAB-Methode (Sanghai-Marroof et al, 1984). Dafür wurde das pulverisierte Blattmaterial in 1 ml Microprep-Puffer homogenisiert und anschließend für 1 h bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Es folgte die Zugabe von 800 μl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) (v/v), die Proben wurden für 30 s gemixt und nachfolgend zentrifugiert (Raumtemperatur (RT), 10'000 rpm, 5 min). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 3 μl RNase A (10 mg/ml; Carl Roth) versetzt und für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch einen Hitzeschritt ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) gestoppt und die gDNA durch Zugabe von 600 μl eiskaltem 2-Propanol gefällt. Die Proben wurden zentrifugiert (RT, 10'000 rpm, 5 min), der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit 70 % Ethanol (EtOH) (v/v) gewaschen. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 150 μl 0,1X TE-Puffer gelöst und die gDNA bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.5.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) oder mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) jeweils nach Herstellerangaben. Dafür wurde steril, ausgehend von einer Einzelkolonie, eine ÜN-Kultur in LB-Medium (2–4 ml) versetzt mit entsprechenden Antibiotika angezogen.

2.2.6 RNA-Isolation

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurde 50 mg junges *in vitro* Blattmaterial (FG) geerntet und mit der Schwingmühle aufgeschlossen. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Stratec) durch Einsatz der *Lysis Solution RP* nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 50 µl *Elution Buffer R* eluiert und im direkten Anschluss einer DNase-Behandlung unterzogen, wobei das DNA-free™ DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet wurde. Isolierte RNA wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäurefragmente entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld im Agarosegel aufgetrennt. Dafür wurde die Agarose, 0,8 bis 2,0 % (w/v) (Biodeal), in 1X TAE-Puffer gelöst. Jedes Gel enthielt 5 Tropfen Ethidiumbromid (250 µg/ml) je 50 ml Gel. Als Laufmittel wurde 1X TAE-Puffer verwendet. Alle Nukleinsäure-Proben, außer PCR-Proben nach Verwendung der DreamTaq DNA-Polymerase (DNA-Pol), wurden vor der Elektrophorese mit 6X DNA Loading Dye (Fermentas) versetzt. Nach Durchführung der Gelelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren mit dem ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad) dokumentiert.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.8.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektrophotometrisch mit dem NanoDrop2000c (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Vor jeder Messserie wurde das Gerät mit 2 µl Probenlösungsmittel kalibriert. Die Konzentrationsmessung erfolgte an 2 µl Probenvolumen.

2.2.8.2 Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde gelelektrophoretisch unter Verwendung eines 1 % Agarosegels bestimmt. Dafür wurden 2 µl der Nukleinsäuren-Probe mit 2 µl 6X DNA Loading Dye (Fermentas) sowie 5 µl autoklaviertem ddH₂O versetzt und elektrophoretisch ins Gel transferiert. Bei jeder Bestimmung wurde eine Standardreihe aus λ-DNA (10, 20, 30, 40 und 50 ng) mitgeführt. Die ins Gel transferierten Nukleinsäuren wurden mit dem ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad) dokumentiert und die Konzentration der Proben mit der Software Image Lab™ (Bio-Rad) ermittelt.

2.2.9 cDNA-Synthese

Für die Herstellung von *copy*-DNA (cDNA) wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA, unter Anwendung des Oligo(dT)₁₈ Primers nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)-Methoden

Jede durchgeführte PCR-Reaktion wurde über das verwendete Primerpaar und die angewendete PCR-Methode definiert (Tabelle A 5). Die verwendete DNA-Pol und die Angaben zu den PCR-Bedingungen sind ebenfalls Tabelle A 5 zu entnehmen. Informationen zu den genutzten Primern befinden sich in Tabelle A 6.

Im folgenden Abschnitt sind die angewendeten PCR-Methoden beschrieben: (2.2.10.1) PCR, Standard-PCR unterschieden nach der verwendeten DNA-Pol; (2.2.10.2) Fragmentgrößenanalyse; (2.2.10.3) *Genome Walking*; (2.2.10.4) Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) und (2.2.10.5) quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR).

2.2.10.1 PCR

DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)

Ansatz (25 µl)		Programm (^a siehe Tabelle A 5)	
10X DreamTaq Buffer	2,5 µl	94 °C	5'
dNTPs (2 mM)	2,5 µl	94 °C	30''
20X Farbpuffer	1,0 µl	Atemp ^a	1'
Primer 1 (10 µM)	1,25 µl	72 °C	Ezeit ^a
Primer 2 (10 µM)	1,25 µl	72 °C	7'
DreamTaq DNA-Pol	0,1 µl	10 °C	∞
Template (DNA)/(cDNA)	20 ng (DNA)/1 µl (cDNA)		
ddH ₂ O	ad 25 µl		

x Zyklen^a

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)

Ansatz (25 µl)		Programm (^a siehe Tabelle A 5)	
5X Phusion HF Buffer	5,0 µl	98 °C	2'
dNTPs (2 mM)	2,5 µl	98 °C	10'
Primer 1 (10 µM)	1,25 µl	Atemp ^a	20'
Primer 2 (10 µM)	1,25 µl	72 °C	Ezeit ^a
Phusion DNA-Pol	0,125 µl	72 °C	7'
Template (DNA)	70 ng	10 °C	∞
ddH ₂ O	ad 25 µl		

x 35

Long PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific)

Ansatz (25 µl)		Programm (^a siehe Tabelle A 5)	
10X Long PCR Buffer	2,5 µl	94 °C	3'
dNTPs (2 mM)	2,5 µl	94 °C	20"
Primer 1 (10 µM)	1,25 µl	Atemp ^a	30"
Primer 2 (10 µM)	1,25 µl	68 °C	Ezeit ^a
Long PCR Enzyme Mix	0,25 µl	94 °C	20"
Template (DNA)	100 ng	Atemp ^a	30"
ddH ₂ O	ad 25 µl	68 °C	Ezeit ^a + 5"/Zyklus
		68 °C	10'
		10 °C	∞

x 10

x 25

PCR DIG Probe Synthesis Kit (Sondenherstellung) (Roche Diagnostics)

Ansatz (50 µl)		Programm (^a siehe Tabelle A 5)	
10X PCR Buffer	5,0 µl	94 °C	5'
10X PCR DIG Probe Synthesis Mix	5,0 µl	94 °C	30"
Primer 1 (10 µM)	2,5 µl	Atemp ^a	1'
Primer 2 (10 µM)	2,5 µl	72 °C	Ezeit ^a
Enzyme Mix	1,5 µl	72 °C	7'
Template (Plasmid-DNA)	100 ng	10 °C	∞
ddH ₂ O	ad 50 µl		

x Zyklen^a

2.2.10.2 Fragmentgrößenanalyse

Die exakte Größe amplifizierter PCR-Produkte wurde mit dem Kapillarsequenziergerät GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter) nach Herstellerangaben bestimmt. Im Vorfeld wurde eine PCR-Reaktion unter Verwendung des Type-it® Microsatellite PCR Kit (QIAGEN) durchgeführt, wobei ein Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff BMN-5 markiert war.

Ansatz (10 µl)		Programm (^a siehe Tabelle A 5)	
2X Type-it Multiplex PCR Master Mix	5,0 µl	95 °C	5'
Primer 1 (2 µM)	1,0 µl	95 °C	1'
Primer 2 (2 µM)	1,0 µl	Atemp ^a	1' 30"
5X Q-Solution	1,0 µl	72 °C	30"
Template (DNA)	40 ng	60 °C	30'
ddH ₂ O	ad 10 µl	10 °C	∞

x 28

Für die Größenbestimmung mit dem Sequenziergerät wurde das PCR-Produkt wie folgt vorbereitet:

Probenvorbereitung für die Größenbestimmung

PCR-Produkt (1:20 mit ddH ₂ O (v/v) verdünnt)	1,0 µl
GenomeLab™ Sample Loading Solution	24,9 µl
GenomeLab™ DNA Size Standard-400	0,1 µl
Mineralöl	1 Tropfen

2.2.10.3 Genome Walking

Für die T-DNA-Insertionsortbestimmung von transgenen Linien wurde das GenomeWalker™ Universal Kits (Clontech) verwendet. Für die Erstellung einer DNA *library* wurden 2,5 µg gDNA mit einem *blunt end* Restriktionsenzym in einem 100 µl Ansatz ÜN verdaut (*EcoRV*, *StuI*, *PvuII* bzw. *Bst1107I*, je 80 U (Thermo Fisher Scientific)), anschließend mit 1 Vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) (v/v) gereinigt und durch Zugabe von 2 Vol 98 % eiskaltem EtOH, 0,1 Vol 3 M NaAc (pH 4,5) und 20 µg Glykogen (Thermo Fisher Scientific) für 1 h bei -20 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 80 % EtOH (v/v) gewaschen, luftgetrocknet und dann in 20 µl 0,1X TE-Puffer resuspendiert. Die Ligation des GenomeWalker Adapters erfolgte bei 16 °C ÜN nach folgendem Ansatz:

Ligation des GenomeWalker Adapter, Ansatz (8 µl)

verdaute DNA	4,0 µl
GenomeWalker Adapter	1,9 µl
10X Ligationspuffer	1,6 µl
T4 Ligase (6 U/µl)	0,5 µl

Die Ligation wurde durch 5 min Inkubation bei 70 °C gestoppt und die Probe im Anschluss mit 72 µl 1X TE-Puffer versetzt. Die 1. PCR und 2. PCR (*nested* PCR) wurden unter Verwendung des Advantage® 2 PCR Kit (Clontech) durchgeführt. Für die 1. PCR diente eine DNA *library* als Template. Für die 2. PCR wurde ein 1:50 verdünntes PCR-Produkt aus der 1. PCR (Produkt:ddH₂O) (v/v) als Template verwendet. Genutzte Primerkombinationen und Informationen zu den Primern sind Tabelle A 7 und Tabelle A 6 zu entnehmen. Die verwendeten PCR-Bedingungen waren wie folgt:

1. PCR, Ansatz (25 µl)

10X Advantage 2 PCR Buffer	2,5 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
Primer 1 (AP1) (10 µM)	0,5 µl
Primer 2 (Tabelle A 7) (10 µM)	0,5 µl
50X Advantage 2 Polymerase Mix	0,5 µl
Template (DNA <i>library</i>)	1,0 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

1. PCR, Programm

94 °C	25"	x 7
72 °C	3'	
94 °C	25"	x 32
67 °C	3'	
67 °C	7'	
10 °C	∞	

2. PCR (<i>nested</i> PCR), Ansatz (25 µl)		2. PCR (<i>nested</i> PCR), Programm	
10X Advantage 2 PCR Buffer	2,5 µl	94 °C	25"
dNTPs (2 mM)	2,5 µl	72 °C	3'
Primer 1 (AP2) (10 µM)	0,5 µl	94 °C	25"
Primer 2 (Tabelle A 7) (10 µM)	0,5 µl	67 °C	3'
50X Advantage 2 Polymerase Mix	0,5 µl	67 °C	7'
Template (Produkt 1. PCR, verdünnt)	1,0 µl	10 °C	∞
ddH ₂ O	ad 25 µl		

Je 5 µl PCR-Produkt der 1. und 2. PCR wurden in einem 0,8 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert. Ausgewählte PCR-Produkte wurden anschließend gereinigt und sequenziert.

2.2.10.4 RT-PCR

Um die qualitative Expression einer spezifischen mRNA zu untersuchen, wurde die RT-PCR genutzt. Dafür wurde eine PCR (Kap. 2.2.10.1) mit 1 µl cDNA als Template unter Verwendung der DreamTaq DNA-Pol durchgeführt. Die genutzten Primerpaare, Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind Tabelle A 5 und Tabelle A 6 zu entnehmen.

2.2.10.5 qRT-PCR

Um die quantitative Expression einer spezifischen mRNA zu untersuchen, wurde die qRT-PCR an einem iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) genutzt. Es wurde der Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific) verwendet, wobei der Einzelansatz auf ein Volumen von 20 µl angepasst war. Als Template diente 2 µl 1:50 verdünnte cDNA (cDNA:ddH₂O) (v/v). Die genutzten Primerpaare, Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind Tabelle A 5 und Tabelle A 6 zu entnehmen.

Ansatz (20 µl)		Programm (^a siehe Tabelle A 5) mit anschließender Schmelzpunktanalyse	
2X Mix	10 µl	94 °C	3'
Primer 1 (10 µM)	1,0 µl	94 °C	1'
Primer 2 (10 µM)	1,0 µl	Atemp ^a	1'
Template (cDNA, 1:50 verdünnt)	2,0 µl	72 °C	1'
ddH ₂ O	ad 20 µl	94 °C	1'
		55 °C	1'
		55 °C + 0,5 °C/Zyklus	10"
		10 °C	∞

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der Software qbase⁺ (Biogazelle). Die Spezifität jedes qRT-PCR-Produktes wurde mit einer Schmelzpunktanalyse überprüft und die Effizienz von jedem PCR-Lauf durch die Verwendung einer Verdünnungsreihe bestimmt. Die Expressionsstabilität der Referenzgene *MdActin*, *RNA Polymerase II* und *RuBisCO* wurde an 11 biologischen Replikaten überprüft, gemessen mit je drei technischen Wiederholungen. Die Expression von *RNA Polymerase II*, mit einem M-Wert von 0,655, erwies sich im Vergleich zur Expression von *MdActin* (M-Wert: 0,695) und *RubisCO* (M-Wert: 0,805) als am stabilsten.

Für jeden Genotyp wurden drei biologische Replikate mit je drei technischen Wiederholungen untersucht. Die Expression der *RNA Polymerase II* wurde bei der Berechnung für die Normalisierung verwendet. Die Expression des Zielgens wurde relativ zur Sorte 'Santana' berechnet. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen wurden statistisch auf Signifikanz überprüft, wofür der Kehrwert der CNRQ (*Calibrated Normalized Relative Quantities*) Werte verwendet wurde. Für die statistischen Berechnungen wurde ein p-Wert von 0,05 verwendet. Die Normalverteilung der Werte wurde mit dem Shapiro-Wilk Test bestätigt und die Daten dann einer ANOVA mit anschließendem *Tukey's Studentized Range* (HSD) Test unterzogen.

2.2.11 Reinigung von PCR-Produkten

2.2.11.1 Reinigung von PCR-Produkten nach gelelektrophoretischer Auftrennung

Um das zu reinigende Zielfragment von unerwünschten PCR-Produkten zu trennen, erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung amplifizierter PCR-Produkte (Kap. 2.2.7). Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das gewünschte PCR-Produkt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.2.11.2 Direkte Reinigung von PCR-Produkten

Eine direkte Reinigung von PCR-Produkten nach durchgeführter PCR erfolgte mit dem MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben.

2.2.12 Sequenzierung von PCR-Produkten

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden ausschließlich gereinigte PCR-Fragmente verwendet. Die Sequenzierung erfolgte entweder direkt oder nach Klonierung des zu sequenzierenden Fragments in einen geeigneten Vektor. Die Sequenzierung wurde durch die Firma Eurofins Genomics (Single Read Sequenzierservice *Value Read*; Sanger-Methode) durchgeführt, wofür die Proben im Vorfeld nach Dienstleistungangaben vorbereitet wurden.

2.2.12.1 Direkte Sequenzierung eines PCR-Produktes

Diese Methode der Sequenzierung war nur anwendbar, wenn von einem einzelnen PCR-Produkt ausgegangen werden konnte. Die direkte Sequenzierung eines PCR-Produktes erfolgte mit je zwei Ansätzen. In der Regel wurde einmal der verwendete *forward* und einmal der verwendete *revers* Primer der PCR-Reaktion für die Sequenzierreaktion genutzt. Kam ein anderer PCR-Produkt spezifischer Primer für die Sequenzierreaktion zum Einsatz, ist dies im Text angegeben.

2.2.12.2 Sequenzierung eines PCR-Produktes nach Klonierung

Ein PCR-Produkt wurde im Vorfeld einer Sequenzierung kloniert, wenn von mehreren PCR-Produkten gleicher/ähnlicher Größe ausgegangen werden konnte, wie es beim stark heterozygoten Apfel meist der Fall ist. Dafür wurde gereinigtes PCR-Produkt unter Verwendung des TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben in pCR[™]2.1-TOPO[®] kloniert und in chemisch kompetente One Shot[®] TOP10 *E. coli* Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA von Einzelkolonien wurde isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), nach Herstellerangaben) und das Insert einmal mit dem Primer M13 uni (–21) und einmal mit dem Primer M13 rev (–29) sequenziert.

2.2.13 Sequenzanalyse

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit den Programmen *Nucleotide BLAST* von der Plattform NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) und NCBI BLAST von der Plattform GDR (*Genome Database for Rosaceae*) ausgewertet. Der Vergleich mehrerer DNA-Sequenzen (*Alignments*) wurde mit dem Programm MUSCLE von der Plattform EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*) erstellt. Die Detektion repetitiver Elemente in Sequenzen erfolgte mit dem Programm *RepeatMasker*

unter Verwendung von *M. xdomestica* spezifischen Einstellungen (Smit et al, 1996–2010) von der *Repbase* Datenbank (Jurka et al, 2005).

2.2.14 Southern Blot Hybridisierung

Für die Bestimmung der Anzahl an T-DNA-Integrationsorten in den transgenen Apfelinien und zur Überprüfung der Abwesenheit der Rekombinasekassette in den cisgenen Apfelinien wurde die Southern Blot Hybridisierung genutzt. Die verwendete Sonde war DIG-markiert und wurde mit *nptII* spezifischen Primern erstellt (Kap. 2.2.10.1, Sondenherstellung). Pro Linie wurden stets zwei unabhängige Blots durchgeführt, wofür je 7,5 µg gDNA (isoliert mit der CTAB-Methode) einmal mit *Bam*HI und einmal mit *Bsp*TI ÜN nach Herstellerangaben verdaut wurden (je 50 U, Thermo Fisher Scientific). Die Schnittstellen beider Restriktionsenzyme innerhalb der T-DNA des Vektors und die Bindestelle der *nptII* spezifischen Sonde in der T-DNA sind Abbildung 1 C zu entnehmen. Die verdaute DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M NaAc und 2,5 Vol 98 % EtOH und anschließender Inkubation bei –20 °C für 2 h gefällt und nachfolgend zentrifugiert (4 °C, 13'000 rpm, 45 min). Das DNA-Pellet wurde zweimal mit eiskaltem 70 % EtOH gewaschen (4 °C, 13'000 rpm, 15 min), luftgetrocknet und in 35 µl 0,1X TE-Puffer gelöst. Das gesamte Probenvolumen wurde mit 5 µl 6X DNA Loading Dye (Fermentas) versetzt und in einem 1 % Agarosegel für 4 h bei 90 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der DIG-markierte Größenstandard VII (Roche Diagnostics) mitgeführt. Das Gel wurde mit dem ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad) dokumentiert und danach auf eine geeignete Größe zurechtgeschnitten. Dann wurde das Gel 2x für 15 min in Denaturierungspuffer äquilibriert, mit ddH₂O gespült, anschließend 2x für 15 min in Neutralisationspuffer äquilibriert, wieder mit ddH₂O gespült und danach für 5 min in 2X SSC gelegt. Im nächsten Schritt wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics) mittels Kapillarblot ÜN transferiert. Dafür diente als Pufferreservoir 20X SSC. Der Blot hatte folgenden Aufbau von unten nach oben (in Klammern ist angegeben, in welchem Puffer die einzelnen Komponenten getränkt waren): 1x Chromatographiepapier (20X SSC) verbunden mit dem Pufferreservoir, 2x Chromatographiepapier (20X SSC), Gel (2X SSC), Membran (2X SSC), 2x Chromatographiepapier (2X SSC), 2x Chromatographiepapier (trocken), Zellstoffstapel (trocken), beschwerte Glasplatte. Um den Transfer der DNA zu bestätigen, wurde das Gel nach

erfolgreichem Kapillarblot erneut dokumentiert. Die Membran wurde in 2X SSC gewaschen und anschließend für 1 h bei 80 °C gebacken. Es folgte die Prähybridisierung der Membran in Hybridisierungspuffer für 4 h bei 42 °C. Für die Hybridisierung wurden 375 ng Sonde für 10 min bei 96 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt, mit 5 ml Hybridisierungspuffer versetzt und auf die Membran transferiert. Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte bei 42 °C ÜN. Die hybridisierte Membrane wurden anschließend gewaschen (2x für 15 min in 2X SSC + 0,1 % SDS (w/v) bei RT; 2x für 15 min in 0,1X SSC + 0,1 % SDS (w/v) bei 68 °C; 5 min in Maleinsäurepuffer bei RT), blockiert (45 min in Blockierungslösung bei RT) und in Maleinsäurepuffer gespült. Für die Detektion der hybridisierten DIG-markierten Sonde wurde die Membran mit 0,5 µl Anti-DIG-AP (Roche Diagnostics) in 20 ml Blockierungslösung für 30 min bei RT gespült, kurz mit Maleinsäurepuffer gewaschen, anschließend 2x für je 20 min in Maleinsäurewaschpuffer äquilibriert und danach für 5 min in Detektionspuffer bei RT gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran mit 2 ml ECFTM Substrate (Amersham Bioscience) für 30 min bei RT. Die Membran wurde anschließend in Folie eingeschweißt und im Zeitraum 1 bis 24 h nach Inkubation mehrfach mit dem ChemiDocTM XRS+ System (Bio-Rad) entsprechend den Herstellerangaben gescannt.

2.2.15 Methoden zur Hitzeübertragung an Blättern/Blatt-explantaten mit nachfolgender Sprossregeneration

Für die Induktion des Rekombinasesystems wurden drei Methoden zur Hitzeübertragung (HÜ) an Blättern/Blattexplantaten entwickelt (Abbildung 2). Um genetisch einheitliche Sprosse zu gewinnen, war an alle drei Methoden eine Sprossregeneration angeschlossen. Die Hitzebehandlung fand stets bei 42 °C für 4 h statt. Die Methoden unterschieden sich in der Art des hitzeübertragenden Mediums. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Als Erstes wurden junge Blätter von 28 d alten *in vitro* Kulturen in Feuchtekammern (Petrischale mit nassem Filterpapier) geerntet. Die drei Methoden sind nachfolgend erläutert. HÜ „ddH₂O“/„MSO“: Die Blätter wurden von der Feuchtekammer in ddH₂O bzw. MSO überführt. Die Hitzebehandlung fand unter Schütteln in einem Wasserbad statt (hitzeübertragendes Medium = Flüssigkeit). HÜ „Feuchtekammer“: Die Feuchtekammer mit den geernteten Blättern wurde in einen Inkubator überführt, wo die Hitzebehandlung stattfand (hitzeübertragendes

Medium = 100 % Luftfeuchte). HÜ „Mediumplatte“: Jedes Blatt wurde in drei Explantate geteilt und mit der Blattoberfläche nach unten auf LSG-Medium aufgelegt (10 Explantate je Platte). Die Platten mit den Blattexplantaten wurden in einen Inkubator überführt, wo die Hitzebehandlung stattfand (hitzeübertragendes Medium = festes Nährmedium). Nach der Hitzebehandlung wurden die Blätter der HÜ „ddH₂O“/„MSO“ und „Feuchtekkammer“ ebenfalls in je drei Explantate geschnitten (abgestorbenes Gewebe wurde ggf. entfernt) und mit der Blattoberfläche nach unten auf LSG-Medium aufgelegt. Die Blattexplantate wurden für 21 d bei 22 °C in Dunkelheit inkubiert und dann ins Licht überführt (16 h Licht bei 23 °C/8 h Dunkelheit bei 17 °C), wo eine schrittweise Adaption an die volle Lichtintensität (0,65 klx) über einen Zeitraum von 14 d stattfand. Die Blattexplantate mit Regeneration wurden 8 Wochen nach der Hitzebehandlung auf neues LSG-Medium überführt und für weitere vier Wochen angezogen. Entstandene Regenerate wurden dann auf M8-Medium überführt, welches alle vier Wochen erneuert wurde. Verlängerte Sprosse waren in der Regel nach acht Wochen auf M8-Medium vorhanden.

2.2.16 Bewertung der Blattvitalität und der Regeneration am Blattexplantat nach Hitzebehandlung

Um die entwickelten HÜ (Kap. 2.2.15) zu bewerten, wurde die Blattvitalität und die Regenerationsfähigkeit der Blattexplantate nach Hitzebehandlung geprüft. Dazu wurden je 10 Blätter bzw. 30 Blattexplantate den HÜ „ddH₂O“, „Feuchtekkammer“ bzw. „Mediumplatte“ (Kap. 2.2.15) unterzogen und die Vitalität der hitzebehandelten Blätter/Blattexplantate direkt nach Ende der Hitzegabe visuell wie folgt bewertet: vital – Blatt/Blattexplantat zeigte weniger als 25 % nekrotisches Gewebe; semivital – Blatt/Blattexplantat zeigte zwischen 25 % und 75 % nekrotisches Gewebe; tot – Blatt/Blattexplantat zeigte mehr als 75 % nekrotisches Gewebe. Die Blätter/Blattexplantate wurden wie beschrieben (Kap. 2.2.15) weiterbehandelt, wobei abgestorbenes Gewebes beim Zerschneiden in Explantate nicht entfernt wurde. Die Regenerationsfähigkeit der Blattexplantate wurde anhand der Kallusbildung an den Blattexplantaten nach der dreiwöchigen Dunkelphase bewertet: positiv – Kallusgewebe war am Explantat vorhanden; negativ – das Blattexplantat zeigte kein Kallusgewebe. Je HÜ wurde die Regenerationsfähigkeit von 30 Blattexplantaten bewertet und dann die

Regenerationsrate in Prozent ((Explantate mit Kallusbildung/Gesamtanzahl der begutachteten Explantate) × 100) errechnet.

2.2.17 Hitzebehandlung von Blättern für Expressionsanalysen

Um die Expression der T-DNA lokalisierten Gene im Verlauf der HÜ zu analysieren, wurden zwei Zeitreihen (ZR) erstellt. Dafür wurden junge Blätter von 28 d alten *in vitro* Kulturen der HÜ „Feuchtekammer“ (Kap. 2.2.15) für 1 h (ZR I) bzw. für 4 h (ZR II) unterzogen. Vor, während und nach der Hitzebehandlung wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten genommen (je drei Blätter) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C. In Abbildung 6 sind beide ZR schematisch dargestellt und die Probennahmezeitpunkte (ZP) vermerkt. Der ZP 0 h markiert den Start der Hitzebehandlung. Bei ZR I wurden die Blätter nach der Hitzegabe in der Feuchtekammer verbleibend ins Licht bei 23 °C überführt.

2.2.18 Produktion cisgener Pflanzen

Für die Produktion cisgener Apfelpflanzen wurden junge Blätter von 28 d alten *in vitro* Kulturen transgener Apfellinien den HÜ „MSO“ bzw. „Feuchtekammer“ unterzogen (Kap. 2.2.15). Ausgehend von individuell regenerierten Einzelsprossen wurden Analysen durchgeführt.

2.2.19 Zugabe von selektiven Agenzien während der Pflanzenregeneration und Sprossproliferation

Um auf Basis des DAAO-Systems (Hättasch et al, 2009) die Selektion von Zellen/Pflänzchen/Sprossen ohne *dao1* zu erreichen, wurden dem LSG-Medium bzw. dem M8-Medium 5 mM oder 10 mM D-Ile zugegeben. Um auf Basis des DAAO-Systems (Hättasch et al, 2009) Sprosse mit *dao1* zu selektieren, wurden dem M8-Medium 20 mM D-Ser zugesetzt. Die Selektion von Sprossen mit *nptII* erfolgte durch die Zugabe von 100 mg/l Km zum M8-Medium. Die Auswertung fand nach 28 d auf selektivem Medium statt. Jegliche Versuche dieser Art erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.20 Schorfresistenztestung

Die Schorfresistenztestung von Linien/Sorten wurde im Gewächshaus durch künstliche Schorfinokulation an mikroveredelten, aktiv wachsenden Apfelpflanzen durchgeführt. Für die Inokulation kamen die Einsporisolate 104 (Rasse 1) bzw.

D42a (Rasse 6) von *V. inaequalis* zum Einsatz, von denen im Vorfeld mit Leitungswasser Konidiensuspensionen mit einer Dichte von ca. 3×10^5 Konidien/ml hergestellt wurden. Die Konidien wurden entweder durch Abwaschen von auf Malzextraktagar angezogenen Isolaten (18 °C, Dunkelheit) oder durch Abwaschen von eingefrorenen Blättern aus vorherigen Schorfresistenztestungen gewonnen. Die Keimungsrate der hergestellten Konidiensuspensionen wurde nach 24 h Inkubation bei RT ausgezählt. Die Inokulation der randomisierten Pflanzen erfolgte durch vollständiges Besprühen der Triebspitze, inklusive der drei jüngsten vollständig entfalteten Blätter (Ober- und Unterseite), mit der Konidiensuspension. Um 100 % Luftfeuchte sicherzustellen, wurden die inokulierten Blätter sofort mit einer von innen befeuchteten lichtdurchlässigen Tüte abgedeckt. Die Tüten wurden 3 d nach der Inokulation (dpi, *days past inoculation*) abgenommen. Während des gesamten Schorfresistenztestes herrschte eine relative Luftfeuchte > 80 %, die Temperaturen waren < 23 °C und das Licht wurde auf ein Mindestmaß reduziert sowie direktes Sonnenlicht vermieden. Der Schorfbefall der Blätter wurde entsprechend Chevalier et al (1991) nach den Boniturklassen 0 – keine Symptome; 1 – *pinpoint pits*; 2 – chlorotische Läsionen; 3a – Chlorosen und Nekrosen ohne Sporulation; 3b – Chlorosen und Nekrosen mit leichter Sporulation und 4 – starke Sporulation bewertet. Mit den Boniturnoten 0 bis 3a bewertete Pflanzen wurden als schorfresistent und mit den Boniturnoten 3b bis 4 bewertete Pflanzen wurden als schorfanfällig eingestuft. Die Bonitur erfolgte in den Jahren 2012, 2013 und 2014 zu den Zeitpunkten 30 dpi, 35 dpi bzw. 28 dpi. Pflanzen, die während des Versuches ein reduziertes Wachstum zeigten, wurden vom Experiment ausgeschlossen. Ein Linie/Sorte wurde als anfällig eingestuft, wenn mindestens eine getestete Pflanze anfällige Symptome (Boniturklasse 3b oder 4) zeigte.

2.2.21 Evaluierung der Fruchtfleischfarbe

Die Evaluierung der Fruchteigenschaft „Farbe des Fruchtfleisches“ erfolgte gemäß dem Deskriptor Nr. 53 (1 – weiß; 2 – cremefarben; 3 – gelblich; 4 – grün; 5 – blassrosa; 6 – rötlich) der UPOV Richtlinien für Apfel (UPOV, 2005) und fand im Zeitraum der natürlichen Fruchtreife (August bis Oktober) im Jahr 2012 statt.

2.2.22 Histochemischer GUS-Assay

Zum Nachweis des Proteins β -Glucuronidase in pflanzlichen Geweben wurde ein GUS-Assay durchgeführt. Dafür wurde das Pflanzenmaterial mit GUS-Puffer

bedeckt und für 1 h vakuumfiltriert. Es folgte die Inkubation bei 37 °C ÜN. Anschließend wurde der GUS-Puffer abgegossen und das Pflanzenmaterial durch mehrmaliges Spülen in EtOH:Essigsäure (3:1) (v/v) entfärbt. Das Pflanzenmaterial wurde nach der Entfärbung in ddH₂O gewaschen, worin das Material im Anschluss gelagert werden konnte.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems mittels Monitoringvektor

Für eine genauere Charakterisierung des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems wurden transgene Linien genutzt, welche mit der T-DNA des Monitoringvektors pB-Npt-Hsp-Flp-Gus (Abbildung 1°B, Abschnitt 2.1.4.1) ausgestattet sind (Abschnitt 2.1.5.1; Flp-Gus Linien). Mit dem Ziel die Effektivität der Induktion des Rekombinasesystems zu erhöhen, wurden neue Methoden zur HÜ anhand dieser Linien getestet. Bisher erfolgte die Induktion dieses Rekombinasesystems beim Apfel durch Hitzebehandlung von Sprossen in *in vitro* Kultur (Herzog et al, 2012). Die neuen Methoden der HÜ zeichneten sich durch die Hitzebehandlung von Blättern bzw. Blattexplantaten aus. Die Methoden unterscheiden sich im hitzeübertragenden Medium. Für eine detaillierte Charakterisierung des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems auf molekularer Ebene, wurden anhand der Flp-Gus Linien Expressionsanalysen der T-DNA lokalisierten Gene im Verlauf der Hitzegabe durchgeführt.

3.1.1 Testung neuer Methoden zur Hitzeübertragung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neuen Methoden zur HÜ entwickelt (Abbildung 2; Kap. 2.2.15). Für die Testung der drei Methoden wurden von jeder bereitgestellten Flp-Gus Linie (Abschnitt 2.1.5.1) je 10 Blätter den HÜ „ddH₂O“, „Feuchtekammer“ bzw. „Mediumplatte“ unterzogen. Als Kontrolle wurden je 10 Blätter der Linie T791 zusätzlich den drei HÜ bei RT unterzogen (bezeichnet als T791⁽⁻⁾). Die Methoden wurden anhand der Vitalität der Blätter/Blattexplantate direkt nach der Hitzegabe und anhand der Regeneration an den Explantaten nach der Dunkelphase bewertet (Kap. 2.2.16). Um die Effektivität der Induktion des Rekombinasesystems nach Anwendung der Methoden zu begutachten, wurde ein GUS-Assay an Explantaten mit Regeneration durchgeführt. Dabei zeigte eine Blaufärbung das erfolgreiche Ausschneiden der Rekombinasekassette an (siehe Abbildung 1°B). Die HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ wurden weiterführend evaluiert, indem regenerierte Einzelsprosse aus beiden Methoden mit PCR und GUS-Assay charakterisiert wurden.

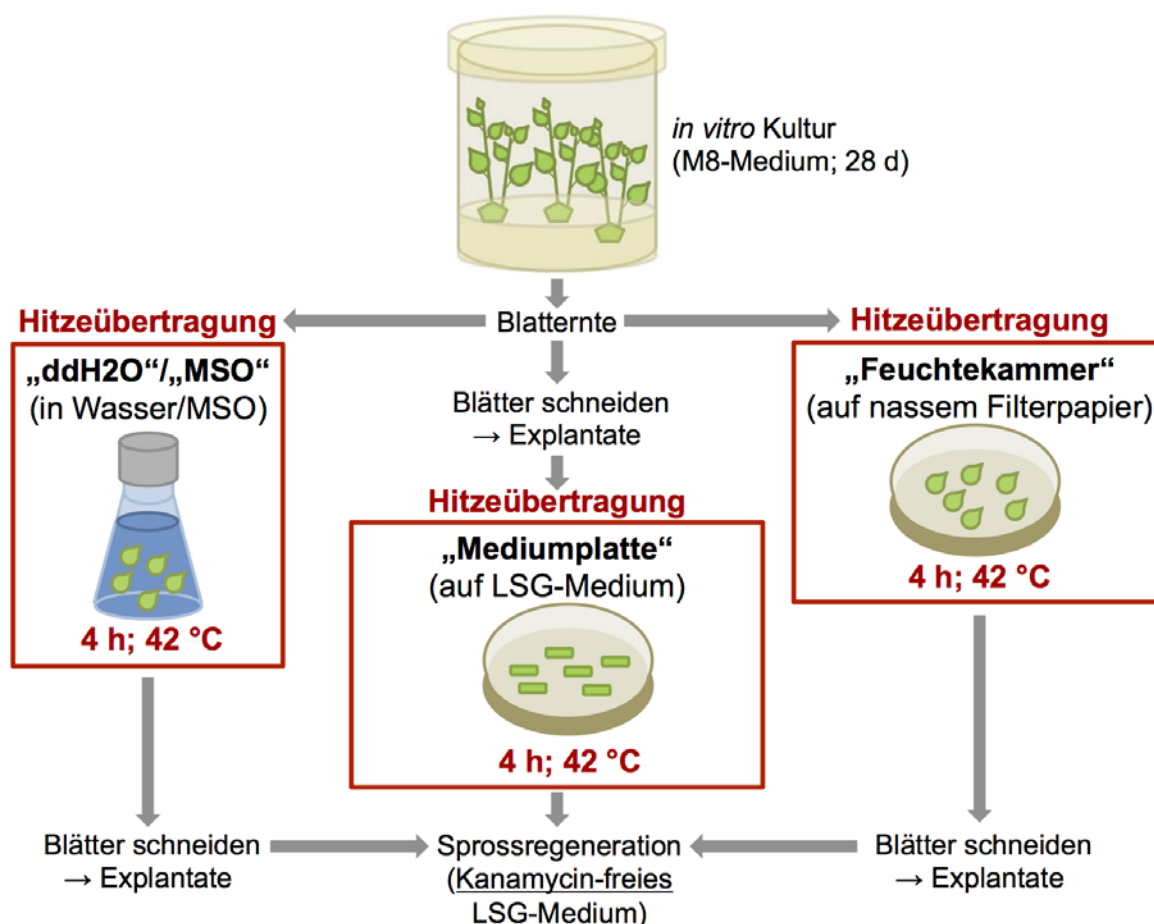


Abbildung 2 Schematisch dargestellter Ablauf der drei getesteten Methoden zur Hitzeübertragung „ddH₂O“/„MSO“, „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“.

3.1.1.1 Bewertung der Vitalität und der Regeneration

Die Vitalität der Blätter/Blattexplantate wurde direkt nach der Hitzegabe im Zuge der HÜ bewertet (Abbildung 3, linke Seite). Nach der Hitzegabe zeigten die Blätter aus der HÜ „Feuchtekammer“ die beste Vitalität. Durchschnittlich waren 84 % der hitzebehandelten Blätter vital (weniger als 25 % nekrotisches Gewebe). Die restlichen Blätter waren semivital (25 % bis 75 % nekrotisches Gewebe), kein Blatt wurde als tot (mehr als 75 % nekrotisches Gewebe) bewertet. Die HÜ „Mediumplatte“ führte zu durchschnittlich 67 % vitalen, 27 % semivitalen und 5 % toten Blattexplantaten nach Hitzegabe. Die schlechteste Blattvitalität war bei der HÜ „ddH₂O“ zu verzeichnen. Nur durchschnittlich 26 % der hitzebehandelten Blätter waren vital, 57 % der Blätter waren semivital und 18 % der Blätter wurden als tot bewertet. Für keine HÜ konnte ein Unterschied in der Vitalität der Blätter im Vergleich zwischen den Linien festgestellt werden. Für alle drei Methoden waren die bei RT behandelten Blätter/Blattexplantate der transgenen Linie T971 (T791⁽⁻⁾, Kontrolle) zu 100 % vital.

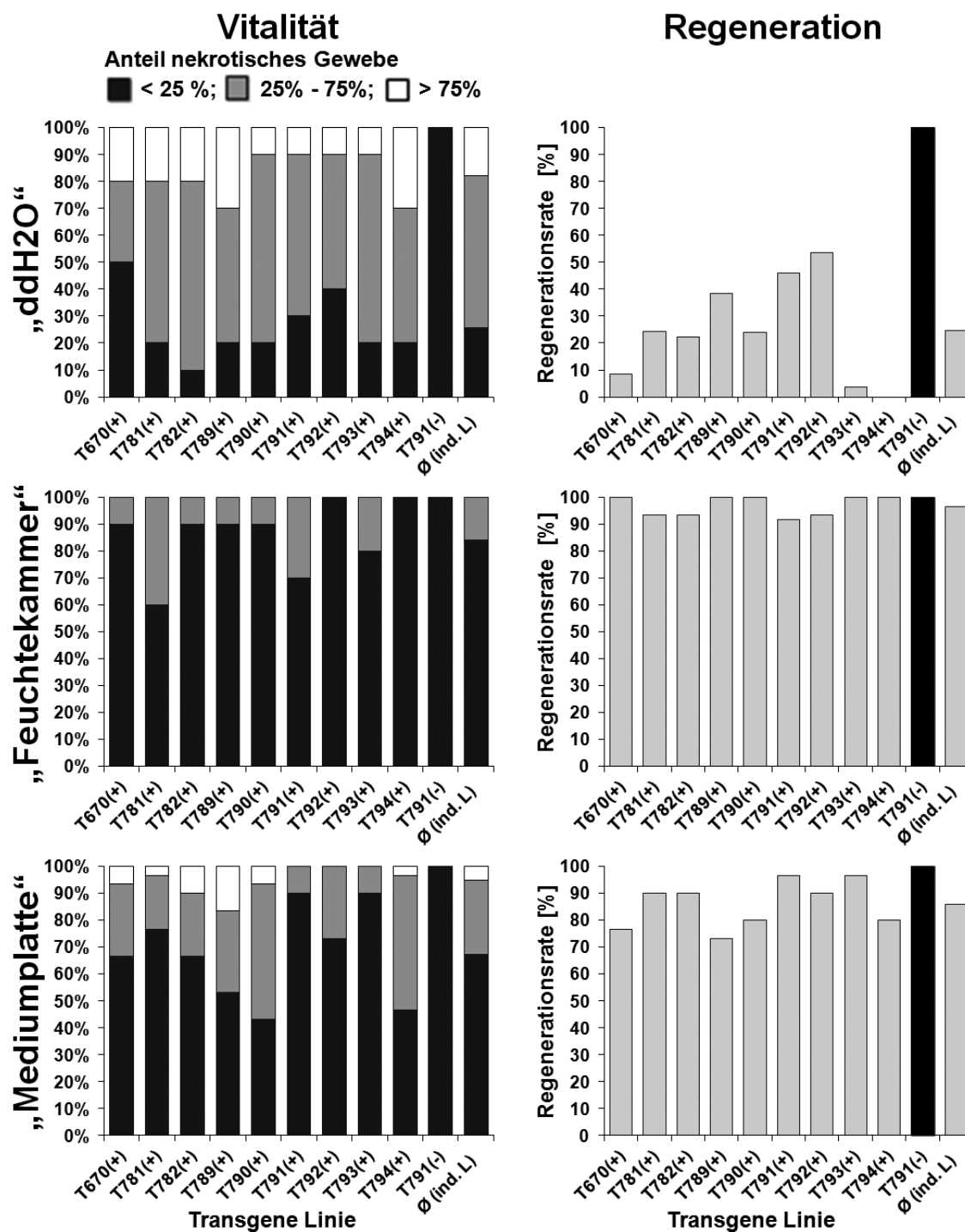


Abbildung 3 Vitalität hitzebehandelter Blätter/Blattexplantate und ihre Regenerationsfähigkeit für die Methoden der Hitzeübertragung „ddH₂O“, „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“. Die Vitalität wurde visuell direkt nach der Hitzegabe bewertet (links), wobei in die Kategorien vital (schwarz), semivital (grau) und tot (weiß) klassifiziert wurde. Die Regeneration wurde nach der Dunkelphase anhand von vorhandener Kallusbildung an den Blattexplantaten bewertet und daraus die Regenerationsrate [%] ((Explantate mit Kallusbildung/Gesamtanzahl der begutachteten Explantate) × 100) berechnet (rechts). T670, T781, T782, T789, T790, T791, T792, T793, T794 – transgene Linien ausgestattet mit dem Monitoringvektor pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; (+) – Hitzebehandlung bei 42 °C; (-) – Hitzebehandlung bei RT (Kontrolle), ind. L. – induzierte Linien. Modifiziert nach Würdig et al (2013). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-013-0376-1> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-013-0376-1>.

Alle hitzeinduzierten Blätter/Blattexplantate wurden entsprechend der Methode der HÜ weiterbehandelt (Kap. 2.2.15; nekrotisches Gewebe wurde nicht entfernt) und die Regenerationsrate nach der Dunkelphase bestimmt (Abbildung 3, rechte Seite). Die beste Regenerationsrate zeigten die Explantate aus der HÜ „Feuchtekammer“; durchschnittlich 96 % der Blattexplantate wiesen Kallusbildung auf. Für die HÜ „Mediumplatte“ und „ddH₂O“ wurde eine geringere Regenerationsrate verzeichnet; hier zeigten durchschnittlich 86 % bzw. 24 % der Blattexplantate Kallusbildung. Die Explantate der Kontrollbehandlung (T791⁽⁻⁾) zeigten für alle drei Methoden eine Regenerationsrate von 100 %. Für die einzelnen HÜ konnte kein Unterschied für die Regenerationsrate im Vergleich zwischen den Linien festgestellt werden. Auffällig war, dass ein geringerer Anteil an vitalen Blättern/Blattexplantaten eine geringe Regenerationsrate zur Folge hatte (siehe HÜ „ddH₂O“ in Abbildung 3).

3.1.1.2 GUS-Assay an Explantaten mit Regeneration

Um die Wirksamkeit der Induktion des Rekombinasesystems durch die Methoden „ddH₂O“, „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ zu beurteilen, wurde ein GUS-Assay an Explantaten aus den drei HÜ (70 d nach der Hitzeinduktion) durchgeführt. Das Assay erfolgte an möglichst drei bis vier Explantaten mit Regeneration pro Linie und Methode (Abbildung 4). Für die Explantate aus der HÜ „ddH₂O“ war die flächendeckendste Blaufärbung dokumentierbar (Abbildung 4 A). Von den Linien T670, T793 und T794 konnte kein oder nur ein Explantat mit Regeneration aus den ursprünglich 30 Blattexplantaten gewonnen und somit getestet werden. Diese Linien zeigten bei der HÜ „ddH₂O“ bereits nach der Dunkelphase eine geringe Regenerationsrate (Abschnitt 3.1.1.1 und Abbildung 3, rechte Seite). Für die Explantate aus den HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ war eine vergleichbare Blaufärbung nach dem GUS-Assay dokumentierbar, die jedoch geringer ausfiel als für die HÜ „ddH₂O“. Für diese beiden Methoden waren die Explantate der Linie T670 am kräftigsten gefärbt, was durch das Vorhandensein von vier T-DNA-Kopien erklärbar war (Abschnitt 2.1.5.1). Bereits sichtbare regenerierte Sprossen waren nach dem Assay entweder einheitlich weiß oder blau gefärbt, wie in Abbildung 4 B deutlich erkennbar ist. Dieses Ergebnis wies auf eine Sprossregeneration aus einzelnen Zellen hin. Die Erzeugung von rekombinanten, genetisch einheitlichen Sprossen sollte durch die Anwendung der drei getesteten Methoden zur HÜ möglich sein.

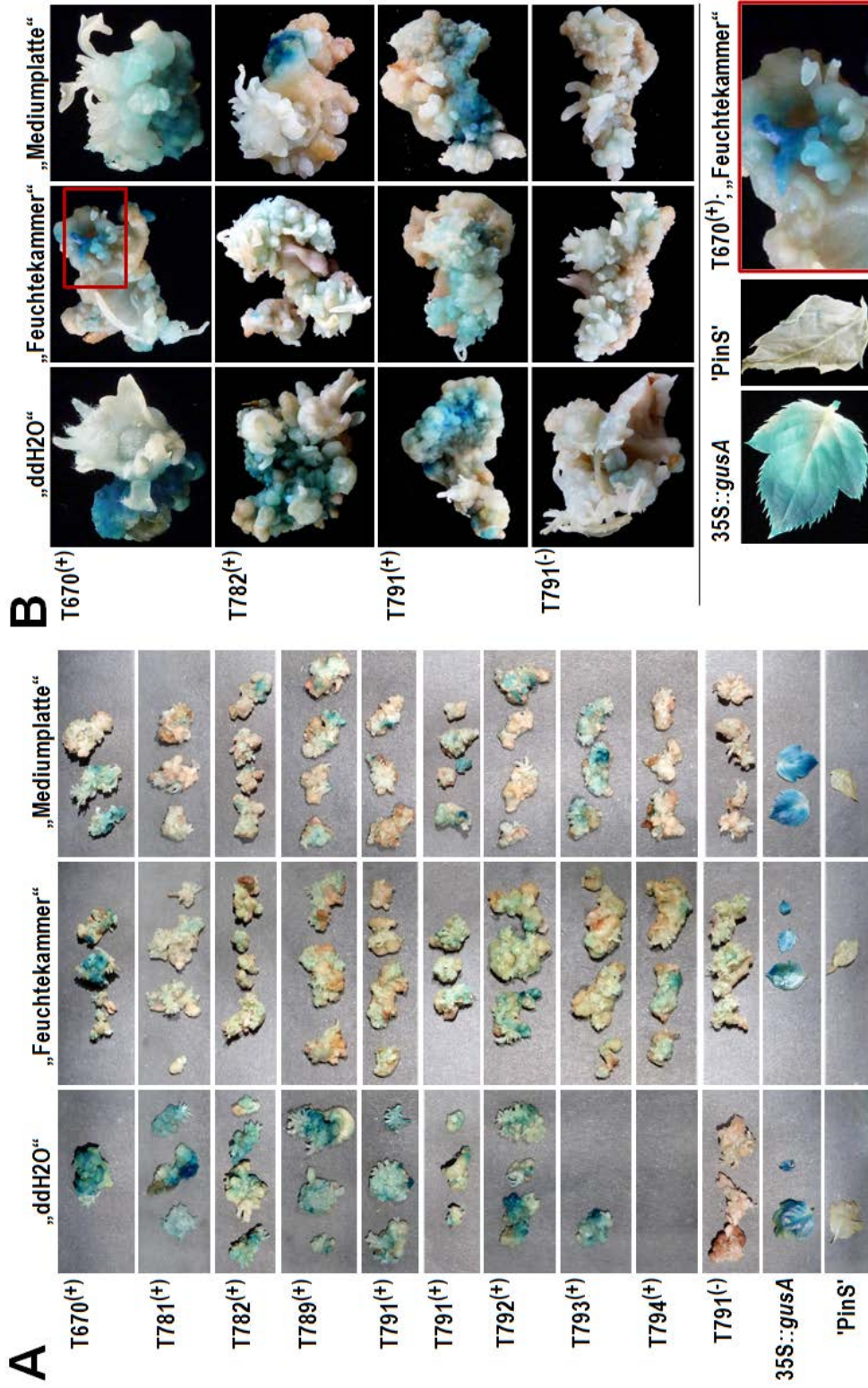


Abbildung 4 GUS-Assay an Explantaten mit Regeneration, entstanden aus hitzebehandelten Blättern/Blattexplantaten im Zuge der Hitzeübertragungen „ddH2O“, „Feuchtekammer“ bzw. „Mediumplatte“, 70 d nach der Hitzebehandlung. **A** Nach Möglichkeit wurden drei bis vier Explantate pro Linie und Behandlung dokumentiert. **B** Einzelaufnahmen ausgewählter Explantate. T670, T781, T782, T789, T790, T791, T792, T793, T794 – Transgene Linien (Flp-Gus Linien) ausgestattet mit dem Monitoringvektor pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; (+) – Hitzebehandlung bei 42 °C; (-) – Hitzebehandlung bei 42 °C; (-) – Negativkontrolle, in vitro Blätter einer transgenen Linie, die gusA konstitutiv exprimiert (Abschnitt 2.1.5.2); 'PinS' – Negativkontrolle, in vitro Blätter des untransformierten Sämlings der Sorte 'Pinova'.

3.1.1.3 Charakterisierung regenerierter Sprossen nach Hitzebehandlung

Für eine weiterführende Beurteilung der HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ wurden regenerierte Einzelsprosse aus diesen zwei Methoden per PCR genauer charakterisiert. Dafür wurden ausschließlich die transgenen Flp-Gus Linien T782 und T791 verwendet, die je eine Kopie der T-DNA aufwiesen (Abschnitt 2.1.5.1). Als Kontrolle wurden zusätzlich Blätter der Linie T791 den beiden HÜ bei RT unterzogen (bezeichnet als T791⁽⁻⁾) und ebenfalls Sprosse aus ihnen regeneriert. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig wiederholt (Wdh). Pro HÜ, Linie/Kontrolle und Wdh wurden jeweils 10 unabhängig regenerierte Einzelsprosse ausgewählt, separiert und eindeutig bezeichnet (Tabelle 1). Für die Untersuchungen wurden die Einzelsprosse vegetativ vermehrt. Insgesamt wurden 180 regenerierte Einzelsprosse charakterisiert, wovon 120 von Blättern nach Hitzebehandlung bei 42 °C und 60 von Blättern nach Hitzebehandlung bei RT (Kontrolle) stammten (Tabelle 1).

Tabelle 1 Übersicht zu den charakterisierten Einzelsprossen aus den Hitzeübertragungen (HÜ) „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“.

	Einzelsprosse					
	HÜ „Feuchtekammer“			HÜ „Mediumplatte“		
	T782 ⁽⁺⁾	T791 ⁽⁺⁾	T791 ⁽⁻⁾	T782 ⁽⁺⁾	T791 ⁽⁺⁾	T791 ⁽⁻⁾
Wdh 1	1 bis 10	1 bis 10	1 bis 10	1 bis 10	1 bis 10	1 bis 10
Wdh 2	11 bis 20	11 bis 20	11 bis 20	11 bis 20	11 bis 20	11 bis 20
Wdh 3	21 bis 30	21 bis 30	21 bis 30	21 bis 30	21 bis 30	21 bis 30
Sprosse [n]	30	30	30	30	30	30

Aus der HÜ, Linienbezeichnung (Linie/Kontrolle) und Sprossnummer ergibt sich eine eindeutige Bezeichnung der regenerierten Einzelsprosse. Wdh – Wiederholung; (+) – Hitzebehandlung bei 42 °C; (-) – Hitzebehandlung bei RT (Kontrolle).

Von allen 180 Einzelsprossen wurde DNA mit dem DNeasy Plant Mini Kit isoliert und ihre Güte über den positiven PCR-Nachweis des Haushaltgens *EF1-α* belegt (Daten nicht gezeigt). Um den Zustand der Rekombinasekassette in den Sprossen zu charakterisieren, wurden anschließend alle Sprosse per PCR auf die Präsenz des *nptII* Gens hin getestet (Daten nicht gezeigt), welches innerhalb der Rekombinasekassette lokalisiert ist (Vergleich Abbildung 1°B). Alle 60 untersuchten Einzelsprosse aus den Kontrollbehandlungen (T791⁽⁻⁾), alle 60 untersuchten Einzelsprosse die aus der HÜ „Mediumplatte“ (T782⁽⁺⁾ und T791⁽⁺⁾) und 59 von 60 untersuchten Einzelsprossen aus der HÜ „Feuchtekammer“ (T782⁽⁺⁾ und T791⁽⁺⁾) wurden positiv auf *nptII* getestet. Für einen von 60 untersuchten Einzelsprossen aus der HÜ „Feuchtekammer“ konnte *nptII* nicht

nachgewiesen werden (Sprossbezeichnung: T791⁽⁺⁾-5 (FK); FK = „Feuchtekammer“). Die Abwesenheit von *nptII* im Einzelspross T791⁽⁺⁾-5 (FK), welcher aus der ersten Wdh stammte, war ein Hinweis auf ein erfolgreiches Flp vermitteltes Rekombinationsereignis für diesen Spross; er galt somit als putativ Markergen-frei. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde der Spross T791⁽⁺⁾-5 (FK), zusammen mit anderen Einzelsprossen aus Wdh 1, erneut per PCR auf das Vorhandensein der Transgene *nptII* und *flp* hin untersucht (beide innerhalb der Rekombinasekassette lokalisiert, Vergleich Abbildung 1°B). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5°A dargestellt. Mit Ausnahme des putativ Markergen-freien Einzelsprosses T791⁽⁺⁾-5 (FK) und des untransformierten Sämlings 'PinS' konnten die Transgene *nptII* und *flp* für alle ausgewählten regenerierten Einzelsprosse aus den HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ nachgewiesen werden (Abbildung 5 A). Für den Spross T791⁽⁺⁾-5 (FK) wurde eine erfolgreiche Rekombination angenommen, wodurch der *CaMV* 35S Promotor in räumliche Nähe zum *gusA* Gen gelangte (vgl. Abbildung 1°B). Um zu prüfen, ob β -Glucuronidase durch diesen Spross gebildet wird, wurden die ausgewählten Einzelsprosse einem GUS-Assay unterzogen (Abbildung 5°B). Für den Einzelspross T791⁽⁺⁾-5 (FK) und für einen Spross der Kontrolllinie 35S::*gusA* konnte β -Glucuronidase in allen Geweben anhand der Blaufärbung nachgewiesen werden. Alle anderen untersuchten Sprosse zeigten keine Blaufärbung. Dieses Resultat belegte die erfolgreiche Entfernung der Rekombinasekassette aus dem Genom des Sprosses T791⁽⁺⁾-5 (FK) und bestätigte ihn als Markergen-frei. Die HÜ „Feuchtekammer“ ist somit nachweislich geeignet, um über das hitzeinduzierbare Flp/*FRT* Rekombinasesystem genetisch einheitliche, Markergen-freie Sprosse zu produzieren.

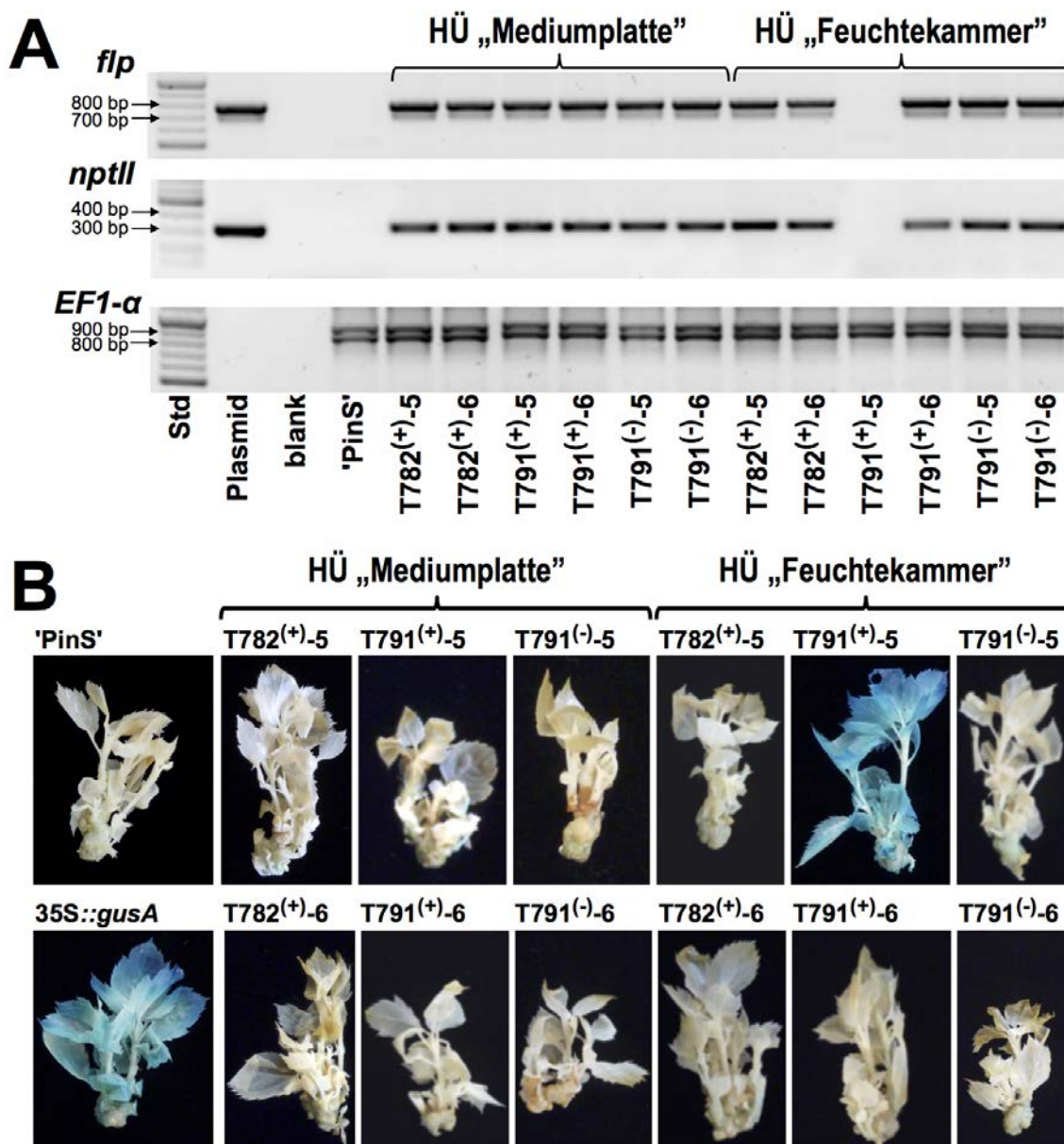


Abbildung 5 Charakterisierung ausgewählter regenerierter Einzelsprosse aus den Experimenten zur Hitzeübertragung (HÜ) „Mediumplatte“ und „Feuchtekammer“. **A** PCR-basierter Nachweis der Gene *flp*, *nptII* und *EF1-α* unter Verwendung der Primerkombinationen FlpF/ FlpR, NptIIIF1/ NptIIR1 bzw. EF1αF/ EF1αR. **B** GUS-Assay. Std – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); Plasmid – Positivkontrolle, Plasmid-DNA des Transformationsvektors pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; blank – Negativkontrolle, ddH₂O; 'PinS' – untransformierter Sämling der Sorte 'Pinova'; 35S::*gusA* – transgene Linie, die *gusA* konstitutiv exprimiert; (+) – Hitzebehandlung bei 42 °C; (-) – Hitzebehandlung bei Raumtemperatur (Kontrolle). Modifiziert nach Würdig et al (2013). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-013-0376-1> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-013-0376-1>.

3.1.2 Expressionsanalysen bei Hitzegabe

Für eine genauere molekulare Charakterisierung des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems im Verlauf einer Hitzebehandlung wurden zwei ZR mit ZP für Expressionsanalysen entworfen (Abbildung 6).

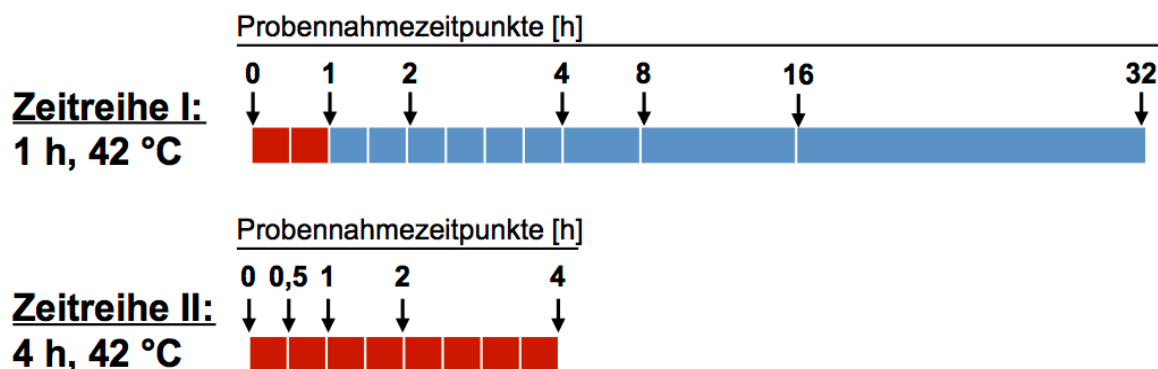


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Zeitreihen I und II. Die Probennahmezeitpunkte [h] sind angegeben. Der Zeitpunkt 0 h stellt den Beginn der Hitzebehandlung dar. Für beide Zeitreihen erfolgte die Hitzebehandlung an *in vitro* Blättern in Feuchtekammern, analog zur Methode der Hitzeübertragung „Feuchtekammer“. rot – Hitzeabgabe (42 °C); blau – 23 °C.

Beide ZR wurden an *in vitro* Blättern der transgenen Flp-Gus Apfelinien T670, T782 und T791 (vgl. Abschnitt 2.1.5.1) sowie an *in vitro* Blättern des untransformierten Sämlings 'PinS' durchgeführt, wobei die Hitzeabgabe entsprechend der HÜ „Feuchtekammer“ stattfand (Kap. 2.2.17). Als Kontrolle wurden *in vitro* Blätter der Linie T791 zusätzlich bei RT (23 °C) behandelt, im Weiteren als nicht induziert (ni) bezeichnet. Für alle ZP wurde die mRNA-Expression der T-DNA lokalisierten Gene (*flp*, *nptII* und *gusA*) mittel RT-PCR untersucht (Abbildung 7). Die einwandfreie Qualität aller cDNA-Proben wurde über die Amplifikation des *EF1- α* spezifischen cDNA-Produktes von 700 bp belegt (Abbildung 7). Für den untransformierten Sämling 'PinS' wurde in beiden ZR erwartungsgemäß keine Expression der T-DNA lokalisierten Gene *flp*, *nptII* und *gusA* detektiert (Abbildung 7).

In beiden ZR wurde für fast alle ZP der Kontrollbehandlung (T791, ni) und für nahezu alle 0 h ZP keine *flp* Expression nachgewiesen. Ausnahmen bildeten die ZP 16 h und 32 h der Kontrollbehandlung der ZR I und der ZP 0 h für die Linie T670 der ZR II, für welche eine leichte *flp* Expression detektierbar war (Abbildung 7). In ZR I (Hitzeabgabe für 1 h) zeigten die hitzebehandelten Linien zum ZP 1 h die stärkste *flp* Expression (Abbildung 7 A). Für die nachfolgenden ZP der ZR I (2, 4, 8, 16 und 32 h) erfolgte die Probennahme nach der Hitzeabgabe. Für all diese ZP konnte eine chronologisch abnehmende *flp* Expression nachgewiesen werden. Für Linie T791 war zum ZP 32 h keine *flp* Expression detektierbar. In ZR II (kontinuierliche Hitzeabgabe über 4 h) konnte eine *flp* Expression für alle Linien nach 30 min Hitzebehandlung nachgewiesen werden (Abbildung 7 B). Die *flp* Expression erwies sich für alle nachfolgenden ZP als recht stark.

Bei ZR II war für die Linien T782 und T791 die Tendenz zu einem Maximum in der *flp* Expression zum ZP 2 h erkennbar, gefolgt von einer leichten Abnahme der *flp* Expression zum ZP 4 h. In der *flp* spezifischen RT-PCR wurden neben dem *flp* cDNA charakteristischen PCR-Produkt von 575 bp (Abbildung 7, markiert mit a) zwei größere PCR-Fragmente (Abbildung 7, markiert mit b und c) für die transgenen Linien amplifiziert. Dies war meist nach Hitzebehandlung und insbesondere für die Linie T670 der Fall. Eines dieser Fragmente (Abbildung 7, markiert mit b) zeigte eine vergleichbare Größe zum Produkt der Kontrollproben DNA T782 und Plasmid, welche ein PCR-Produkt von 774 bp amplifizierten. Das zweite zusätzliche PCR-Fragment zeigte eine Größe von ca. 950 bp (Abbildung 7, markiert mit c). Alle Versuche diese beiden zusätzlichen Fragmente für eine Sequenzierung zu klonieren schlugen fehl (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von *nptII* wurde für alle transgenen Linien (Hitzebehandlung und Kontrollbehandlung) in beiden ZR zu allen ZP nachgewiesen (Abbildung 7).

Eine *gusA* Expression wurde, anders als erwartet, sowohl für die hitzebehandelten Linien als auch für die Kontrollbehandlung (T791, ni) in beiden ZR zu fast allen ZP nachweisen (Abbildung 7). Innerhalb einer Linie und ZR war kein klarer Trend bezüglich der *gusA* Expressionsstärke erkennbar. Um eine mögliche DNA-Verunreinigung der RNA-Proben (trotz DNase-Behandlung) als Ursache für dieses Ergebnis auszuschließen, wurde für alle 0 h ZP nochmals eine *gusA* spezifische PCR an den DNase-behandelten RNA-Proben und an den dazugehörigen cDNA-Proben durchgeführt (Abbildung 8).

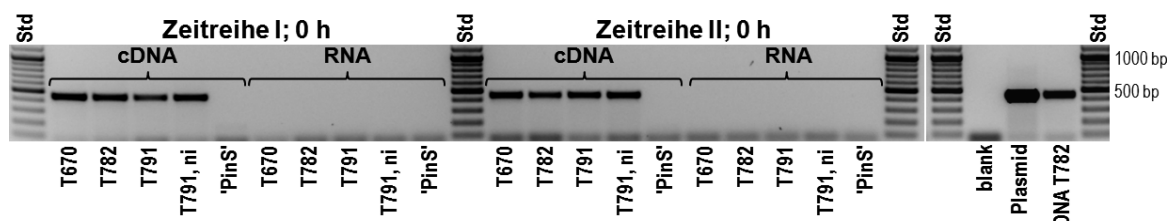


Abbildung 8 *GusA* spezifische PCR (Primerkombination GUSRTF/ GUSRTR) für den Zeitpunkt 0 h. Die DNase-behandelten RNA-Proben (RNA) und die dazugehörigen cDNA-Proben (cDNA) beider Zeitreihen wurden als Template verwendet. Std – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); ni – nicht induziert; 'PinS' – untransformierter Sämling der Sorte 'Pinova'; blank – Negativkontrolle, ddH₂O; Plasmid – Positivkontrolle, Plasmid-DNA des Transformationsvektors p9-Npt-Hsp-Flp-Gus. Modifiziert nach Würdig et al (2013). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-013-0376-1> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-013-0376-1>.

Die *gusA* Expressionsergebnisse der ZR I und II (Abbildung 7) wurden bestätigt. Zum ZP 0 h war eine *gusA* Expression für alle transgenen Linien (Hitzebehandlung und Kontrollbehandlung) nachweisbar. Eine DNA-Kontamination der RNA-Proben konnte als Ursache für das amplifizierte Fragment ausgeschlossen werden.

3.1.2.1 Untersuchung der Ausgangslinien auf Chimerität

Um eine Chimerität der Ausgangslinien T670, T782 und T791 als mögliche Ursache für die Ergebnisse der Expressionsanalysen (Kap. 3.1.2) zu überprüfen, wurden verschiedene PCR-Experimente und ein GUS-Assay an diesen Linien durchgeführt (Abbildung 9). Als Kontrollen dienten der Markergen-freien Spross T791⁽⁺⁾-5 (FK) und der untransformierte Sämling 'PinS'.

Als Erstes wurde die Präsenz und die Expression der T-DNA lokalisierten Gene *nptII*, *flp* und *gusA* mittels PCR bzw. RT-PCR untersucht (Abbildung 9 A). Für die Ausgangslinien T670, T782 und T791 konnte das Vorhandensein der T-DNA lokalisierten Gene *nptII*, *flp* und *gusA* belegt werden. Für den Spross T791⁽⁺⁾-5 (FK) war nur das *gusA* Gen nachweisbar und für 'PinS' konnte kein T-DNA lokalisiertes Gen nachgewiesen werden. Für alle Ausgangslinien war *nptII* und *gusA* mRNA-Expression nachweisbar. Im Gegensatz dazu war für keine Ausgangslinie *flp* mRNA-Expression nachweisbar. Für den Spross T791⁽⁺⁾-5 (FK) war nur *gusA* mRNA-Expression belegbar. Für 'PinS' konnte keine Expression von T-DNA lokalisierten Genen nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde eine Rekombinasekassette überspannende PCR unter Verwendung der Primerkombination 35SF/ GUSR durchgeführt (Abbildung 9 B, vgl. Abbildung 1°B). Für die Linien T670, T782 und T791 wurde einzig ein ca. 4,5 kb großes PCR-Produkt amplifiziert, welches dem erwarteten PCR-Produkt von 4410 bp bei vorhandener Rekombinasekassette entsprach. Für den Markergen-freien Spross T791⁽⁺⁾-5 (FK) wurde nur ein einzelnes, deutlich kleineres PCR-Fragment (ca. 1,2 kb) amplifiziert, welches dem errechneten PCR-Produkt von 1176 bp nach Ausschnitt der Rekombinasekassette entsprach.

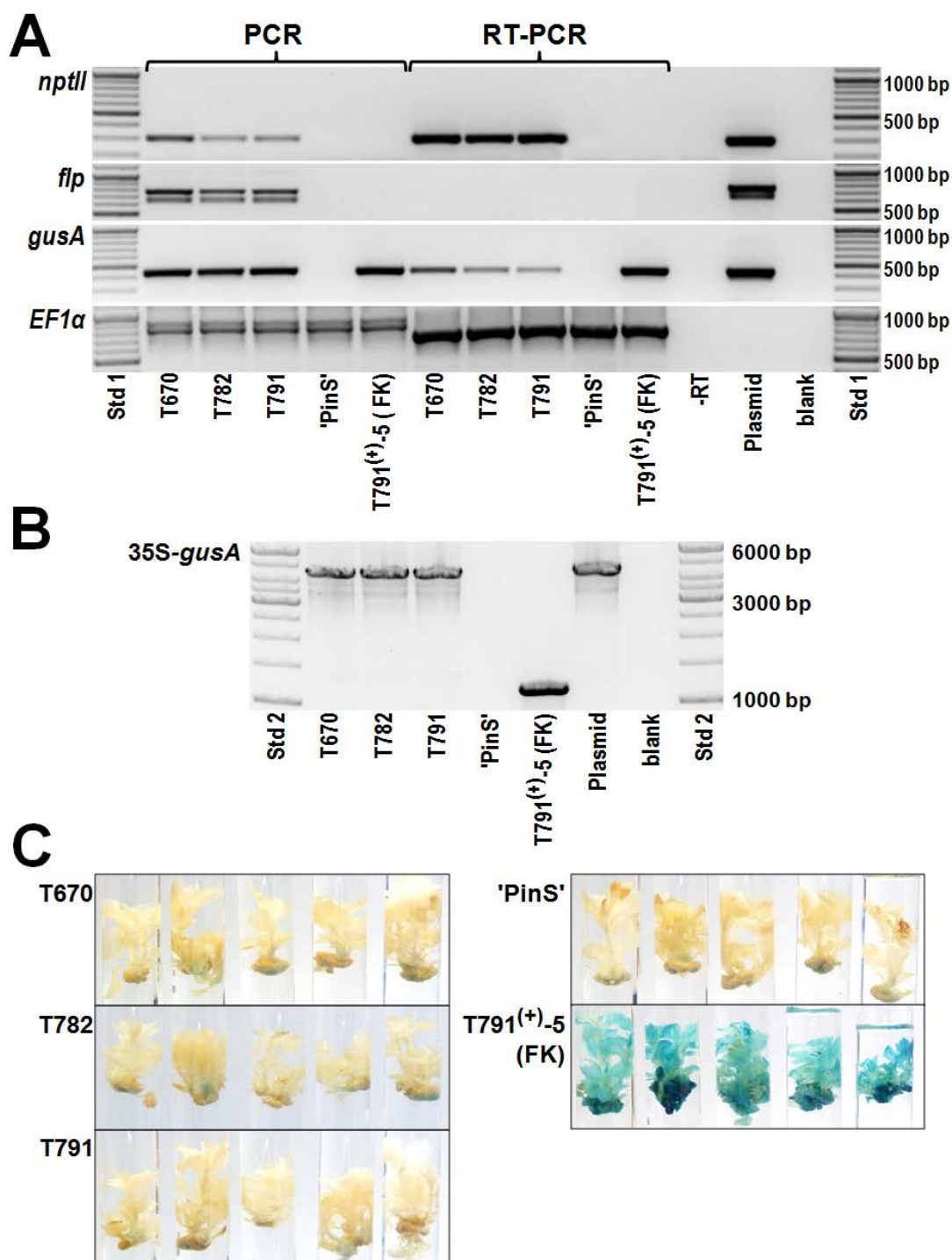


Abbildung 9 Untersuchungen an ausgewählten Flp-Gus Linien. Als Kontrollen dienen der untransformierte Sämling 'PinS' und der Markergen-freie Spross T791⁽⁺⁾-5 (FK). **A** Untersuchung der Präsenz (PCR) und Expression (RT-PCR) der T-DNA lokalisierten Gene *flp*, *nptII* und *gusA* und des Haushaltgens *EF1α* unter Verwendung der Primerkombinationen FlpF/ FlpR, NptIIF1/ NptIIR1, GUSRTF/ GUSRTR bzw. EF1αF/ EF1αR. **B** Rekombinasekassette überspannende PCR unter Verwendung der Primerkombination 35SF/ GUSR. **C** GUS-Assay an Sprossen. Std 1/Std 2 – GeneRuler 100 bp Plus/1 kp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); -RT – Negativkontrolle, ddH₂O wurde statt Reverse Transkriptase für reverse Transkription verwendet; Plasmid – Positivkontrolle, Plasmid-DNA des Vektors pB-Npt-Hsp-Flp-Gus; blank – Negativkontrolle, ddH₂O; 'PinS' – untransformierter Sämling der Sorte 'Pinova'; T670, T782, T791 – transgene Flp-Gus Ausgangslinien; T791⁽⁺⁾-5 (FK) – Markergen-freier Spross aus der Methode zur Hitzeübertragung „Feuchtekammer“ (Abschnitt 3.1.1.3).

Um zu verifizieren, ob das detektierte *gusA* Transkript auch in funktioneller β -Glucuronidase resultierte, wurde ein GUS-Assay an Sprossen der Ausgangslinien durchgeführt (Abbildung 9 C). Für keine der drei untersuchten Linien konnte eine Blaufärbung der Sprosse nachgewiesen werden. Eine leichte Blaufärbung der Sprosskalli war nach dem GUS-Assay sichtbar, welche allerdings auch für den Sprosskalli des untransformierten Sämlings 'PinS' zu sehen war. Folglich war β -Glucuronidase in den Ausgangslinien nicht vorhanden.

3.1.3 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das hitzeinduzierbare Flp/*FRT* Rekombinasesystem anhand transgener Apfelinien (Flp-Gus Linien), welche mit dem Monitoringvektor pB-Npt-Hsp-Flp-Gus (Abbildung 1 B) ausgestattet sind, fortführend etabliert und molekular genauer charakterisiert. Mit dem Ziel die Effektivität der Induktion des Rekombinasesystems zu steigern, wurden drei neue Methoden zur Hitzeübertragung (HÜ) getestet (Abbildung 2). Dabei erfolgte die Hitzebehandlung an abgetrennten Blättern aus *in vitro* Kultur, wobei die hitzeübertragenden Medien Flüssigkeit (HÜ „ddH₂O“/„MSO“), 100 % Luftfeuchte (HÜ „Feuchtekammer“) und festes Nährmedium (HÜ „Mediumplatte“) waren. Die Induktion des Rekombinasesystems war für alle drei HÜ erfolgreich. Die beste Induktion des Rekombinasesystems wurde durch die HÜ „ddH₂O“ erreicht (Abbildung 4). Die Methode HÜ „ddH₂O“ führte allerdings auch zu einer massiven Schädigung des Blattgewebes. Die besten Überlebensraten zeigten die hitzebehandelten Blätter nach den HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ (Abbildung 3). Die Erzeugung eines Markergen-freien Sprosses gelang mit der HÜ „Feuchtekammer“ (Abbildung 5). Das hitzeinduzierbare Rekombinasesystem wurde im Verlauf der Hitzegabe molekular genauer charakterisiert, indem die Expression der T-DNA lokalisierten Gene untersucht wurde (Abbildung 7). Eine Hitzegabe von 42 °C für 30 min war ausreichend, um die Transkription des Rekombinasegens *flp* zu aktivieren. Auch 31 h nach der Hitzebehandlung war noch *flp* mRNA nachweisbar. Bei einer durchgehenden Hitzegabe über 4 h blieb das *flp* mRNA Transkriptlevel relativ hoch. Mehrere Ergebnisse ließen auf eine Induktion des Rekombinasesystems durch weitere Faktoren (neben Hitze) schließen. Ob dies eine Rekombination zur Folge hatte, konnte nicht eindeutig belegt werden (Abschnitt 3.1.2.1).

3.2 Erzeugung cisgener schorfresistenter Apfelsorten mit einem hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystem

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch einen cisgenetischen Ansatz verschiedene Apfelsorten mit dem Schorfresistenzgen *Rvi6* ausgestattet werden. Dafür wurde der Transformationsvektor p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2 verwendet (Abbildung 1 C). Dieser Vektor ist nach dem Prinzip der *Clean Vector* Technologie aufgebaut und basiert auf einem hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystem.

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung transgener Linien

3.2.1.1 Pflanzentransformation und Etablierung transgener Linien

Für jede Apfelsorte wurden drei bis sechs Transformationsexperimente mit dem Vektor p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2 (Abbildung 1 C) unter Verwendung von *A. tumefaciens* durchgeführt (Tabelle 2). Von jedem erzeugten aktiv wachsenden Regenerat wurde jeweils ein Einzelspross per PCR auf die T-DNA lokalisierten Gene des Vektors p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2 getestet (Abbildung 10). Die positive *EF1- α* spezifische PCR belegte die erfolgreiche Isolation intakter gDNA. Für alle getesteten Einzelsprosse konnten alle T-DNA lokalisierten Gene (*nptII*, *dao1*, *flp* und *Rvi6*) nachgewiesen werden, wodurch auf einen erfolgreichen Transfer der T-DNA in das pflanzliche Genom dieser Sprosse geschlossen wurde. Für keine untransformierte Sorte waren die T-DNA lokalisierten Gene detektierbar. Die *Rvi6* spezifische PCR (Primer: RT1for/ RT2rev) amplifizierte neben dem genspezifischen Produkt von 856 bp meist ein weiteres unspezifisches Produkt von ca. 1050 bp. Dieses Produkt wurde bereits durch Vanblaere et al (2011) beschrieben. Die positiv getesteten Einzelsprosse wurden zu transgenen Apfellinien etabliert und erhielten eine eindeutige Liniennummer. Insgesamt wurden 22 Linien gewonnen (Tabelle 2). Für vier ('Brookfield Baigent', 'Mitchgla', 'Novajo' und 'Pinova') der sieben transformierten Apfelsorten konnten Linien erzeugt werden, wobei es sich bei 'Brookfield Baigent' um eine Mutante der Sorte 'Royal Gala' ('Gala' Mutante) und bei 'Mitchgla' um eine Mutante der Sorte 'Gala' handelt. Die Transformationseffizienz für die einzelnen Sorten lag zwischen 0,0 und 0,4 %.

Tabelle 2 Übersicht den den durchgeführten Transformationsexperimente mit dem Vektor p9-Dao1-FLPi-HerVf2 und den daraus resultierten transgenen Apfelslinien. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Apfelsorte (Genetischer Ursprung)	Transformationen [n]	Infizierte Blattexplantate [n]	Regenerate [n]	Transgene Linien		Transformations- effizienz* [%]
				[n]	Bezeichnung	
'Brookfield Baigent' ('Royal Gala' Mutante)	3	1980	103	8	M899; M902; M903; M942; M944; M946; M947; M948	0,40
'Kanzi' ('Gala' x 'Braeburn')	4	2640	2	keine	-	0
'Mariri Red' ('Braeburn' Mutante)	6	3960	1	keine	-	0
'Mitchgla' ('Gala' Mutante)	4	2640	261	4	M853; M854; M877; M897	0,15
'Novajo' ('Jonagold' Mutante)	6	3960	37	6	M852; M900; M901; M941; M943; M945	0,15
'Pinova' ('Golden Delicious' x 'Clivia')	3	1980	67	4	M878; M879; M896; M898	0,20
'Red Jonaprince' ('Jonagold' Mutante)	6	3960	15	keine	-	0

*Transformationseffizienz [%] = (Anzahl der erzeugten Linien/Anzahl der infizierten Blattexplantate) x 100

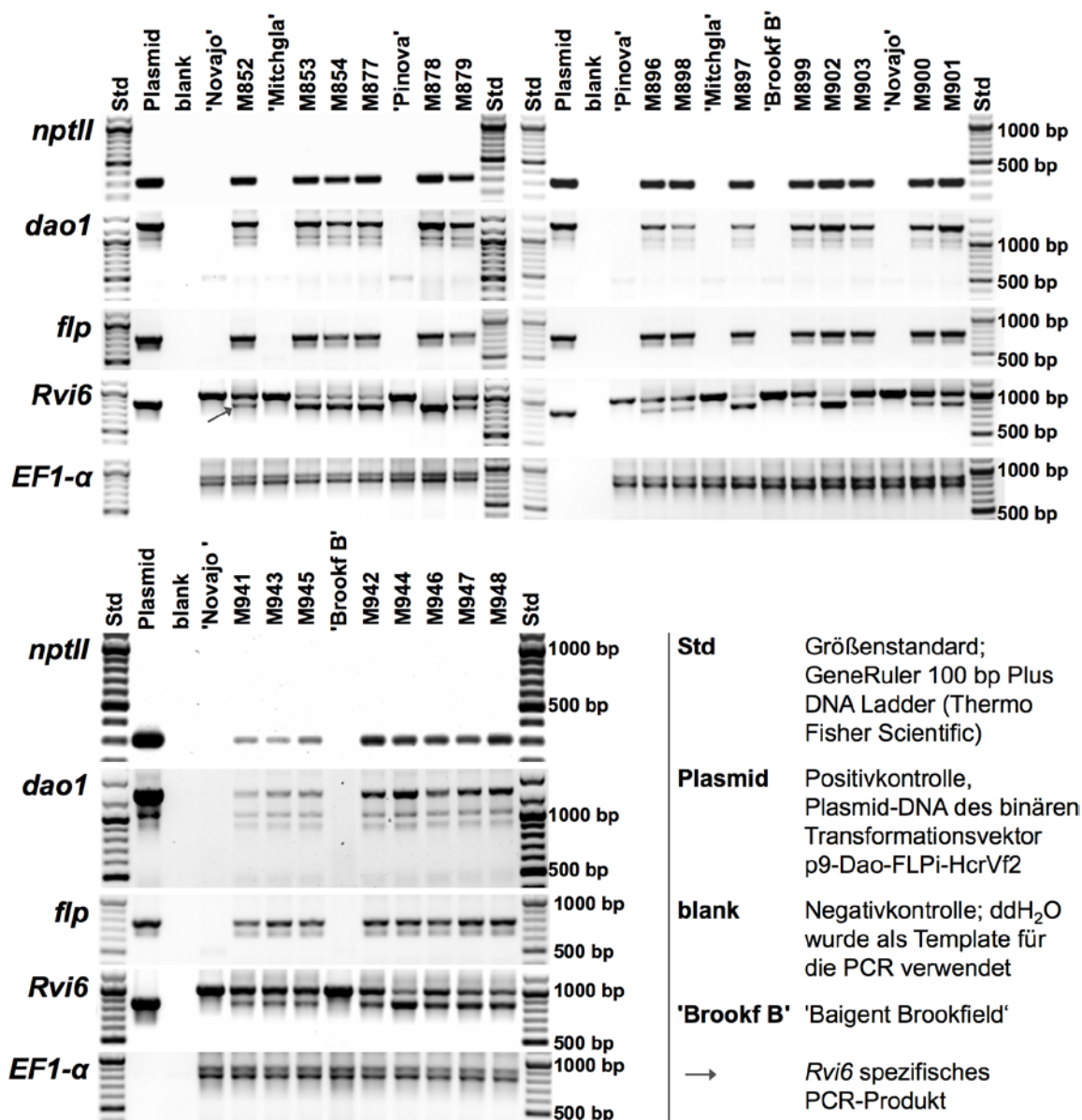


Abbildung 10 Nachweis T-DNA lokalisierter Gene in Einzelsprossen aktiv wachsender Regenerate aus den Transformationsexperimenten mit dem Vektor p9-Dao-FLPi-HcrVf2. Die Detektion der Gene *nptII*, *dao1*, *flp*, *Rvi6* und des Haushaltgens *EF1-α* erfolgte unter Verwendung der Primerkombinationen NptIIF1/NptIIR1, dao1F1/dao1R1, FlpF/FlpR, RT1for/RT2rev bzw. EF1αF/EF1αR. 'Novajo', 'Mitchgla', 'Pinova', 'Brookf B' – Negativkontrollen, untransformierte Apfelsorten. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

3.2.1.2 Anzahl der T-DNA-Integrationsorte

Um die Anzahl der T-DNA-Integrationsorte für die transgenen Apfelinien sicher zu bestimmen, wurden für jede Linie zwei unabhängige Southern Blot Experimente durchgeführt. Die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme (*Bam*HI und *Bsp*TI) sowie der Hybridisierungsort der verwendeten *nptII* spezifischen Sonde innerhalb der T-DNA ist in Abbildung 1 C dargestellt. Für die einzelnen Linien

konnten ein bis vier T-DNA-Integrationsorte detektiert werden (Abbildung 11; Tabelle 3). Für die Linie M946 von der Sorte 'Brookfield Baigent' sowie für die Linien M852 und M941 von der Sorte 'Novajo' als auch für die Linien M879, M896 und M898 von der Sorte 'Pinova' wurde nur ein einzelner T-DNA-Integrationsort detektiert.

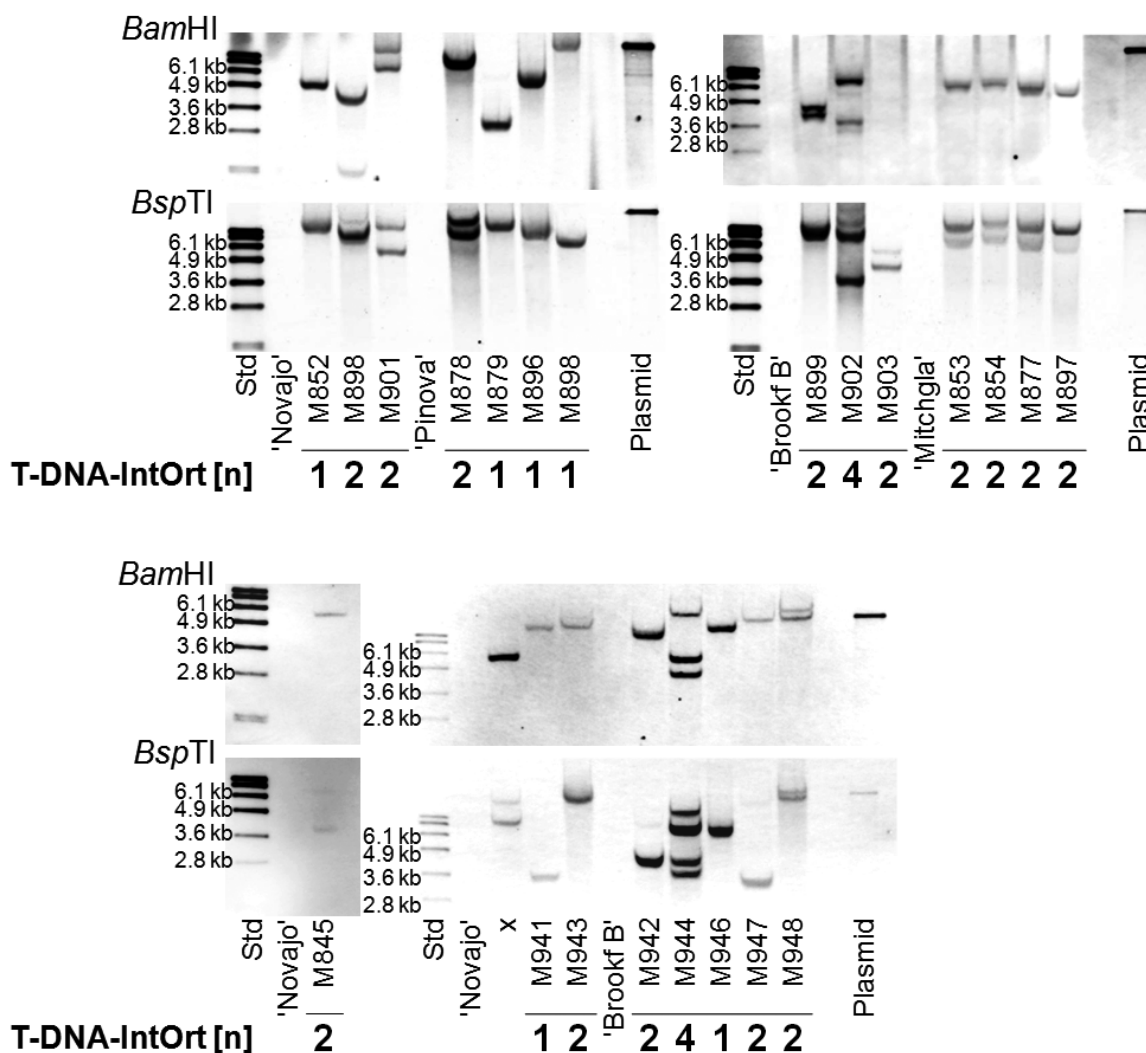


Abbildung 11 Detektion der Anzahl der T-DNA-Insertionsorte in den transgenen Apfelinien durch Southern Blot Analysen. Pro Linie wurden zwei unabhängige Southern Blots durchgeführt, wobei die gDNA einmal mit *Bam*HI und einmal mit *Bsp*TI verdaut wurde. Beide Blots wurden mit einer *nptII* spezifischen Sonde hybridisiert. Die Anzahl der detektierten T-DNA-Integrationsorte für die Linien ist angegeben. T-DNA-IntOrt – T-DNA-Integrationsort; 'Brookf B' – 'Brookfield Baigent'; Std – Standard, DNA Molecular Weight Marker VII, Digoxigenin-markiert (Roche Diagnostics); x – falsch geladene Probe; 'Novajo', 'Mitchgla', 'Pinova', 'Brookf B' – Negativkontrollen, untransformierte Apfelsorten; Plasmid – Positivkontrolle, verdaute Plasmid-DNA des Vektors p9-*Dao*-FLPi-HcrVf2. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

3.2.1.3 Genexpressionsanalysen (RT-PCR)

Die qualitative Expression der T-DNA transferierten Gene *nptII*, *dao1*, *flp* und *Rvi6* sowie vom Haushaltsgen *EF1- α* wurde für alle transgenen Apfelinien an vier Wochen altem *in vitro* Blattmaterial mittels RT-PCR untersucht (Abbildung 12).

Die erfolgreiche reverse Transkription der RNA in cDNA und die Abwesenheit von gDNA in den Proben wurde durch ein einzelnes 700 bp großes RT-PCR-Produkt unter Verwendung der *EF1- α* spezifischen Primer EF1 α F/ EF1 α R belegt. Die mRNA-Expression der T-DNA transferierten Gene *nptII*, *dao1* und *Rvi6* konnte für alle transgenen Linien gezeigt werden. Für die Untersuchung der *Rvi6* mRNA-Expression wurden die genspezifischen Primer Vfa2-F/ Vfa2-R genutzt. Die Intensität des amplifizierten *Rvi6* spezifischen Produktes schien zwischen den Linien zu variieren. Im verwendeten Vektor wird die Expression des Schorfresistenzgens *Rvi6* durch einen definierten Abschnitt seiner endogenen Promotorsequenz reguliert. Die Expressionsstärke der Gene *nptII* und *dao1* war für alle Linien vergleichbar, beide Transgene werden im Vektor durch einzelne *CaMV* 35S Promotoren gesteuert. Für keine transgene Linie konnte *flp* mRNA-Expression detektiert werden. Für die transgenen Linien wurde folglich der *flp* Gen regulierende, Hitzeschock induzierbare Promotor (HSP) als inaktiv eingestuft. Kleinere Mengen *flp* Transkript konnten mit der verwendeten Methode jedoch nicht ausgeschlossen werden. Sowohl die *flp* als auch die *dao1* genkodierende Sequenzen sind im Vektor durch ein 189 bp großes Intron künstlich in zwei Exons untergliedert. Für die Gene *flp* und *dao1* waren die von cDNA amplifizierten PCR-Produkte demzufolge 189 bp kleiner als die von gDNA amplifizierten PCR-Produkte.

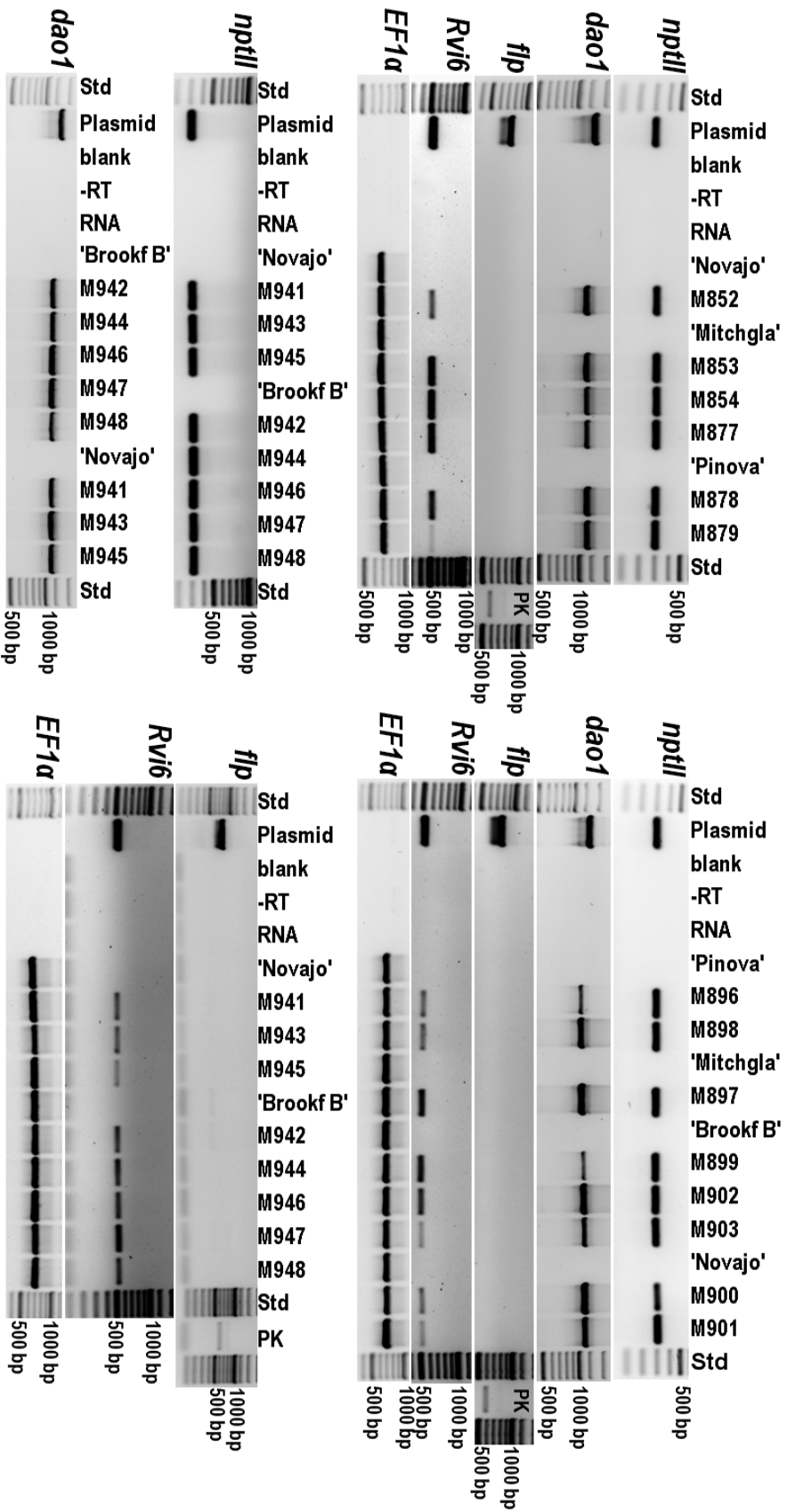


Abbildung 12 Transkriptionsanalysen (RT-PCR) der T-DNA transferierten Gene *nptII*, *dao1*, *flp* und *Rvi6* sowie des Haushaltgens *EF1α* in den transgenen Linien. Die Primerkombinationen NptII/F1/NptII/R1, dao1F1/dao1/R1, FlpF/FlpR, Vta2-F1/Vta2-R bzw. EF1αF/EF1αR wurden verwendet. Std – Std; Größenstandard, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); Plasmid – Positivkontrolle, Plasmid-DNA des Vector p9-Dao-FLPi-HcrV12; blank – Negativkontrolle, ddH₂O; -RT – Negativkontrolle, ddH₂O statt Reverser Transkriptase; RNA – Negativkontrolle, Template war DNase-behandelte RNA der Linie M854; 'Novajo', 'Mitchgla', 'Pinova', 'Brookfield Baigent' ('Brookf B') – Negativkontrollen, untransformierte Apfelsorten; PK – Positivkontrolle – Template war cDNA der Linie M879 nach Hitzeinduktion. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

3.2.1.4 Evaluierung der Schorfresistenz

Die Schorfresistenz der transgenen Apfellinien wurde an mikroveredelten Pflanzen durch künstliche Apfelschorfinokulation im Gewächshaus untersucht. Um die Funktionalität des transferierten Schorfresistenzgens *Rvi6* in den Linien zu prüfen, wurde die Schorfresistenz gegenüber den *V. inaequalis* Einsporisolaten 104 (bricht nicht *Rvi6*) und EU-D42a (bricht *Rvi6*; im JKI Dresden-Pillnitz unter D42a geführt und im Weiteren als D42a bezeichnet) evaluiert. Als Kontrollen wurden in den Schorfresistenztestungen zusätzlich sowohl die untransformierten Apfelsorten als auch gewählte Referenzsorten mit und ohne *Rvi6* Resistenzgen mitgeführt. Die Resistenztestungen der transgenen Linien fanden in den Jahren 2012 und 2013 statt, wobei nach Möglichkeit pro Linie und Isolat 10 Pflanzen inokuliert wurden. Die verwendete Sporendichte und die Keimungsrate der Isolate für die einzelnen Jahre sind Tabelle A 8 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Schorfresistenztestungen sind in Tabelle 3 aufgeführt. In Abbildung 13 werden beispielhaft inokulierte Blätter transgener Linien mit einzelnen T-DNA-Integrationsorten und von Kontrollsorten gezeigt.

Die Inokulation mit Isolat D42a verursachte bei den meisten Pflanzen anfällige Symptome; die Blätter zeigten Sporulation auf der Blattoberfläche (auf Blattober- und/oder Blattunterseite) zum Boniturtermin (Tabelle 3, Abbildung 13). Einzelne Pflanzen zeigten keine anfälligen Symptome gegenüber dem Isolat D42a, obwohl für diese Pflanzen kein vermindertes Wachstum offensichtlich war. Alle getesteten Sorten und Linien waren gegenüber dem Isolat D42a anfällig, mindestens eine der getesteten Pflanzen wurde mit den Boniturnoten 3b oder 4 bewertet.

Die Inokulation mit dem Isolat 104 führte bei den meisten transgenen Linien und bei allen getesteten Kontrollsorten mit *Rvi6* zu keinen Symptomen oder Reaktionen der Widerstandsfähigkeit. Alle getesteten Kontrollsorten ohne *Rvi6* (untransformierte Sorten und 'Golden Delicious') waren gegenüber dem Isolat 104 anfällig (Tabelle 3, Abbildung 13). Auch nach Inokulation mit dem Isolat 104 zeigten einzelne Pflanzen von Sorten ohne *Rvi6* keine anfälligen Symptome. 16 der 22 transgenen Linien und die *Rvi6* tragenden Sorten 'Prima', 'Rebella' und 'Retina' wurden gegenüber dem Isolat 104 als resistent eingestuft (Tabelle 3). Die meisten getesteten Pflanzen der resistenten Linien/Sorten wurden der Boniturklasse 0 (keine Symptome) zugeordnet. Einige getestete Pflanzen von resistenten transgenen Linien zeigten *pinpoint pits* (Boniturklasse 1) oder

chlorotische Läsionen (Boniturklasse 2). Nekrotische Läsionen (Boniturklasse 3a) waren fast ausschließlich bei Pflanzen von traditionell gezüchteten *Rvi6* tragenden Sorten sichtbar. Sechs der 22 transgenen Linien wurden gegenüber dem Isolat 104 als anfällig eingestuft (Tabelle 3). In diesen sechs transgenen Linien (M942 von 'Brookfield Baigent' und M852, M900, M941, M943, M945 von 'Novajo') scheint das transferierte Schorfresistenzgen *Rvi6* nicht voll funktionsfähig zu sein. Für jede erfolgreich transformierte Sorte wurde mindestens eine schorfresistente transgene Linie gegenüber Isolat 104 erzeugt.

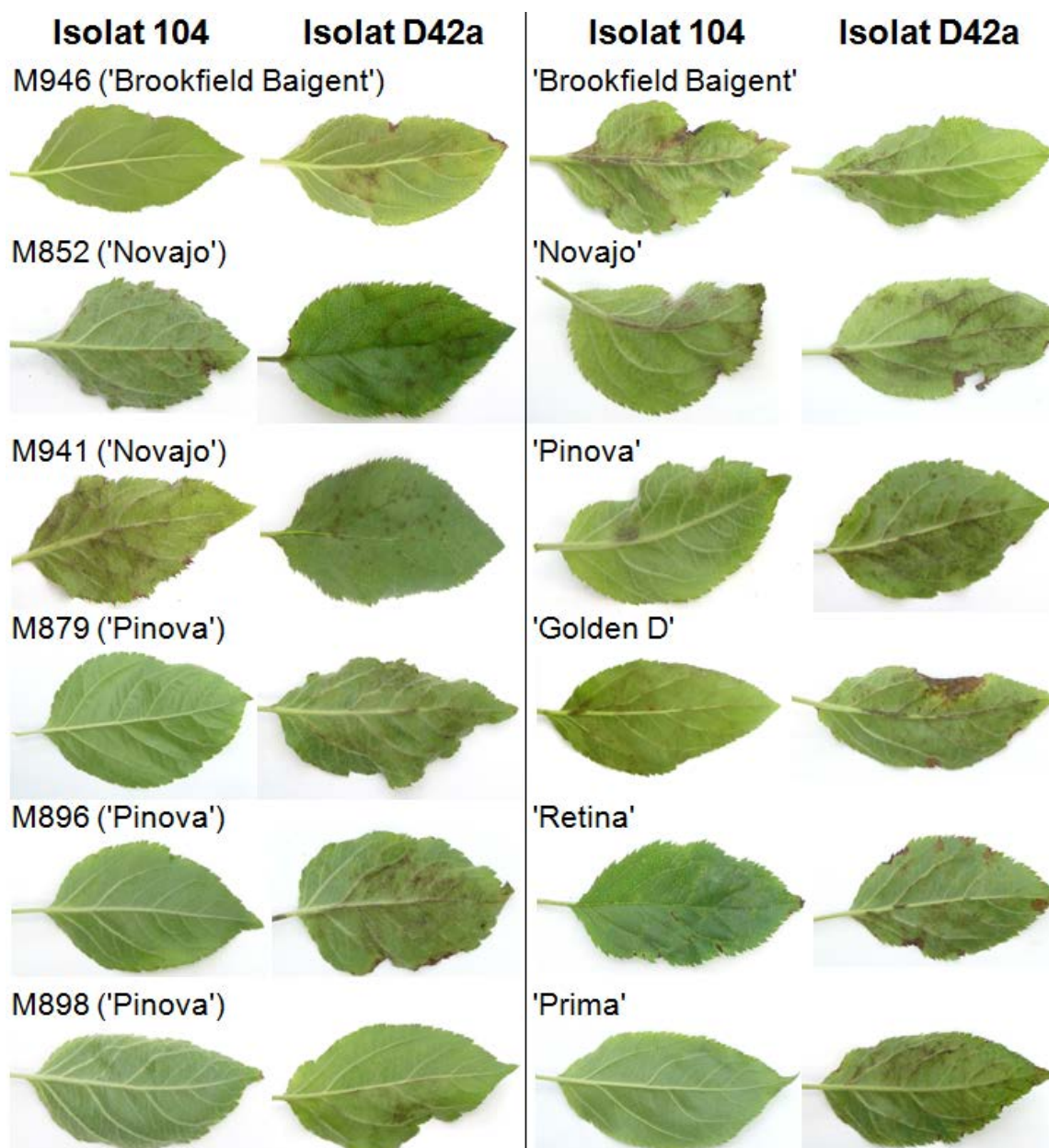


Abbildung 13 Blätter transgener Apfelinien mit einzelnen T-DNA-Integrationsorten (linke Seite) und von Kontrollsorten (rechte Seite), inokuliert mit *V. inaequalis* Einsporisolat 104 bzw. D42a. Die Blätter wurden 30 bzw. 35 Tage nach der Inokulation fotografiert, abhängig von Evaluierungsjahr. Kontrollsorten waren die untransformierten Apfelsorten ('Brookfield Baigent'; 'Novajo' und 'Pinova') sowie die Apfelsorten 'Golden Delicious' (ohne *Rvi6*), 'Prima' und 'Retina' (jeweils mit *Rvi6*). Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

3.2.1.5 Genexpressionsanalyse (qRT-PCR)

Die *Rvi6* Genexpression wurde quantitativ an *in vitro* Blattmaterial mittels qRT-PCR untersucht. Die Studie umfasste 14 transgene Apfelinien (zwei davon waren gegenüber dem *V. inaequalis* Isolat 104 anfällig) und zehn Kontrollsorten (die vier untransformierten Apfelsorten, die Sorte 'Golden Delicious' ohne *Rvi6* und fünf *Rvi6* tragende Sorten). Die *Rvi6* Genexpression wurde relativ zur *Rvi6* tragenden Sorte 'Santana' berechnet (Tabelle 3, Abbildung 14).

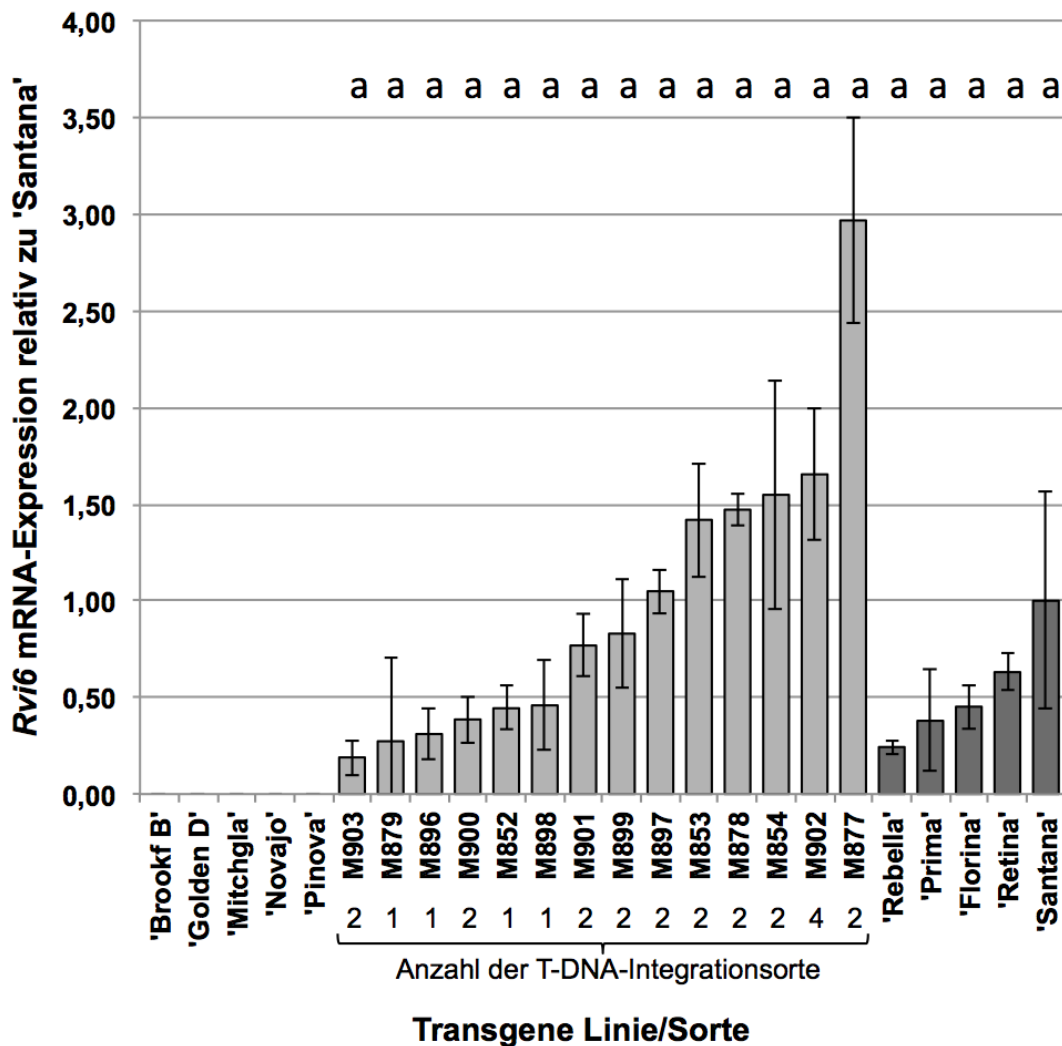


Abbildung 14 *Rvi6* Genexpression von transgenen Apfelinien und von traditionell gezüchteten Apfelsorten relativ zu 'Santana', untersucht mittels qRT-PCR. Der geometrische Mittelwert der drei analysierten biologischen Replikate ist dargestellt und der Standardfehler (\pm SE) als Fehlerbalken angegeben. Das Ergebnis des Tukey's (HSD) Tests ($p \leq 0,05$), zur Detektion von signifikanten Unterschieden, ist durch Kleinbuchstaben oberhalb der Balken gezeigt, wobei verschiedene Buchstaben einen signifikanten Unterschied zwischen Linien/Sorten bedeuteten. Die Anzahl der T-DNA-Integrationsorte der transgenen Linien ist angegeben. 'Brookf B' – 'Brookfield Baigent'; 'Golden D' – 'Golden Delicious'. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Die *Rvi6* Expression der getesteten transgenen Linien lag zwischen 0,2- und 3,0-fach und die *Rvi6* Expression der *Rvi6* tragenden Sorten zwischen 0,2- und 1,0-fach relativ zu 'Santana'. Für die untransformierten Sorten 'Brookfield Baigent', 'Mithgla', 'Novajo' und 'Pinova' sowie für die Kontrollsorte 'Golden Delicious' war keine *Rvi6* mRNA-Expression messbar, wie für Sorten ohne *Rvi6* zu erwarten war. Für die schorfanfälligen Linien M852 und M900 wurden vergleichbare *Rvi6* mRNA-Expressionslevel wie für schorffresistente Linien gefunden (gegenüber Isolat 104). Das Ergebnis des Tukey's (HSD) Tests der ANOVA belegte keinen signifikanten Unterschied in der *Rvi6* mRNA-Expression zwischen den getesteten transgenen Linien und den *Rvi6* tragenden Sorten 'Rebella', 'Retina' 'Florina', 'Prima' und 'Santana'. Für die getesteten transgenen Linien konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl der T-DNA-Integrationsorte und der *Rvi6* mRNA-Expressionsstärke nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.6 Auswahl transgener Linien für eine weitere Charakterisierung

Für weitere Analysen wurden transgene Apfellinien ausgewählt, die aufgrund der vorliegenden Ergebnisse für die angestrebte Produktion von cisgenen Apfelpflanzen am besten geeignet waren. Diese Linien sollten: (I) nur einen T-DNA-Integrationsort aufweisen, (II) schorffresistent gegenüber dem Isolat 104 sein und (III) das transferierte Schorffresistenzgen *Rvi6* in gleicher Stärke wie traditionell gezüchtete *Rvi6* tragende Apfelsorten exprimieren.

Die Bedingungen (I), (II) und (III) trafen auf die transgenen Linien M879, M896 sowie M898 der Apfelsorte 'Pinova' und die Bedingungen (I) und (II) auf die transgene Linie M946 der Sorte 'Brookfield Baigent' zu. Bedingung (III) war für die Linie M946 zum Auswahlzeitpunkt nicht untersucht (Tabelle 3). Diese vier Linien wurden bezüglich ihrer integrierten T-DNA in weiteren Experimenten genauer charakterisiert.

Tabelle 3 Charakterisierung der transgenen Apfelinien (Übersicht). Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Apfelsorte/ transgene Apfelinie	Rvi6 Präsenz	T-DNA- Insertions- orte [n]	Rv16 Expression relativ zu 'Santana' (± SE)	Evaluierung der Schorfresistenz														Vektor- rückgrat- Integration*			
				Einsporisolat 104,				Einsporisolat D42a,				Schorf- resistenz (Isolat 104)									
				Pflanzen pro Klasse [n]				Pflanzen pro Klasse [n]													
Jahr	0	1	2	3a	3b	4	0	1	2	3a	3b	4	0	1	2	3a	3b	4			
'Brookf B'	-	0	nm	2012	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	10	nein	-
				2013	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10		
M899	+	2	0,83 (+/- 0,28)	2012	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	ja	-
M902	+	4	1,65 (+/- 0,39)	2012	4	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	ja	-
M903	+	2	0,19 (+/- 0,09)	2012	4	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	ja	-
M942	+	2	nu	2013	0	0	0	1	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	10	nein	-
M944	+	4	nu	2013	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	ja	-
M946	+	1	nu	2013	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	9	ja	-
M947	+	2	nu	2013	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	5	ja	+
M948	+	2	nu	2013	8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	9	ja	+
'Mitchgla'	-	0	nm	2012	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10	nein	-
M853	+	2	1,42 (+/- 0,29)	2012	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	8	ja	-
M854	+	2	1,55 (+/- 0,59)	2012	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	ja	-
M877	+	2	2,97 (+/- 0,53)	2012	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	ja	-
M897	+	2	1,05 (+/- 0,11)	2012	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	ja	-
'Novajo'	-	0	nm	2012	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10	nein	-
				2013	1	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	10		
M852	+	1	0,44 (+/- 0,11)	2012	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	nein	-
M900	+	2	0,39 (+/- 0,12)	2012	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	nein	+
M901	+	2	0,77 (+/- 0,16)	2012	7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	ja	-
M941	+	1	nu	2013	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	4	nein	-

unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Evaluierung der Schorfresistenz																
Apfelsorte/ transgene Apfellinie	Rvi6 Präsenz	T-DNA- Insertions- orte [n]	Rvi6 Expression relativ zu 'Santana' (± SE)	Einsporisalat 104, Pflanzen pro Klasse [n]				Einsporisalat D42a, Pflanzen pro Klasse [n]				Schorf- resistenz (Isolat 104)	Vektor- rückgrat- Integration*			
				Jahr	0	1	2	3a	3b	4	0			1	2	3a
M943	+	2	nu	2013	0	0	0	0	7	0	0	0	0	3	nein	+
M945	+	2	nu	2013	0	0	0	0	10	0	0	0	0	6	nein	-
'Pinova'	-	0	nm	2012	0	0	0	0	9	0	0	0	0	10	nein	-
M878	+	2	1,47 (+/-0,08)	2012	8	0	0	0	0	0	0	0	0	8	ja	+
M879	+	1	0,27 (+/-0,43)	2012	4	1	5	0	0	0	0	0	0	10	ja	-
M896	+	1	0,31 (+/-0,13)	2012	3	1	6	0	0	0	0	0	0	6	ja	-
M898	+	1	0,46 (+/-0,23)	2012	2	2	4	0	0	0	0	0	0	9	ja	-
'Florina'	+	nu	0,45 (+/-0,11)	nu												nu
'Golden D'	-	nu	nm	2012	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	nein	nu
'Prima'	+	nu	0,38 (+/-0,26)	2012	2	1	5	2	0	0	0	0	0	10	ja	nu
'Rebella'	+	nu	0,24 (+/-0,04)	2012	0	0	0	3	0	0	0	0	0	4	ja	nu
'Retina'	+	nu	0,63 (+/-0,09)	2012	0	2	1	4	0	0	0	0	0	7	ja	nu
'Santana'	+	nu	1,00 (+/-0,56)	2013	8	0	1	1	0	0	0	0	1	0	8	nu

Die Anzahl der T-DNA-Integrationsorte wurde durch Southern Blot determiniert. Die Rvi6 Genexpression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und relativ zu der Apfelsorte 'Santana' berechnet. Geometrischer Mittelwert und Standardfehler von drei untersuchten biologischen Replikaten sind angegeben. Die Schorfresistenz wurde gegenüber den Isolaten 104 (bricht nicht Rvi6) und D42a (bricht Rvi6) durch künstliche Schorfinkulation im Gewächshaus evaluiert. Die Pflanzen wurden 30 Tage nach der Inokulation (dpi) in 2012 bzw. 35 dpi in 2013 den Symptomklassen nach Chevalier et al (1991) zugeordnet: 0 – keine Symptome (resistent), 1 – *pinpoint pits* (resistent), 2 – chlorotische Läsionen (resistent), 3a – Chlorosen und Nekrosen ohne Sporulation (resistent), 3b – Chlorosen und Nekrosen mit leichter Sporulation (anfällig) oder 4 – starke Sporulation (anfällig). *Die Integration von Vektorrückgrat wurde für die transgenen Linien durch PCR untersucht (Daten nicht gezeigt, siehe Abschnitt 3.2.2.1). 'Brook B' - 'Brookfield Baigent'; 'Golden D' – 'Golden Delicious'; SE – Standardfehler; nu – nicht untersucht; nm – nicht messbar; + – vorhanden; - – nicht vorhanden.

3.2.2 Weitere Charakterisierung gewählter transgener Linien

3.2.2.1 Untersuchungen zur Genauigkeit der T-DNA-Insertion und auf mögliche Vektorrückgrat-Integration

Die Untersuchungen zur Genauigkeit der T-DNA-Insertion und auf Vektorrückgrat-Integration wurde für die ausgewählten Linien mittels PCR realisiert (Abbildung 15). Dafür wurden Primer entwickelt, die an der Plasmidsequenz des Vektors p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 nahe der *border site* Sequenzen (RB und LB) hybridisierten (Abbildung 15 A) und die PCR für verschiedene Primerkombinationen an p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 Plasmid-DNA etabliert (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss wurden PCR-Experimente mit etablierten Primerkombinationen an gDNA-Proben der ausgewählten Linien durchgeführt, wodurch ein Rückschluss über die Genauigkeit der T-DNA-Integration und auf Vektorrückgrat-Integration möglich war (Abbildung 15 B).

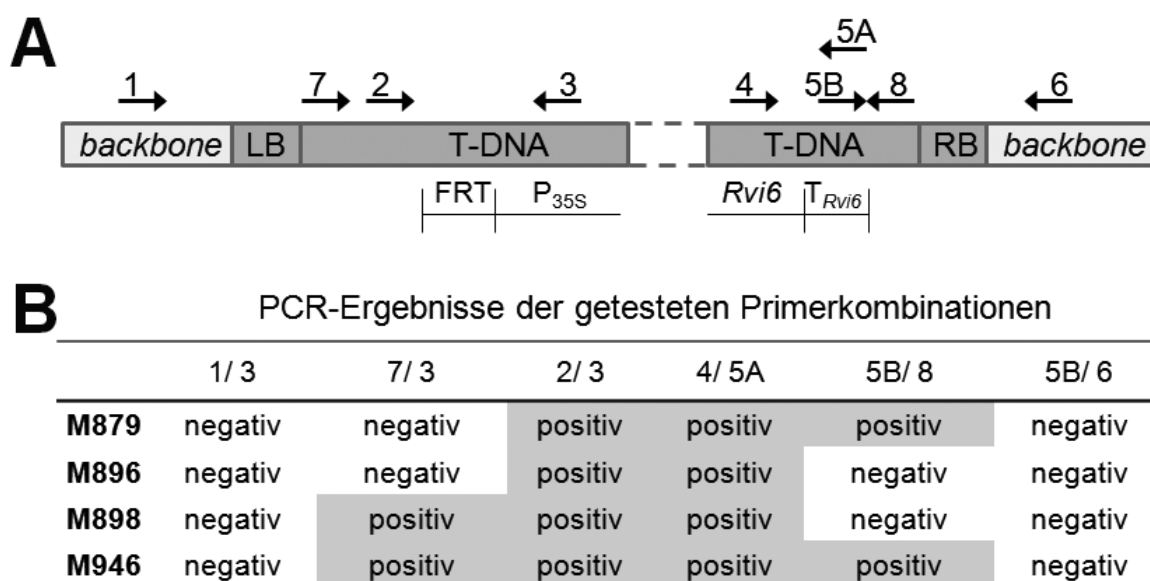


Abbildung 15 PCR-basierte Untersuchungen zur Genauigkeit der T-DNA-Insertion und zur Vektorrückgrat-Integration in ausgewählten transgenen Apfelinien. **A** Primerbindepositionen (Pfeile) am Vektor p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 (in Abschnitten, schematisch). **B** PCR-Ergebnisse verschiedener Primerkombinationen. Positive Ergebnisse wurden grau hinterlegt. FRT – Flp-Erkennungssequenz; LB – *left border* Region; P35S – *CaMV* 35S Promotor; RB – *right border* Region; *Rvi6* – Schorfresistenzgen *Rvi6* von *M. floribunda* No. 821; T_{Rvi6} – endogener Terminator des Schorfresistenzgens *Rvi6* von *M. floribunda* No. 821. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Für keine der vier ausgewählten Linien konnten Vektorrückgrat-Sequenzen unter Verwendung der Primerkombinationen 1/3 und 5B/6 amplifiziert werden (Abbildung 15 B). Für alle vier Linien wurde somit keine Integration von Vektor-Rückgrat angenommen. Die Linie M946 wurde positiv für alle anderen Primerkombinationen (7/3, 2/3, 4/5A und 5B/8) getestet (Abbildung 15 B). Für diese Linie wurde die Integration einer intakten T-DNA an den *border site* Sequenzen (RB und LB) in das Apfelgenom angenommen. Die Linie M896 wurde negativ für die Primerkombinationen 7/3 und 5B/8, jedoch positiv für die Primerkombinationen 2/3 und 4/5A getestet (Abbildung 15 B). Bei dieser Linie gingen offensichtlich Teile der T-DNA bei der Integration ins Apfelgenom verloren, was die beiden *border site* Sequenzen RB und LB beinhaltete. Die PCR-Analysen zeigten, dass weder die FRT-Sequenz noch Teile des *Rvi6* Gens davon betroffen waren. Für Linie M896 wurde die Integration einer verkürzten, jedoch intakten T-DNA angenommen. Die Linie M898 wurde positiv für die Primerkombinationen 7/3, 2/3 und 4/5A, allerdings negativ für die Primerkombination 5B/8 getestet (Abbildung 15 B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für Linie M898 die Integration einer verkürzten, jedoch intakten T-DNA angenommen, welcher ein Sequenzabschnitt nahe der RB inklusive der RB Region selbst fehlt. Die Linie M879 wurde positiv für die Primerkombinationen 2/3, 4/5A und 5B/8, aber negativ für die Primerkombination 7/3 getestet (Abbildung 15 B). Für Linie M879 wurde auf die Integration einer verkürzten, jedoch intakten T-DNA rückgeschlossen, welcher ein Sequenzabschnitt nahe der LB inklusive der LB Region selbst fehlt.

Um für den verwendeten Transformationsvektor eine Aussage bezüglich möglicher Vektorrückgrat-Integration treffen zu können, wurden die verbliebenen transgenen Apfellinien (17 Linien) ebenfalls mit den Primerkombinationen 1/3 und 5B/6 getestet. Für fünf dieser Linien konnte die Integration von Vektorrückgrat-Sequenzen belegt werden. Die restlichen 13 Linien wiesen keine Vektorrückgrat-Integration auf (Tabelle 3, Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2 Bestimmung des T-DNA-Integrationsortes

Die Bestimmung des T-DNA-Integrationsortes wurde für die ausgewählten transgenen Apfellinien mit *Genome Walking* durchgeführt (Tabelle 4) und der putative Integrationsort in den Linien mittels PCR verifiziert (Daten nicht gezeigt). Für die Linien M879 (GenBank: KM880090; KM880091) und M896 (GenBank:

KM880092) wurde die T-DNA-Integration auf LG 14 determiniert. Für die Linien M898 (GenBank: KM880093) und M946 (GenBank: KM880094; KM880095) wurde die T-DNA-Integration auf LG 3 bzw. LG 9 bestimmt. In vier von sechs analysierten Fällen war neben dem Verlust der entsprechenden *border site* (RB bzw. LB) auch der Verlust von T-DNA über die *border* Sequenz hinaus belegbar. In den verbleibenden zwei Fällen lag nur ein anteiliger Verlust der entsprechenden *border site* Sequenz vor. In keinem der analysierten Fälle wurden Vektorrückgrat-Sequenzen am Integrationsort nachgewiesen (Tabelle 4). In Linie M946 wurde die T-DNA in das zweite Intron einer putativ genkodierenden Sequenz für ein Protein aus der UDP-Glucuronosyl/UDP-Glucosyltransferase Familie integriert (MDP0000315574). Um die vorhergesagte genkodierende Sequenz MDP0000315574 genauer zu charakterisieren, wurden bisher noch keine Untersuchungen durchgeführt. Für die T-DNA-Integrationsorte der Linien M879, M896 und M898 wurden bislang keine genkodierenden Sequenzen prognostiziert.

Für die Linien M879 und M946 wurde der T-DNA-Integrationsort erfolgreich von beiden *border site* Regionen ausgehend bestimmt. Nach einem Abgleich mit der 'Golden Delicious' Genomsequenz konnte für beide Linien ein Rückschluss über eine mögliche genomische Neuordnung am T-DNA-Integrationsort im Zuge der T-DNA-Integration gezogen werden. In der Linie M879 fehlten 72 bp Apfelgenomsequenz am T-DNA-Integrationsort. Diese gingen vermutlich durch den Integrationsprozess verloren oder waren schon im Ausgangsmaterial (Sorte 'Pinova') nicht vorhanden. Für die Linie M946 waren am T-DNA-Integrationsort ein zusätzlicher DNA-Abschnitt von 80 bp vorhanden und das Fehlen von 19 bp Apfelgenomsequenz zu verzeichnen. 46 bp des zusätzlichen DNA-Abschnittes konnten in antiparalleler Orientierung in direkter Nachbarschaft zum T-DNA-Integrationsort in der Linie M946 wiedergefunden werden und wurden auch im 'Golden Delicious' Genom bestätigt. Der Ursprung für die anderen Teile des zusätzlichen DNA-Abschnittes war nicht bestimmbar. Vermutlich war die T-DNA-Integration durch *A. tumefaciens* ursächlich für diese Genomumstrukturierungen am T-DNA-Insertionsort der Linie M946. Auch hier bestand die Möglichkeit, dass im Ausgangsmaterial (Sorte 'Brookfield Baigent') eine von 'Golden Delicious' abweichende Genomsequenz vorlag.

Tabelle 4 Verifizierter T-DNA-Integrationsort ausgewählter transgener Apfelinien mit nur einem T-DNA-Insertionsort. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Transgene T-DNA-Integrationsort		DNA-Strang Umstrukturierungen am T-DNA-Integrationsort				
Linie	LG (Position)	Contig ^a	Genvorhersage ^b	Apfelgenom	T-DNA, LB Region	T-DNA, RB Region
M879	LG 14 (23756427 – 23756499)	MDC018607.261	keine	-72 bp	-191 bp der T-DNA; -LB (GenBank: KM880090)	-1 bp der T-DNA; -RB (GenBank: KM880091)
M896	LG 14 (5458331)	MDC005915.385	keine	k A	k A	-287 bp der T-DNA; -RB (GenBank: KM880092)
M898	LG 3 (28207298)	MDC017704.388	keine	k A	-2 bp der LB (GenBank: KM880093)	k A
M946	LG 9 (16545091 – 16545110)	MDC020519.21	MDP0000315574 ^c	+61 bp ^d	-1 bp der LB (GenBank: KM880094)	-14 bp der T-DNA; -RB (GenBank: KM880095)

^{a,b}MDC- und MDP-Nummern stammen von der *Genome Database for Rosaceae* (GDR) *Malus x domestica* v1.0; ^cUDP-Glucuronosyl/UDP-Glucosyltransferase Familie; ^dVerlust von 19 bp Apfelgenomsequenz am T-DNA-Integrationsort und zusätzliche Insertion von 80 bp Nukleotidsequenz (46 bp davon wurden wahrscheinlich von Apfelgenomsequenz nahe des Integrationsortes dupliziert); k A – keine Angaben vorhanden bzw. möglich; LB – *left border* Region der T-DNA; LG – Kopplungsgruppe (*linkage group*); RB – *right border* Region der T-DNA; - – Verlust von; + – Insertion von.

3.2.3 Herstellung cisgener Apfelpflanzen

Für die Herstellung cisgener Apfelpflanzen wurden die vier transgenen Apfelinien M879, M896, M898 und M946 von den Sorten 'Pinova' und 'Brookfield Baigent' verwendet. Für diese Linien wurde nur ein T-DNA-Integrationsort detektiert (Abschnitt 3.2.1.2), der erfolgreich bestimmt werden konnte (Abschnitt 3.2.2). Die Funktionalität des transferierten Schorfresistenzgens *Rvi6* wurde für alle vier Linien durch ihre Resistenz gegenüber dem *V. inaequalis* Isolat 104 bestätigt (Kap. 3.2.1.4).

3.2.3.1 Hitzebehandlung für die Induktion des Rekombinasesystems

Für die Erzeugung cisgener Apfelpflanzen wurden die ausgewählten transgenen Apfelinien den HÜ „MSO“ und „Feuchtekammer“ unterzogen, um das Flp/*FRT* Rekombinasesystem zu induzieren. Daraus regenerierte Sprosse wurden vereinzelt und eindeutig bezeichnet (Tabelle 5).

Mit dem Ziel, die Selektion von Zellen ohne *dao1* zu fokussieren, wurden mehrere Versuche im Zuge der Sprossregeneration im Rahmen der HÜ „Feuchtekammer“ durchgeführt. Um *dao1* als selektives Markergen zu nutzen, wurde die D-Aminosäure D-Ile eingesetzt. Vorversuche zeigten, dass eine Konzentration von 5 mM bzw. 10 mM D-Ile ausreichend war, um die Entwicklung von *dao1* transgenen Apfelinien zu hemmen (Daten nicht gezeigt). Die negativen Effekte von D-Ile auf die pflanzliche Entwicklung verhinderten jedoch eine effektive Selektion putativ cisgener Sprosse. Behandelte Regenerate zeigten stets extrem verkürzte Internodien und bildeten keine verlängerten Sprosse, wodurch keine Einzelsprosse gewonnen werden konnten. Aus diesem Grund wurden die mit D-Ile behandelten Regenerate wieder auf Nährmedium ohne D-Ile transferiert, wo eine normale Pflanzenentwicklung einsetzte.

3.2.3.2 Identifikation cisgener Sprosse und Linienetablierung

Ausgehend von den vier gewählten transgenen Ursprungslinien wurden nach Durchführung der HÜ „MSO“ und „Feuchtekammer“ insgesamt 978 putativ cisgene Einzelsprosse gewonnen (Tabelle 5). Für die Identifizierung cisgener Sprosse wurden PCR-Analysen zum Nachweis des Gens *flp* (innerhalb der Rekombinasekassette lokalisiert, siehe Abbildung 1 C) und des Haushaltgens *EF1- α* (Kontrolle) durchgeführt. Für zwei von 978 getesteten Sprossen konnte kein *flp* spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden, obwohl ein *EF1- α*

spezifisches Produkt problemlos amplifizierbar war (Daten nicht gezeigt). Diese beiden Einzelsprosse (iM879-68 und iM946-193) wurden folglich als cisgen eingestuft. Für alle anderen getesteten Einzelsprosse (976 Stück) war *flp* nachweisbar (Daten nicht gezeigt) und somit die Rekombinasekassette in diesen Sprossen vorhanden. Demzufolge waren diese 976 Sprosse immer noch transgen.

Tabelle 5 Übersicht zur Produktion cisgener Apfellinien. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Transgene Ursprungs- linie	Apfel- sorte	Mittels PCR getestete Einzelsprosse [n]		Cisgene Apfellinien	
		HÜ „MSO“	HÜ „Feuchtekkammer“	[n]	Bezeichnung (HÜ)
M879	'Pinova'	0	119	1	iM879-68 (HÜ „Feuchtekkammer“)
M896	'Pinova'	0	110	keine	
M898	'Pinova'	0	411	keine	
M946	'Brookf B'	46	292	1	iM946-193 (HÜ „MSO“)

Die Bezeichnung der Einzelsprosse setzte sich wie folgt zusammen: Liniennummer der transgenen Ursprungslinie, versehen mit dem Präfix „i“ für „induziert“, gefolgt von einer fortlaufenden Nummer für jeden untersuchten Einzelspross. Die etablierten cisgenen Apfellinien erhielten dieselbe Bezeichnung wie der cisgene Ausgangsspross. 'Brookf B' – 'Brookfield Baigent'; HÜ – Hitzeübertragung.

Ein Teil der getesteten Einzelsprosse stammte von Regeneraten, die bis zu fünf Monate auf Medium mit D-Ile erhalten wurden. Keiner dieser Sprosse wurde durch die PCR-Analysen als cisgen identifiziert. Das D-Aminosäure/DAAO Selektionssystem, unter Verwendung der D-Aminosäure D-Ile, wurde somit als ineffektiv für die Selektion von Sprossen ohne *dao1* belegt.

Um den Zustand der T-DNA in den cisgenen Einzelsprossen iM879-68 und iM946-193 besser zu charakterisieren, wurden spezifische PCR-Reaktionen zum Nachweis aller T-DNA lokalisierten Gene (*nptII*, *dao1*, *flp* und *Rvi6*) durchgeführt (Abbildung 16). Der Nachweis des Schorfresistenzgens *Rvi6* erfolgte dabei mit zwei verschiedenen Primerkombinationen, wovon die Kombination Vfa2-F/ Vfa2-Rev hoch genspezifisch war.

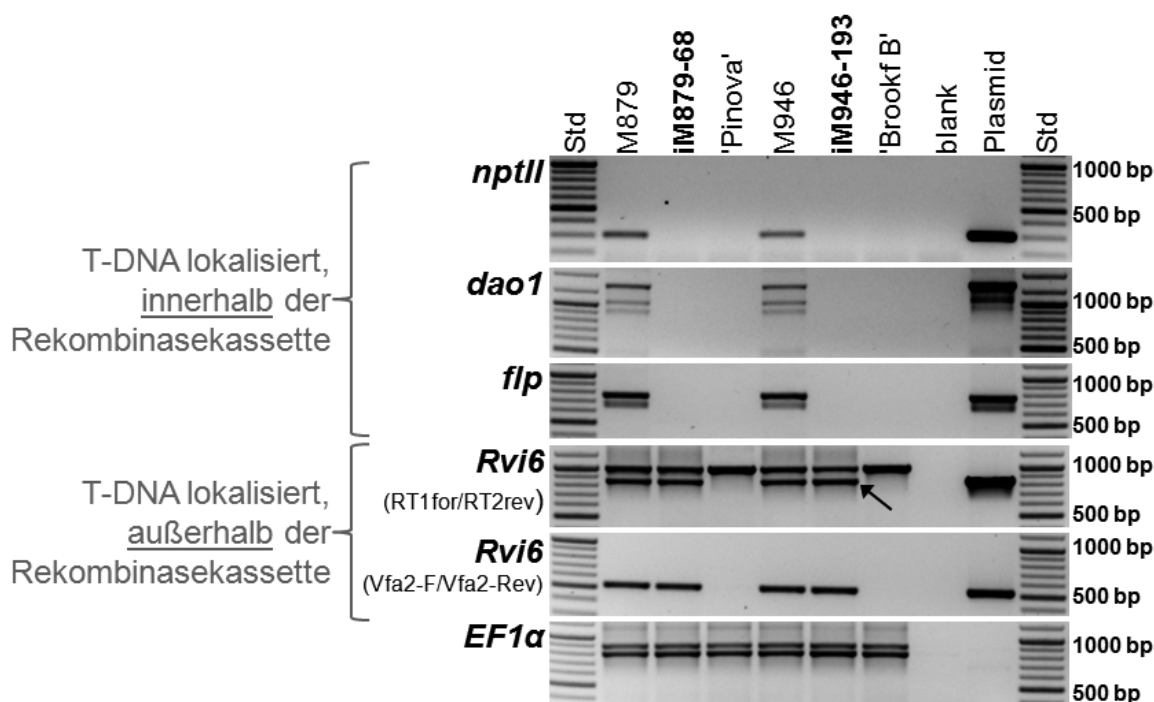


Abbildung 16 PCR-Analysen der cisgenen Einzelsprosse iM879-68 und iM946-193. Nachweis der T-DNA lokalisierten Gene *nptII*, *dao1*, *flp*, *Rvi6* (zwei verschiedene Primerkombinationen) und des Haushaltgens *EF1-α* unter Verwendung der Primerkombinationen NptIIF1/ NptIIR1, dao1F1/ dao1R1, FlpF/ FlpR, RT1for/ RT2rev bzw. Vfa2-F/ Vfa2-rev und EF1αF/ EF1αR. Der Pfeil markiert das *Rvi6* spezifische Produkt bei der PCR unter Verwendung der Primerkombination Vfa2-F/ Vfa2-rev. Std – Größenstandard, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); M879, M946 – transgene Ursprungslinien; iM879-68, iM946-193 – cisgene Einzelsprosse, regeneriert aus hitzebehandelten Blättern der transgenen Apfelinien M879 bzw. M946; 'Pinova', 'Brookfield Baigent' ('Brookf B') – Negativkontrollen, untransformierte Sorten; Plasmid – Positivkontrolle, Plasmid-DNA des Transformationsvektors p9-Dao-PLPi-HcrVf2; blank – Negativkontrolle, ddH₂O. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Für die untransformierten Sorten 'Pinova' und 'Brookfield Baigent' waren keine T-DNA lokalisierten Gene detektierbar. Für die transgenen Ursprungslinien M879 und M946 waren alle T-DNA lokalisierten Gene nachweisbar, was den erfolgreichen Transfer der T-DNA erneut belegte. Für die Sprosse iM879-68 und iM946-193 war kein T-DNA lokalisiertes Transgen (*nptII*, *dao1* und *flp*) amplifizierbar. Im Vektor p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 sind alle Transgene (*nptII*, *dao1* und *flp*) innerhalb der Rekombinasekassette lokalisiert (vgl. Abbildung 1 C). Für dieselben Sprosse war das T-DNA lokalisierte apfeleigene Schorfresistenzgen *Rvi6* durch zwei Primerkombinationen nachweisbar. Im Vektor p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 ist das Schorfresistenzgen *Rvi6* außerhalb der Rekombinasekassette lokalisiert (vgl. Abbildung 1 C).

Die beiden Einzelsprosse iM879-68 und iM946-193 konnten aufgrund der PCR-Analysen als cisgen bestätigt werden. Die cisgenen Einzelsprosse wurden zu Linien vermehrt. Die etablierten cisgenen Apfellinien wurden, wie die ursprünglichen Einzelsprosse, als iM879-68 bzw. iM946-193 bezeichnet. Die cisgene Linie iM879-68 wurde mit der HÜ „Feuchtekammer“ und die cisgene Linie iM946-193 mit der HÜ „MSO“ erzeugt (Tabelle 5).

3.2.4 Evaluierung cisgener Linien

3.2.4.1 Southern Blot Analysen

Um die Abwesenheit der Rekombinasekassette in den cisgenen Apfellinien iM879-68 und iM946-193 mit weiteren Experimenten genauer zu untersuchen, wurden Southern Blot Analysen, in gleicher Weise wie für die transgenen Apfellinien, durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.1.2). Für die beiden cisgenen Linien war kein *nptII* Hybridisierungssignal detektierbar, wodurch die Abwesenheit des Transgens *nptII* belegt werden konnte (Abbildung 17).

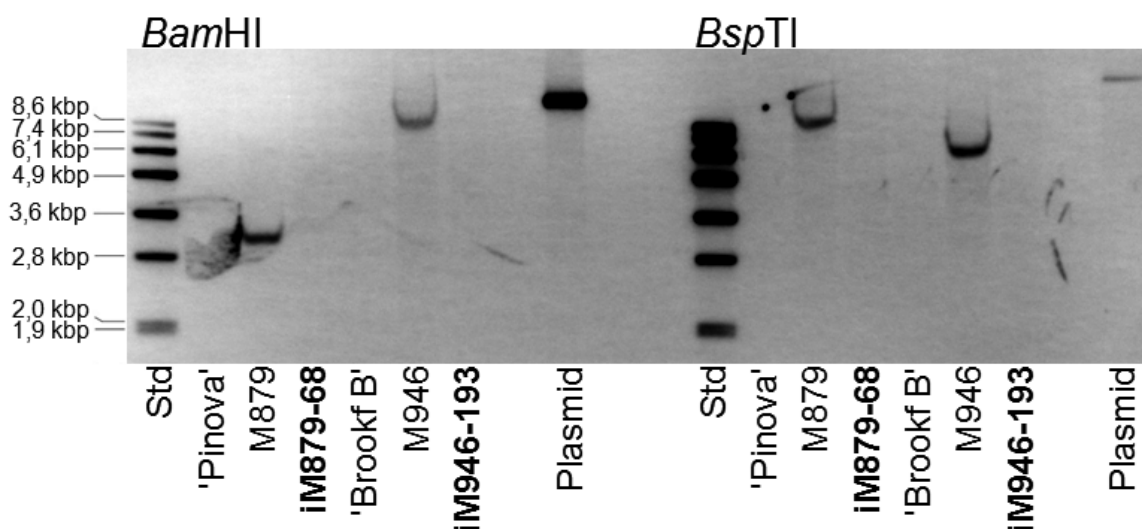


Abbildung 17 Southern Blot Analysen der cisgenen Apfellinien zur Detektion der Anzahl der T-DNA-Insertionsorte mit *nptII* Gen. Zwei unabhängige Southern Blots wurden durchgeführt, wofür genomische DNA einmal mit *Bam*HI und einmal mit *Bsp*TI verdaut wurde. Beide Blots wurden mit einer *nptII* spezifischen Sonde hybridisiert.; Std – Standard, DNA Molecular Weight Marker VII, Digoxigenin-markiert (Roche Diagnostics); 'Pinova', 'Brookfield Baigent' ('Brookf B') – Negativkontrollen, untransformierte Sorten; M879, M946 – transgene Ursprungslinien; iM879-68, iM946-193 – cisgene Linien, erzeugt aus den transgenen Linien M879 bzw. M946; Plasmid – Positivkontrolle, verdaute Plasmid-DNA des Vektors p9-Dao-FLPi-HcrVf2. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Dieses Resultat bestätigte die Ergebnisse der vorangegangenen PCR-Analysen (Abbildung 16, Kap. 3.2.3.2), wodurch auf die Abwesenheit der Rekombinasekassette in den cisgenen Linien iM879-68 und iM946-193 geschlossen wurde. Für die untransformierten Sorten war erwartungsgemäß kein *nptII* Hybridisierungssignal nachweisbar. Die transgenen Ursprungslinien M879 und M946 zeigten in beiden Southern Blots je ein *nptII* Hybridisierungssignal, wodurch vorherige Ergebnisse bestätigt werden konnten (vgl. Kap. 3.2.1.2).

3.2.4.2 Charakterisierung cisgener Linien durch selektive Agenzien

Die Abwesenheit/Anwesenheit der Transgene *nptII* und *dao1* in den cisgenen Apfelinien wurde mit einem weiteren Experiment, unter Verwendung der selektiven Agenzien Kanamycin (Km), D-Serin (D-Ser) und D-Ile, untersucht. Dafür wurden je drei *in vitro* gewachsene Sprossspitzen einer cisgenen Linie, der entsprechenden transgenen Ursprungslinie und der dazugehörigen untransformierten Sorte zusammen in ein Glasgefäß auf M8-Medium mit je einem selektiven Agens aufgesetzt. Die Entwicklung der Sprossspitzen wurde vier Wochen später bewertet. Abbildung 18 zeigt diese Untersuchungen für die cisgene Linie iM946-193.

Die Sprossspitzen aller Genotypen (untransformierte Sorte, transgene Ursprungslinie und cisgene Linie) zeigten ein normales Wachstum auf Medium ohne selektives Agens (Kontrolle). Das im Medium befindliche Sprossende bildete Kallusgewebe aus (\varnothing ca. 0,5 cm). Die Sprosse bildeten neue sattgrüne Blätter und das Sprosslängenwachstum setzte ein. Nach vier Wochen betrug die Sprosslänge ca. 3 cm (Abbildung 18).

Die Zugabe von Km inhibierte das Sprosswachstum der untransformierten Sorte und der cisgenen Linie vollständig. Die Sprossspitzen entwickelten kein neues Kallus-, Blatt- oder Sprossgewebe; vorhandene Blätter wurden weiß. Im Gegensatz dazu entwickelten sich die Sprossspitzen der transgenen Linie auf Medium mit Km normal (Abbildung 18).

Die Zugabe von D-Ser inhibierte das Sprosswachstum der untransformierten Sorte und der cisgenen Linie komplett. Die Sprossspitzen bildeten keine neuen Blätter oder Kallusgewebe und die im Medium befindlichen Sprossenden wurden braun. Vorhandene Blätter wurden chlorotisch und zeigten braune Blattspitzen.

Demgegenüber entwickelten sich die Sprossspitzen der transgenen Ursprungslinie auf Medium mit D-Ser weitestgehend normal, die neu gebildeten Blätter waren leicht chlorotisch (Abbildung 18).



Abbildung 18 Charakterisierung der cisgenen Apfelinie iM946-193 unter Verwendung von selektiven Agenzien. Die angewendete Konzentration des selektiven Agens ist in Klammern angegeben. Die *in vitro* gewachsenen Sprosse wurden vier Wochen nach der Überführung auf M8-Medium mit selektivem Agens fotografiert. Der Maßstab entspricht einer Länge von 5 cm. iM946-193 – cisgene Linie, erzeugt aus der transgenen Apfelinie M946; M946 – transgene Ursprungslinie; 'Brookfield Baigent' – untransformierte Sorte; Km – Kanamycin; D-Ser – D-Serin; D-Ile – D-Isoleucin. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Die Zugabe von D-Ile beeinflusste die Sprossentwicklung aller drei getesteten Genotypen negativ, wobei der Einfluss auf die transgene Ursprungslinie am stärksten war. Die Sprosse aller getesteten Genotypen bildeten Kallusgewebe am im Medium befindlichen Ende aus. Das Kallusgewebe der transgenen Ursprungslinie zeigte strukturelle Abweichungen: Die Kallusoberfläche wirkte scharf umrissen und kompakt und der Durchmesser betrug nur ca. 0,2 cm. Die Sprosse aller getesteten Genotypen konnten neue Blätter produzieren, allerdings waren diese chlorotisch sowie manchmal rötlich und zeigten eine veränderte

Form. Sie waren klein, dünn und entlang der Längsachse eingerollt. Die Anzahl der neu gebildeten Blätter der transgenen Ursprungslinie war im Vergleich zur cisgenen Linie und zur untransformierten Sorte vermindert. Keiner der untersuchten Genotypen zeigte Sprosslängenwachstum auf Medium mit D-Ile (Abbildung 18).

Gleiche Ergebnisse lieferte dieses Experiment für die cisgene Linie iM879-68, die zusammen mit ihrer transgenen Ursprungslinie M879 und der untransformierten Sorte 'Pinova' evaluiert wurde (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.3 Sequenzierung des Rekombinationsortes und Rückschluss auf die Größe der T-DNA in den cisgenen Linien

Für die cisgenen Apfellinien iM879-68 und iM946-193 wurden Rekombinationsort überspannende PCRs durchgeführt. Von den verwendeten Primern hybridisierte einer innerhalb der T-DNA am Promotor bzw. an der genkodierenden Sequenz des Apfelschorfresistenzgens *Rvi6*. Der andere Primer hybridisierte im Apfelgenom nahe dem bestimmten T-DNA-Integrationsort für die transgene Ursprungslinie, LB seitig (Tabelle 4). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden sequenziert und bioinformatisch ausgewertet. Die Sequenziererergebnisse bestätigten die für die transgenen Ursprungslinien bestimmten T-DNA-Insertionsorte. In beiden cisgenen Linien fand das Rekombinationsereignis exakt an den FRT-Sequenzen statt und hinterließ je eine FRT-Sequenz (34 bp) im Genom der cisgenen Linie. Diese Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen aus der T-DNA-Integrationsort Bestimmung für die transgenen Ursprungslinien (Kap. 3.2.2.2), ermöglichten eine Größenskalkulation der T-DNA für die cisgenen Linien. Des Weiteren konnte der Anteil an Fremd-DNA im Endprodukt berechnet werden (Abbildung 19). Für die cisgene Linie iM879-68 ergaben diese Berechnungen eine 5050 bp große T-DNA. Die T-DNA setzte sich aus dem Schorfresistenzgen mit seinen endogenen regulatorischen Sequenzen (4793 bp) und insgesamt 257 bp Fremd-DNA zusammen. Die Fremd-DNA war in zwei Abschnitte unterteilt, welche stromaufwärts bzw. stromabwärts vom apfeleigenen Resistenzgen lokalisiert waren. Der stromaufwärts liegende Abschnitt betrug 200 bp und beinhaltete die FRT-Sequenz.

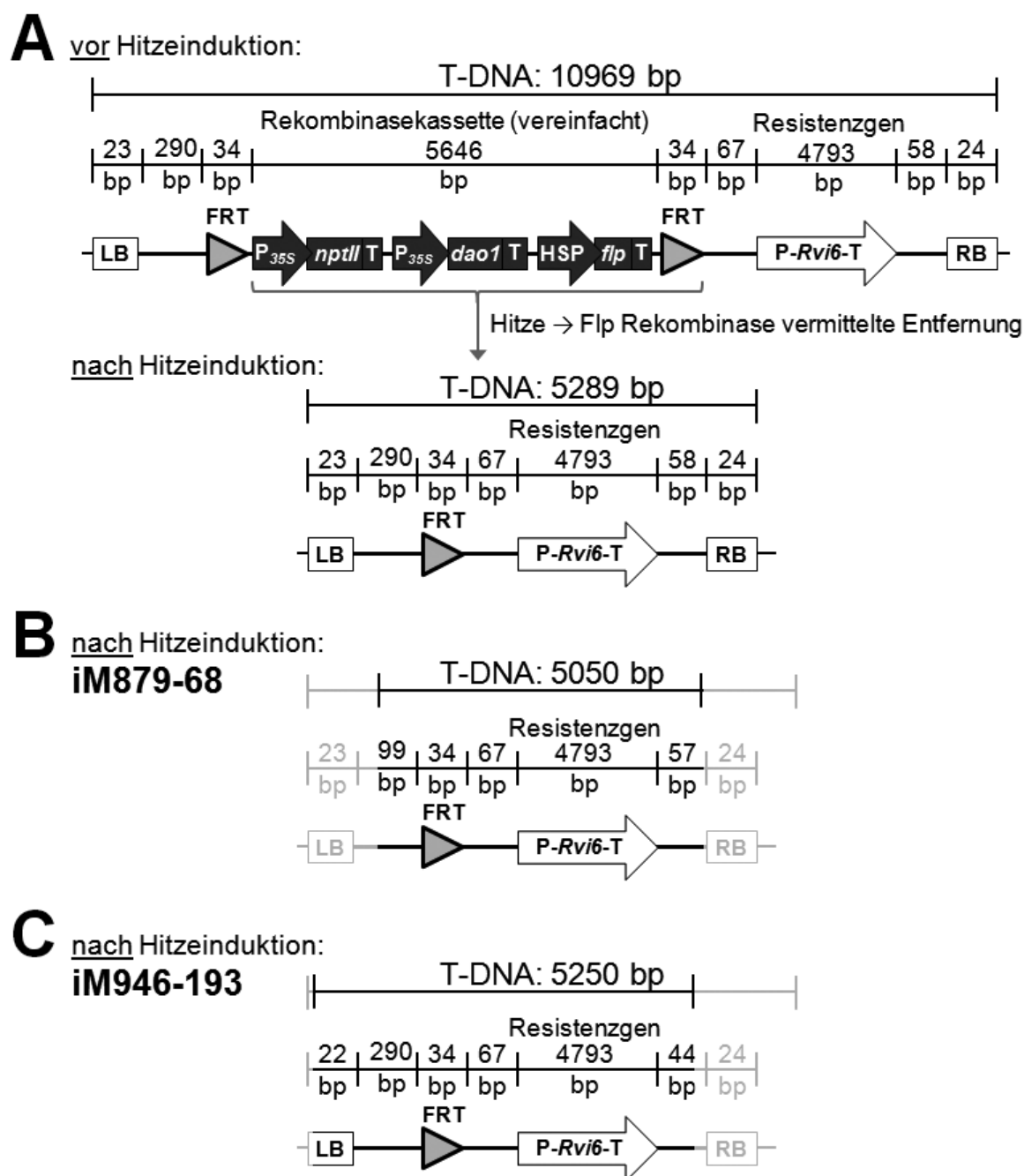


Abbildung 19 Größeninformation zu den einzelnen T-DNA Abschnitten des Transformationsvektor p9-Dao-FLPi-HcrVf2 vor und nach Hitzeinduktion (vereinfacht dargestellt, ausführliche in Abbildung 1 C) (**A**) sowie schematische Darstellung der T-DNA Struktur für die cisgenen Apfellinien iM879-68 (**B**) und iM946-193 (**C**). iM879-68, iM946-193 – cisgene Linien, erzeugt aus den transgenen Linien M879 bzw. M946. bp – Basenpaare; LB – *left border* Region; FRT – Flp-Erkennungssequenz (graue Dreiecke); P_{35S} – *CaMV* 35S Promotor; *nptII* – Neomycinphosphotransferase II kodierendes Gen; T – Terminatorsequenz; *dao1* – D-Aminosäureoxidase (DAAO) kodierendes Gen; HSP – Hitzeschock induzierbarer Promotor aus der Sojabohne; *flp* – Flippase kodierendes Gen; P-*Rvi6*-T – Schorfresistenzgen *Rvi6* von *M. floribunda* No. 821 mit endogener Promotor- und Terminatorsequenz; RB – *right border* Region. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Für die cisgene Linie iM946-193 ergaben diese Berechnungen eine 5250 bp große T-DNA, die sich ebenfalls aus dem Resistenzgen mit seinen endogenen regulatorischen Sequenzen (4793 bp) und zwei Abschnitten Fremd-DNA mit einer Gesamtgröße von 457 bp zusammensetzte. Der stromaufwärts vom Resistenzgen lokalisierte Abschnitt Fremd-DNA betrug 413 bp und enthielt die FRT-Sequenz. Der stromabwärts vom Resistenzgen liegende Abschnitt Fremd-DNA war 44 bp groß.

3.2.4.4 *Rvi6* Genexpression (qRT-PCR)

Die *Rvi6* Genexpression der cisgenen Apfelinien iM879-68 und iM946-193 wurde mittels qRT-PCR untersucht. Die Vorgehensweise entsprach den qRT-PCR-Analysen der transgenen Apfelinien (vgl. Kap. 3.2.1.5). Als Kontrollen und für Vergleichszwecke wurden die untransformierten Apfelsorten 'Pinova' und 'Brookfield Baigent', die transgenen Ursprungslinien M879 und M946 sowie einige *Rvi6* tragende Apfelsorten ('Prima', 'Rebella', 'Santana') ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt und in Tabelle 6 zusammengefasst.

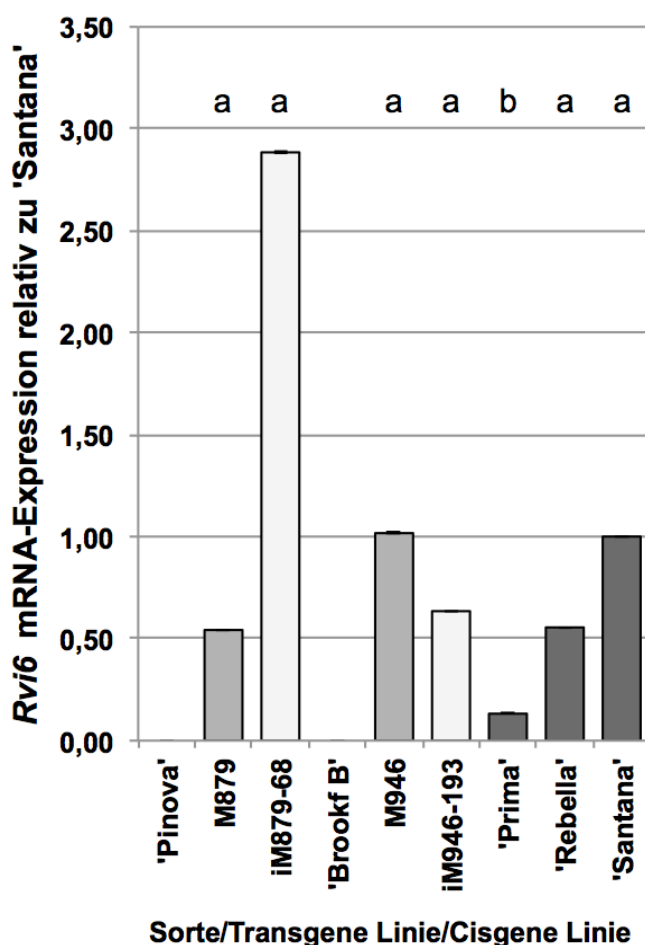


Abbildung 20 qRT-PCR-Analyse der *Rvi6* Genexpression in den cisgenen Apfelinien iM879-68 und iM946-193 relativ zur Sorte 'Santana'. Dazugehörige untransformierte Apfelsorten ('Pinova', 'Brookfield Baigent' ('Brookf B')) und transgene Ursprungslinien (M879, M946) sowie einige *Rvi6* tragende Apfelsorten ('Prima', 'Rebella', 'Santana') wurden ebenfalls untersucht. Der geometrische Mittelwert der drei analysierten biologischen Replikate ist dargestellt und der Standardfehler (\pm SE) als Fehlerbalken angegeben. Das Ergebnis des Tukey's (HSD) Tests ($p \leq 0,05$), zur Detektion von signifikanten Unterschieden, ist durch Kleinbuchstaben oberhalb der Balken gezeigt, wobei verschiedene Buchstaben einen signifikanten Unterschied zwischen Linien/Sorten bedeuteten. Modifiziert nach Würdigung et al (2015).

Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Für die untransformierten Sorten 'Pinova' und 'Brookfield Baigent' war keine *Rvi6* mRNA-Expression detektierbar. Die *Rvi6* mRNA-Expression der transgenen Ursprungslinien M879 und M946 betrug 0,5-fach bzw. 1,0-fach relativ zur Expression von 'Santana'. Die bestimmte *Rvi6* mRNA-Expression der Linie M879 entsprach dem Ergebnis aus der Evaluierung der transgenen Linien (siehe Kap. 3.2.1.5). Die *Rvi6* Expression der transgenen Linie M946 wurde erstmals bestimmt. 'Prima' und 'Rebella' zeigten eine 0,1-fache bzw. 0,6-fache Expression relativ zu 'Santana', was ebenfalls vorherigen Ergebnissen entsprach (vgl. Kap. 3.2.1.5). In der cisgenen Linie iM879-68 war das *Rvi6* Gen 2,9-fach relativ zu 'Santana' exprimiert. Die cisgene Linie zeigte somit eine mindestens 5-fach höhere Resistenzgenexpression als ihre transgene Ursprungslinie (M879). Im Falle der cisgenen Linie iM946-193 war das *Rvi6* mRNA-Expressionslevel, mit 0,6-fach relativ zu 'Santana', weniger stark vom *Rvi6* Expressionslevel ihrer transgenen Ursprungslinie (M946) abweichend. Zwischen den cisgenen Linien, transgenen Linien sowie den *Rvi6* tragenden Sorten 'Rebella' und 'Santana' lag kein signifikanter Unterschied in der *Rvi6* mRNA-Expression vor, angezeigt durch das Ergebnis des Tukey's (HSD) Tests der ANOVA (Abbildung 20). Eine Ausnahme stellte die *Rvi6* tragende Sorte 'Prima' dar, die signifikant geringere Mengen *Rvi6* mRNA als die anderen getesteten *Rvi6* tragende Linien und Sorten exprimierte.

3.2.4.5 Schorfresistenz

Die Schorfresistenz der cisgenen Apfelinien (iM879-68, iM946-193) wurde im Frühjahr 2014 durch eine künstliche Schorfinokulation mit dem *V. inaequalis* Einsporisolat 104 (Rasse 1) untersucht. Der Schorfresistenztest wurde wie für die transgenen Apfelinien durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.1.4). Die Bonitur erfolgte 28 dpi (Abbildung 21, Tabelle 6). Als Kontrollen dienten die untransformierten Apfelsorten 'Pinova' und 'Brookfield Baigent', die transgenen Ursprungslinien M879 und M946 sowie die Sorten 'Prima' (mit *Rvi6*) und 'Golden Delicious' (ohne *Rvi6*).

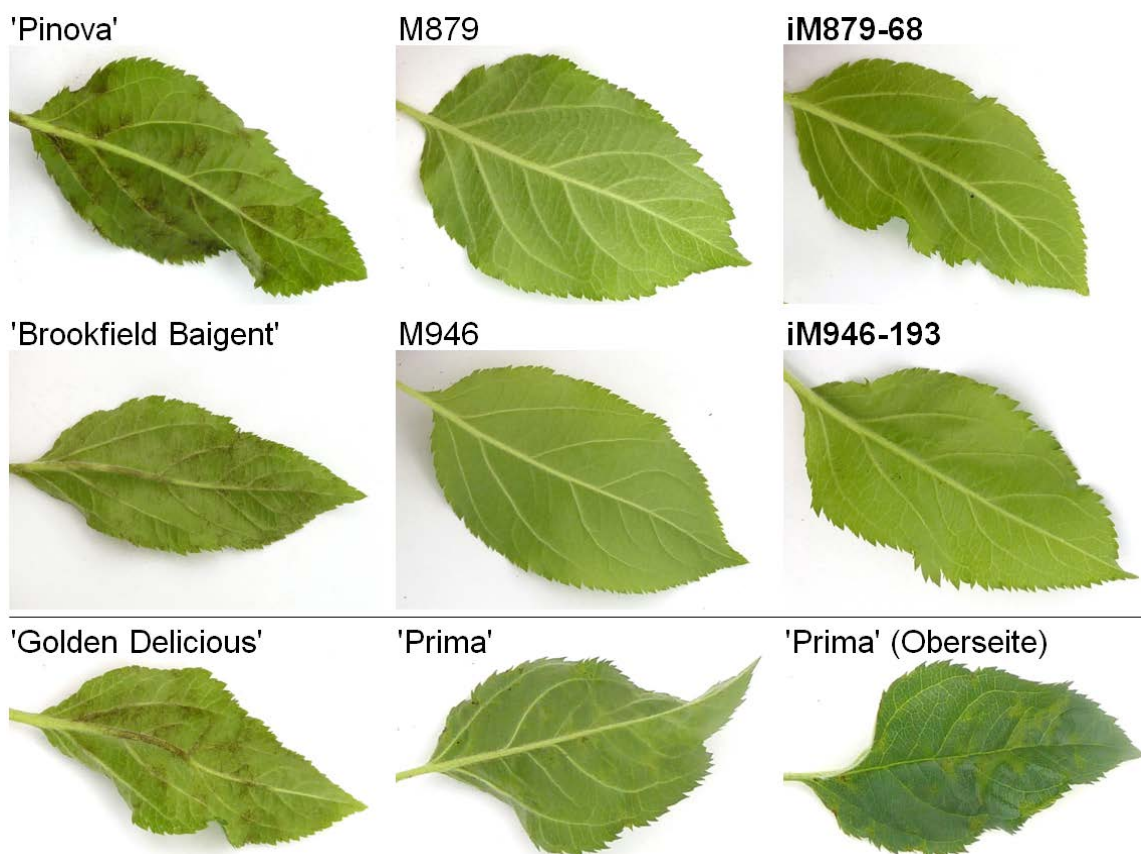


Abbildung 21 Blätter cisgener Apfellinien (iM879-68, iM946-193) und von dazugehörigen transgenen Ursprungslinien (M879, M946) sowie untransformierten Apfelsorten ('Pinova', 'Brookfield Baigent') inokuliert mit *V. inaequalis* Isolat 104, 28 Tage nach der Inokulation. Die Blätter der Kontrollsorten 'Prima' (mit *Rvi6*) und 'Golden Delicious' (ohne *Rvi6*) sind ebenfalls gezeigt. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Die beiden cisgenen Linien iM879-68 und iM946-193, die transgenen Ursprungslinien M879 und M946 sowie die *Rvi6* tragende Sorte 'Prima' waren resistent gegenüber dem *V. inaequalis* Isolat 104. Die untransformierten Sorten 'Pinova' und 'Brookfield Baigent' sowie die Kontrollsorte 'Golden Delicious' (ohne *Rvi6*) waren anfällig gegenüber dem *V. inaequalis* Isolat 104. Für die cisgenen Linien iM879-68 und iM946-193 hatte das Ausschneiden der Rekombinasekassette aus der im Apfelgenom integrierten T-DNA keinen Einfluss auf die Funktionalität des T-DNA transferierten Schorfresistenzgens *Rvi6*.

Tabelle 6 Charakterisierung der cisgenen Apfelinien bezüglich ihrer *Rvi6* mRNA-Expression und ihrer Schorfresistenz. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Apfelsorte/ Apfelinie	<i>Rvi6</i> Präsenz	<i>Rvi6</i> Expression relativ zu 'Santana' (\pm SE)	Evaluierung der Schorfresistenz							
			Jahr	Isolat 104 (Rasse 1), Pflanzen pro Klasse [n]					Schorf- resistenz (Rasse 1)	
				0	1	2	3a	3b		4
'Pinova'	-	nm	2014	0	0	1	0	0	9	nein
M879	+	0,54 (+/- 0,0003)	2014	6	0	6	0	0	0	ja
iM879-68	+	2,88 (+/- 0,0003)	2014	11	0	1	0	0	0	ja
'Brookf B'	-	nm	2014	0	0	0	0	0	12	nein
M946	+	1,02 (+/- 0,0009)	2014	6	0	4	1	0	0	ja
iM946-193	+	0,63 (+/- 0,0003)	2014	10	0	2	0	0	0	ja
'Golden D'	-	nu	2014	0	0	0	0	0	12	nein
'Prima'	+	0,13 (+/- 0,0002)	2014	0	0	3	9	0	0	ja
'Rebella'	+	0,55 (+/- 0,0015)	nu							
'Santana'	+	1,00 (+/- 0,0013)	nu							

Die *Rvi6* mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und relativ zu der Sorte 'Santana' (mit *Rvi6*) berechnet. Geometrischer Mittelwert und Standardfehler von drei untersuchten biologischen Replikaten sind angegeben. Die Schorfresistenz wurde gegenüber dem Einsporisolat 104 (bricht nicht *Rvi6*) durch künstliche Schorfinokulation im Gewächshaus evaluiert. Die Pflanzen wurden 28 dpi den Symptomklassen nach Chevalier et al (1991) zugeordnet: 0 – keine Symptome (resistent), 1 – *pinpoint pits* (resistent), 2 – chlorotische Läsionen (resistent), 3a – Chlorosen und Nekrosen ohne Sporulation (resistent), 3b – Chlorosen und Nekrosen mit leichter Sporulation (anfällig) oder 4 – starke Sporulation (anfällig). iM879-68, iM946-193 – cisgene Linien, erzeugt aus den transgenen Apfelinien M879 bzw. M946; M879, M946 – transgene Ursprungslinien; 'Pinova', 'Brookfield Baigent' ('Brookf B') – untransformierte Sorten; 'Golden Delicious' ('Golden D') – Sorte ohne *Rvi6*; 'Prima', 'Rebella', 'Santana' – *Rvi6* tragende Sorten; nu – nicht untersucht; nm – nicht messbar, SE – Standardfehler; + – vorhanden; - – nicht vorhanden.

3.2.5 Zusammenfassung

Die Transformation von sieben Apfelsorten mit dem Vektor p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 (Abbildung 1 C), welcher für die Herstellung von cisgenen schorfresistenten Apfelpflanzen konzipiert wurde, resultierte in insgesamt 22 transgenen Apfelinien für die Sorten 'Brookfield Baigent', 'Mitchgla', 'Novajo' und 'Pinova' (Tabelle 2). Die T-DNA transferierten Gene konnten in alle Linien mittels PCR nachgewiesen werden (Abbildung 10). Southern Blot Analysen belegten ein bis vier T-DNA-Integrationsorte in den Linien (Abbildung 11; Tabelle 3). Die Expression der Gene *nptII*, *dao1* und *Rvi6* wurde mit RT-PCR für alle Linien gezeigt. Das *flp* Gen wurde in keiner Linie transkribiert (Abbildung 12). Eine quantitative Analyse

der *Rvi6* mRNA-Expression mittels qRT-PCR zeigte eine vergleichbare Expression des Schorfresistenzgens *Rvi6* zwischen den getesteten Linien und *Rvi6* tragenden Sorten (Tabelle 3, Abbildung 14). Die Funktionalität des transferierten Schorfresistenzgens *Rvi6* konnte mit Schorfresistenztestungen für 16 Linien belegt werden. In den restlichen sechs Linien war *Rvi6* nicht funktionell (Tabelle 3).

Weitere Analysen wurden auf vier transgene Linien beschränkt, die besonders für die Produktion von cisgenen Apfelpflanzen geeignet waren (Kap. 3.2.1.6). Für diese Linien wurden die Genauigkeit und der Ort T-DNA-Integration bestimmt (Abbildung 15; Tabelle 4).

Für die Herstellung cisgener Linien wurden die gewählten transgenen Linien den HÜ „MSO“ und „Feuchtekammer“ unterzogen, um das Rekombinasesystems zu induzieren (Kap. 3.2.3). Aus diesem Ansatz konnte eine cisgene Linie für die Sorte 'Pinova' (iM879-68) und eine cisgene Linie für die Sorte 'Brookfield Baigent' (iM946-193) erfolgreich etabliert werden (Tabelle 5). Die cisgenen Linien wurden mittels PCR, Southern Blot Analysen und selektiven Agenzien eingehend evaluiert (Kap. 3.2.4). Alle Ergebnisse bestätigten die Linien als cisgen und belegten ein präzises Ausschneiden der Rekombinasekassette aus der im pflanzlichen Genom integrierten T-DNA. Die cisgenen Linien zeigten eine vergleichbare *Rvi6* mRNA-Expression wie ihre transgenen Ursprungslinien (M879 und M946) sowie traditionell gezüchtete *Rvi6* tragende Sorten (Abbildung 20, Tabelle 6) und erwiesen sich als schorfresistent gegenüber Isolat 104 (Abbildung 21, Tabelle 6). Das Ziel, cisgene schorfresistente Apfelpflanzen mit dem neu entwickelten Vektor p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 zu erzeugen, wurde erreicht.

3.3 Untersuchungen zum *Rvi15* Schorfresistenzlocus

3.3.1 Ausgangslage

Der Schorfresistenzlocus *Rvi15* (alte Bezeichnung: *Vr2*) auf LG 2 der *Malus* Akzession GMAL 2473 wurde erstmals im Jahr 2004 beschrieben (Patocchi et al, 2004). Der Locus umfasst eine Region von 48,6 kb, welche durch die Marker ARGH17 und 77G20RP begrenzt ist und die drei Schorfresistenzkandidatengene *Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C* beinhaltet (Abbildung 22).

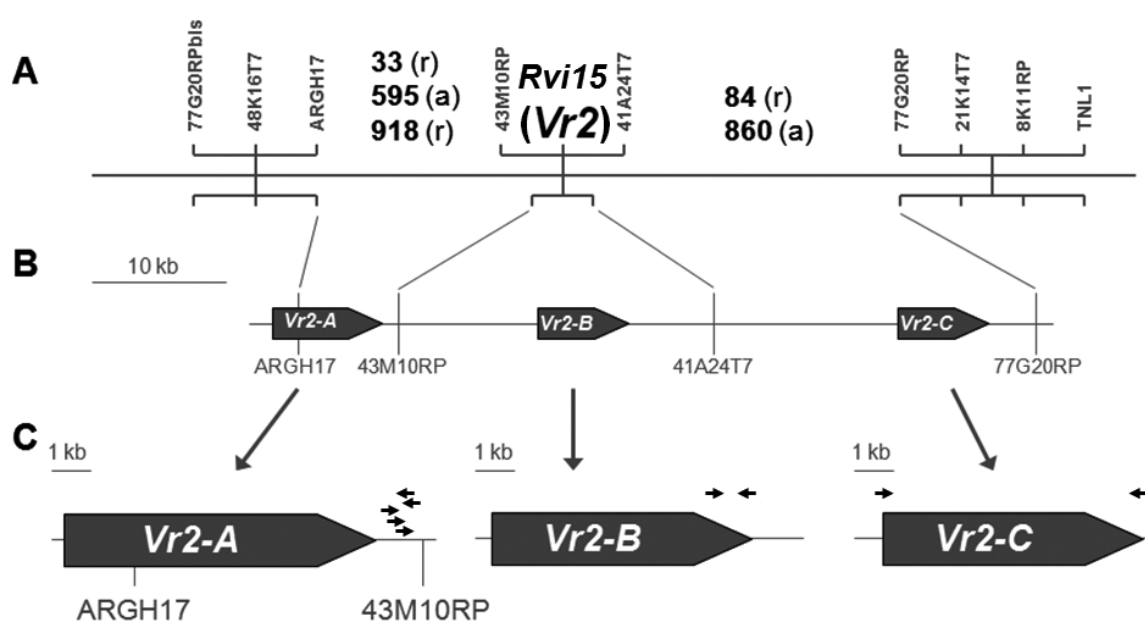


Abbildung 22 Schematische Darstellung des *Rvi15* (alte Bezeichnung: *Vr2*) Resistenzlocus mit den Schorfresistenzkandidatengenen *Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C*. **A** Genetische Karte des *Rvi15* Resistenzlocus. Die Lage verschiedener Marker (grau) ist angegeben. Der Rekombinationsbereich für die rekombinanten Pflanzen 33, 84, 595, 860 und 918 aus einer Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473 ist verzeichnet sowie ihre Schorfresistenz (r – resistent; a – anfällig) aufgeführt. **B** Physikalische Lage der Kandidatengene und einiger Marker am Schorfresistenzlocus *Rvi15*. **C** Schematische Darstellung der Hybridisierungsorte der verwendeten Primer (Pfeile) zum Nachweis der Kandidatengene *Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C*. Modifiziert nach Galli et al (2010a) und Saß (2013).

In einer Kartierungspopulation von 'Golden Delicious' × GMAL 2473 (Galli et al, 2010b) konnten für den *Rvi15* Locus fünf Pflanzen identifiziert werden, welche eine Rekombination zwischen den Markern ARGH17 und 21K14T7 aufzeigten (Abbildung 22). Von ausgewählten Nachkommen dieser Kartierungspopulation, einschließlich der rekombinanten Pflanzen (33, 84, 595, 860 und 918), wurden dem JKI Dresden-Pillnitz gDNA-Proben, molekulare Markerdaten sowie Angaben zu ihrer Schorfresistenz zur Verfügung gestellt (persönliche Kommunikation, Tabelle 7).

Tabelle 7 Molekulare Markerdaten und Schorfresistenzangaben ausgewählter Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473 (Galli et al, 2010a; Galli et al, 2010b und persönliche Mitteilung).

Nachkomme	Schorfanfälligkeit	Marker								
		77G20RPbis	48K16T7	ARGH17	<i>Rvi15</i> Locus (43M10RP; 41A24T7)	77G20RP	21K14 T7	8K11RP	TNL1	
33	resistent	aa	aa	aa	ab	k A	ab	ab	ab	
84	resistent	ab	ab	ab	ab	k A	aa	aa	aa	
595	anfällig	ab	ab	ab	aa	k A	aa	aa	aa	
860	anfällig	aa	aa	aa	aa	k A	ab	ab	ab	
918	resistent	aa	aa	aa	ab	k A	ab	ab	ab	
169	anfällig	aa	aa	aa	aa	k A	aa	aa	aa	
419	resistent	ab	ab	ab	ab	k A	ab	ab	ab	
551	resistent	ab	ab	ab	ab	k A	ab	ab	ab	
638	anfällig	k A	aa	aa	aa	k A	k A	k A	k A	
803	anfällig	aa	aa	aa	aa	k A	aa	aa	aa	
825	anfällig	aa	aa	aa	aa	k A	aa	aa	aa	
855	resistent	ab	ab	ab	ab	k A	ab	ab	ab	
934	anfällig	aa	aa	aa	aa	k A	aa	aa	aa	

Die gezeigten molekularen Marker befinden sich auf LG 2 und sättigen die Region des *Rvi15* Resistenzlocus. In der Kartierungspopulation wurden die Marker 43M10RP und 41A24T7 gekoppelt mit der *Rvi15* Resistenz vererbt. Der Marker 77G20RP amplifizierte für beide Eltern das gleiche Allel, wodurch keine Zuordnung zu einem Genotyp möglich war. Die Angaben zu den rekombinanten Pflanzen für die *Rvi15* Region sind fett dargestellt. aa (hellgrau) – Allel für den Genotyp 'Golden Delicious' (anfällig); ab (dunkelgrau) – Allel für den Genotyp GMAL 2473 (resistent); k A – keine Aussage möglich.

3.3.2 Aufgabenstellung

Auf Grundlage des zur Verfügung gestellten Materials konnten die Kandidatengene *Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C* durch einen PCR-basierten Ansatz gegebenenfalls als Schorfresistenz vermittelnde Gene ausgeschlossen werden. Dafür musste die Präsenz der Kandidatengene aus GMAL 2473 in den rekombinanten Pflanzen überprüft werden. Diese Arbeiten wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation realisiert.

3.3.3 Primerentwicklung

Um spezifische Primer zum Nachweis der Kandidatengen zu entwickeln, wurden im ersten Schritt bereitgestellte Nukleotidsequenzen aller drei Kandidatengene (persönliche Kommunikation) mit der Genomsequenz von 'Golden Delicious' abgeglichen (NCBI BLAST in der GDR Datenbank, Daten nicht gezeigt). Die proteinkodierende DNA-Sequenz des Kandidatengens *Vr2-A* aus GMAL 2473 konnte in fast identischer Form im schorfanfälligen Elter 'Golden Delicious' wiedergefunden werden. Die entsprechenden DNA-Abschnitte der Genotypen 'Golden Delicious' und GMAL 2473 unterschieden sich nur in wenigen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, *single nucleotide polymorphism*), wodurch die Entwicklung genspezifischer *Vr2-A* Primer stark eingeschränkt war. Der ARGH17 Marker ist im *Vr2-A* Kandidatengen lokalisiert (Abbildung 22). Der physikalische Abstand zwischen dem *Vr2-A* Stoppcodon und dem Marker 43M10RP betrug weniger als 1400 bp (Abbildung 22; Galli et al, 2010a). Um zu prüfen, ob die Rekombination zwischen dem *Vr2-A* Stoppcodon und dem Marker 43M10RP stattgefunden hat, wurde dieser Bereich genauer untersucht. Dafür wurden GMAL 2473 spezifische SNPs für den betreffenden Abschnitt identifiziert und anschließend SNP spezifische Primer für den Genotyp GMAL 2473 entwickelt sowie erfolgreich verschiedene Primerkombinationen etabliert (Abbildung 22). Die genkodierende Region für das Kandidatengen *Vr2-B* aus GMAL 2473 konnte nicht in zusammenhängender Form im Elter 'Golden Delicious' wiedergefunden werden. Unabhängig davon misslang die Etablierung einer Primerkombination, welche *Vr2-B* aus GMAL 2473 in voller Länge amplifizierte. Auf Grundlage einiger GMAL 2473 spezifischer SNPs nahe dem *Vr2-B* Stoppcoden (TAG) konnte eine Primerkombination zum spezifischen Nachweis des *Vr2-B* Kandidatengens aus dem Genotyp GMAL 2473 etabliert werden (Abbildung 22). Die genkodierende Region für das Kandidatengen *Vr2-C* aus GMAL 2473 konnte in ähnlicher Form im Elter 'Golden Delicious' wiedergefunden werden. Trotzdem gelang die Etablierung einer Primerkombination, welche das *Vr2-C* Kandidatengen in voller Länge spezifisch für den Genotyp GMAL 2473 amplifizierte. Die Etablierung aller Primerkombinationen (Daten nicht gezeigt) erfolgte an je zwei schorfanfälligen (169, 825) und zwei schorfresistenten (551, 855) Nachkommen, die keine Rekombination im *Rvi15* Resistenzlocus aufwiesen (Tabelle 7).

3.3.4 PCR-Screening innerhalb der Kartierungspopulation

PCR-Reaktionen mit allen etablierten Primerkombinationen wurden an dreizehn ausgewählten Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473 (Tabelle 7) durchgeführt (Abbildung 23). Die Intaktheit der verwendeten gDNA-Proben wurde durch den PCR-basierten Nachweis des Haushaltgens *EF1-α* belegt (Abbildung 23 D).

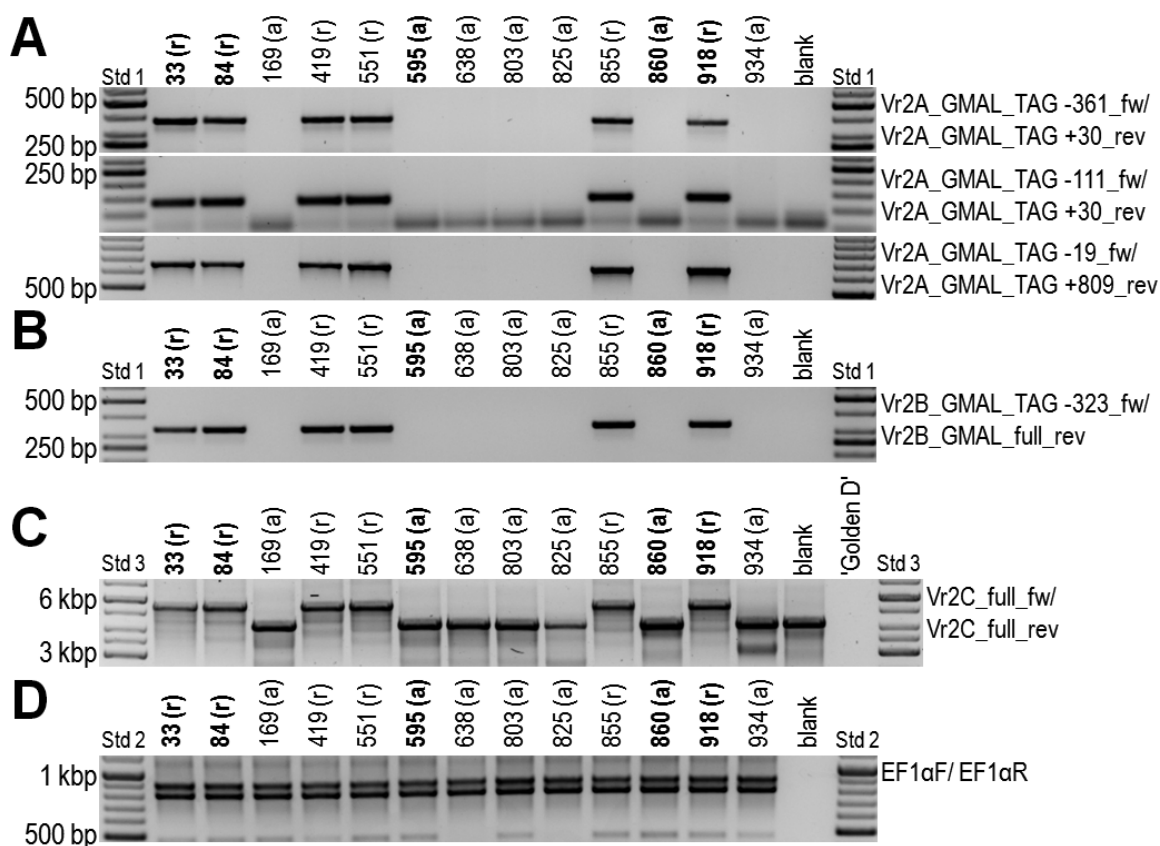


Abbildung 23 PCR-basierter Nachweis GMAL 2473 spezifischer SNPs stromabwärts von *Vr2-A* Kandidatengen (**A**) und PCR-basierter Nachweis der Kandidatengene *Vr2-B* (**B**) und *Vr2-C* (**C**) aus GMAL 2473 in ausgewählten Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473 (Galli et al, 2010b). Die Qualität der verwendeten gDNA wurde durch den PCR-basierten Nachweis des Haushaltgens *EF1-α* überprüft (**D**). Die verwendeten Primerkombinationen sind in der Abbildung angegeben. Die Schorfresistenz der Nachkommen ist vermerkt (a – anfällig und r – resistent) und die rekombinanten Pflanzen sind fett hervorgehoben. blank – Negativkontrolle, ddH₂O; 'Golden D' – 'Golden Delicious', ein Elter der Kartierungspopulation; bp – Basenpaare; kbp – Kilobasenpaare; Std 1/Std 2/Std 3 – Größenstandards, GeneRuler 50 bp/100 bp Plus/1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Modifiziert nach Saß (2013).

Der Abschnitt 387 bp bis 1382 bp stromabwärts vom *Vr2-A* Stoppcodon konnte mit drei etablierten GMAL 2473 spezifischen Primerkombinationen untersucht werden (Abbildung 22, Abbildung 23 A). Der SCAR Marker 43M10RP (Galli et al, 2010a) amplifizierte die Region 1332 bp bis 1869 bp stromabwärts vom *Vr2-A*

Stoppcodon (Daten nicht gezeigt). Die Primerkombinationen Vr2A_GMAL_TAG -361_fw/ +30_rev; Vr2A_GMAL_TAG -111_fw/ +30_rev und Vr2A_GMAL_TAG -19_fw/ +809_rev amplifizieren die Abschnitte 387 bp bis 771 bp; 635 bp bis 771 bp bzw. 727 bp bis 1382 bp stromabwärts vom Vr2-A Stoppcodon. Für alle überprüften schorfresistenten Nachkommen konnte der Genotyp GMAL 2473 stromabwärts vom Vr2-A Stoppcodon durch die Amplifikation eines PCR-Produktes mit allen drei etablierten Primerkombinationen nachgewiesen werden (Abbildung 23 A). Für die überprüften schorfanfälligen Nachkommen konnte mit den gleichen PCR-Reaktionen kein Produkt amplifiziert werden (Abbildung 23 A). Der PCR-basierte Nachweis des Vr2-B Kandidatengens aus GMAL 2473 war für alle getesteten schorfresistenten Nachkommen positiv, indem er ein PCR-Produkt ergab. Für die überprüften schorfanfälligen Nachkommen konnte kein Vr2-B PCR-Produkt amplifiziert werden (Abbildung 23 B). Der Nachweis des Vr2-C Kandidatengens aus GMAL 2473 (Nachweis des Gens in voller Länge) ergab für die überprüften schorfresistenten Nachkommen ein ca. 5,5 kbp großes PCR-Produkt, welches dem erwarteten Vr2-C spezifischen PCR-Produkt aus GMAL 2473 mit einer Größe von 5598 bp entsprach, und war somit positiv. Für alle getesteten schorfanfälligen Nachkommen ergab diese PCR ein unspezifisches Produkt mit einer Größe von ca. 4,2 kbp (Abbildung 23 C).

3.3.5 Zusammenfassung

Um den *Rvi15* Schorfresistenzlocus in Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473 genauer zu charakterisieren, wurden PCR-Reaktionen zum spezifischen Nachweis der Kandidatengene Vr2-B und Vr2-C aus dem Genotyp GMAL 2473 bzw. zum Nachweis GMAL 2473 charakteristischer SNPs stromabwärts des Vr2-A Kandidatengens entwickelt. Mit Ausnahme der Primerkombination für Vr2-C, basierte die Primerspezifität auf GMAL 2473 typischen SNPs. Der Nachweis des Kandidatengens Vr2-C erfolgte durch die Amplifikation des Kandidatengens in voller Länge.

Für alle getesteten schorfresistenten Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473, inklusive der rekombinanten Pflanzen 33, 84 und 918, ergaben die durchgeführten PCR-Reaktionen ein positives Ergebnis bzw. ein Produkt der erwarteten Größe. Für alle getesteten anfälligen Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473, inklusive der rekombinanten Pflanzen 595 und 860, ergaben dieselben

PCR-Reaktionen kein Produkt bzw. ein unspezifisches Produkt. Durch den umgesetzten PCR-basierten Ansatz konnte kein Kandidatengen des *Rvi15* Resistenzlocus aus GMAL 2473 als Schorfresistenz vermittelndes Gen identifiziert oder eindeutig ausgeschlossen werden.

3.4 *MYB10 (R6)* als Alternative zum Rekombinase-system für den cisgenetischen Ansatz beim Apfel

Für eine zuverlässige Nutzung des *MYB10 (R6)* Allels als apfeleigenen morphologischen Marker, ist die genaue Charakterisierung des *MYB10* Gens, insbesondere des Promotors, notwendig. Um dies zu erreichen, wurde der *MYB10* Promotor die für Akzessionen der *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden beschrieben (Abschnitt 3.4.1). Diese Ergebnisse wurden in Zusammenhang mit der Fruchtfleischfarbe der Akzessionen und den geografischen Ursprung der Apfelart gesetzt. So konnte der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des *MYB10 (R6)* Allels und der Fruchtfleischfarbe für den Apfel artübergreifend evaluiert werden (Abschnitt 3.4.1). In einem kleineren Komplex wurde die Eignung von *MYB10 (R6)* als Selektionsmarker für die Apfelsorte 'Pinova' getestet (Abschnitt 3.4.2).

3.4.1 Untersuchung von *MYB10* in der *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden

3.4.1.1 PCR-Screening des *MYB10* Promotors

Die Länge einer definierten *MYB10* Promotorregion wurde für 357 gewählte Akzessionen der *Malus* Sammlung per PCR untersucht. Dafür wurde die Primerkombination RE162_F/ *MYB10_R_rev* verwendet, welche die Mini- und Mikrosatellitenregion des *MYB10* Promotors überspannen (Abbildung 24). Für Akzessionen mit dem *MYB10 (R6)* Allel wurde ein 232 bp großes PCR-Produkt erwartet. Diese Größe konnte auf Grundlage einer publizierten Nukleotidsequenz von der rotfleischigen Apfelsorte 'Niedzwetzkyana' (GenBank: EU518250) kalkuliert werden. Für Akzessionen ohne *MYB10 (R6)* Allel wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von 131 bp erwartet. Für die Größenkalkulation wurden publizierte Nukleotidsequenzen von den Sorten *M. xdomestica* 'Golden Delicious' (GDR: MDC013323.19) und *M. xdomestica* 'Royal Gala' (GenBank: EU518249) verwendet. Dieses Allel von *MYB10* wurde als *MYB10 (R1)* bezeichnet (Abbildung 24).

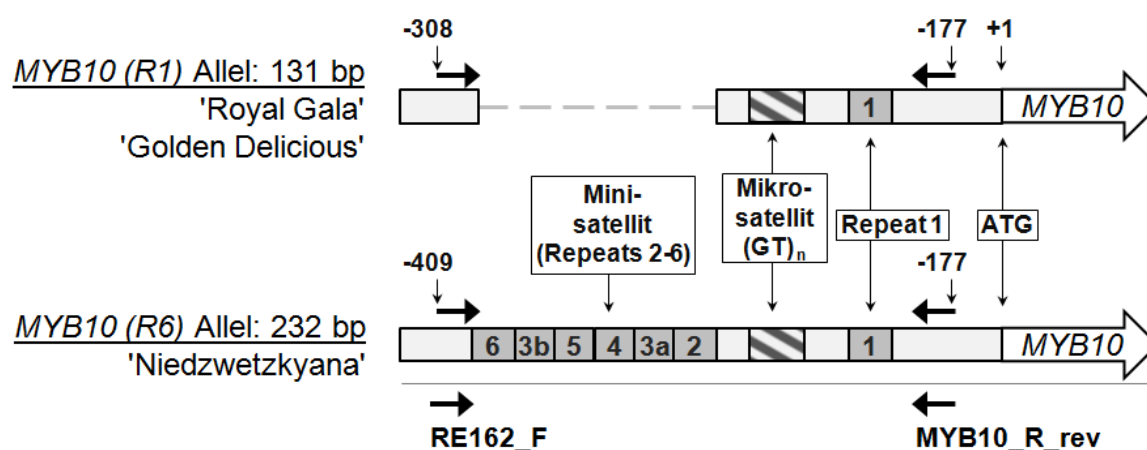


Abbildung 24 Schematische Darstellung der Hybridisierungsorte der Primer RE162_F und MYB10_R_rev (schwarze Pfeile) am *MYB10* Promotor des *MYB10 (R1)* und *MYB10 (R6)* Allels. Die Primerbindestellen wurden relativ zum Startcodon ATG des *MYB10* Gens berechnet. 'Royal Gala', 'Golden Delicious' – *M. xdomestica* Sorten mit gelblicher Fruchtfleischfarbe. 'Niedzwetzkyana' – rotfleischige Apfelsorte. Darstellung nach Würdig et al (2014), in Anlehnung an Espley et al (2009). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Elsevier unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045> verfügbar. The original source of publication is available at Elsevier via <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045>.

Die Auftrennung der amplifizierten PCR-Fragmente erfolgte im Agarosegel (Daten nicht gezeigt). Für die untersuchten Akzessionen wurden verschieden große PCR-Produkte, zwischen 100 bp und 1 kbp, detektiert. Von 16 ausgewählten Akzessionen sind die amplifizierten *MYB10* Allele in Abbildung 25 zu sehen. Von den 357 untersuchten Akzessionen der *Malus* Sammlung zeigten fünf Akzessionen ein ca. 1 kbp großes PCR-Fragment, was weder für das *MYB10 (R6)* Allel noch für das *MYB10 (R1)* Allel erwartet wurde (MAL0944 und MAL0945 in Abbildung 25). Dieses Fragment wurde nur für *M. xdomestica* bzw. *M. sieversii* Akzessionen amplifiziert, wobei für die *M. sieversii* Akzessionen MAL0945 ausschließlich das ca. 1 kbp große PCR-Fragment detektiert werden konnte (Abbildung 25). Die anderen vier Akzessionen zeigten neben dem 1 kbp großen Fragment noch ein weiteres kleineres PCR-Fragment zwischen 100-150 bp. Das *MYB10 (R6)* Allel konnte für 40 der 357 untersuchten Akzessionen detektiert werden (MAL0970, MAL0594, MAL0732, MAL0979, MAL0728 und MAL0125 in Abbildung 25). Drei dieser 40 Akzessionen zeigten ausschließlich das *MYB10 (R6)* Allel (MAL0970, MAL0594, MAL0979 in Abbildung 25). Die anderen 37 Akzessionen wiesen neben dem *MYB10 (R6)* Allel noch ein weiteres kleineres PCR-Produkt zwischen 100–150 bp auf. Die verbliebenen 312 Akzessionen zeigten nur PCR-Fragmente, die eine vergleichbare Größe zum *MYB10 (R1)* Allel aufwiesen, allerdings in ihrer Größe

zwischen 100 bis 150 bp variierten (MAL0516, MAL0267, MAL0774, MAL0341, MAL0741, MAL0224, MAL544 und M0322 in Abbildung 25).

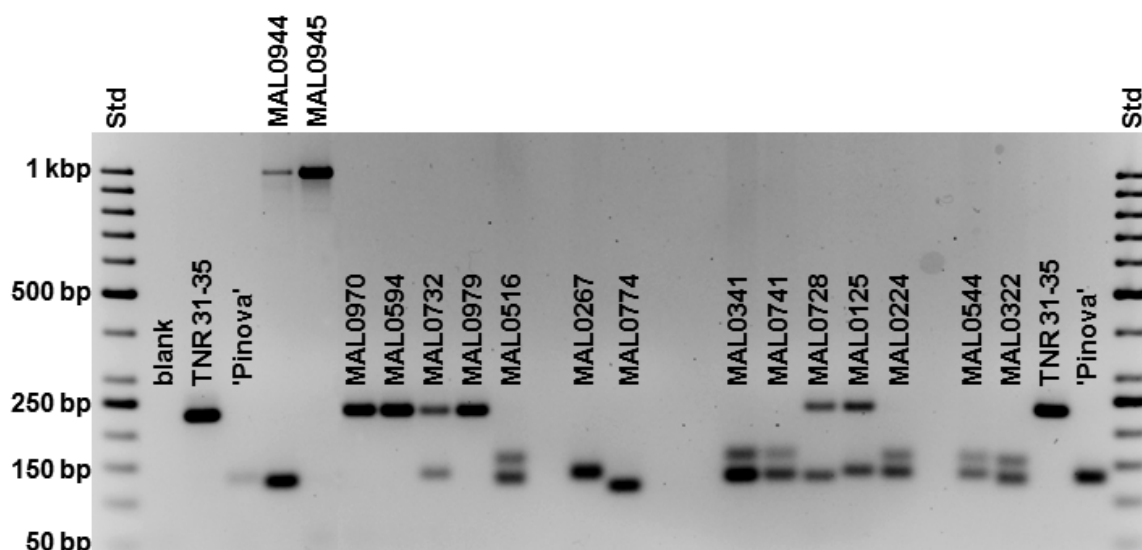


Abbildung 25 Amplifizierte *MYB10* Allele für 16 Akzessionen der *Malus* Sammlung (Präfix MAL) unter Verwendung der Primer RE162_F und MYB10_R_rev. Std – Größenstandard, GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); blank – Negativkontrolle, ddH₂O; TNR 31-35 – *Malus* Genotyp, in dem das *MYB10* (*R6*) Allel homozygot vorliegt (Lespinasse und Godicheau, 1980); 'Pinova' – *M. × domestica* Sorte mit *MYB10* (*R1*) Allel; bp – Basenpaare; kbp – Kilobasenpaare. Modifiziert nach Würdig et al (2014). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Elsevier unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045> verfügbar. The original source of publication is available at Elsevier via <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045>.

Um die exakte Größe der amplifizierten *MYB10* Allel PCR-Produkte zu bestimmen, wurden eine Fragmentgrößenanalyse (Kap. 2.2.10.2) unter Verwendung der Primer RE162_F (BMN-5 markiert) und MYB10_R_rev durchgeführt. Für 351 von 357 analysierten Akzessionen konnten die exakten Größen der amplifizierten PCR-Produkte bestimmt werden. Insgesamt wurden 656 PCR-Fragmente detektiert (Abbildung 26).

Die Analysen ergaben 31 verschiedene Fragmentgrößen zwischen 122 und 427 bp. Das ~1 kbp große PCR-Fragment konnte mit dieser Methode nicht erkannt werden, da die Größe sich außerhalb des Detektionsbereiches befand. Insgesamt 62 % der detektierten PCR-Produkte hatten eine Größe von 127 bp, 129 bp, 134 bp bzw. 133 bp, diese Produkte kamen am häufigsten vor. Ein 236 bp große PCR-Fragment wurde für 40 Akzessionen detektiert. Diese Fragmentgröße repräsentierte das 232 bp große *MYB10* (*R6*) Allel, was durch Sequenzierungen belegt werden konnte (Kap. 3.4.1.2). Mit der Fragmentgrößenanalyse wurden PCR-Produkte detektiert, welche im Agarosegel

nicht sichtbar waren, im Speziellen PCR-Produkte > 150 bp (Daten nicht gezeigt). Pro Akzession konnten ein bis vier verschieden große PCR-Fragmente detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

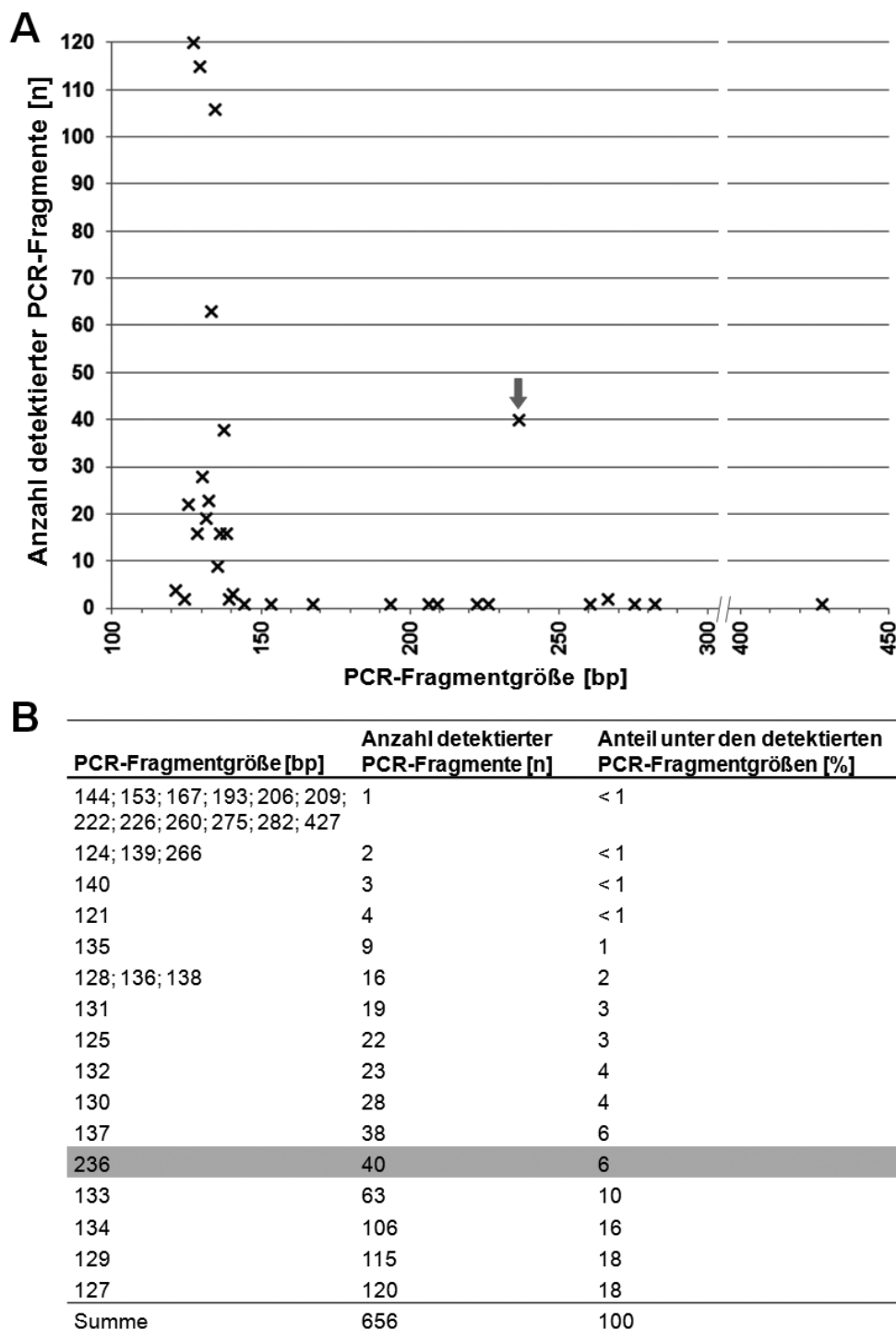


Abbildung 26 Exakte Fragmentgrößenbestimmung der amplifizierten *MYB10* Allele für 351 Akzessionen der *Malus* Sammlung. **A** Anzahl der detektierten PCR-Fragmente aufgetragen in Abhängigkeit von der PCR-Produktgröße. **B** Zusammenfassung der Fragmentgrößenanalyse der *MYB10* Allele. Die das *MYB10* (*R6*) Allel repräsentierende Fragmentgröße ist mit einem grauen Pfeil markiert bzw. grau hinterlegt und betrug bei dieser Methode 236 bp. Modifiziert nach Würdig et al (2014). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Elsevier unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045> verfügbar. The original source of publication is available at Elsevier via <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045>.

3.4.1.2 Sequenzanalyse verschiedener *MYB10* Allele

Für eine genauere Beschreibung der verschiedenen detektierten *MYB10* Allele, wurden insgesamt 21 amplifizierte *MYB10* Allele (Primerkombination RE162_F/ MYB10_R_rev, siehe Abbildung 24) sequenziert (Tabelle 8). Von den 21 Sequenzen stammten 20 Sequenzen von 19 verschiedenen Akzessionen der *Malus* Sammlung (für die Akzession MAL0055 wurden zwei verschiedene *MYB10* Allele sequenziert) und eine Sequenz von *M. xdomestica* 'Pinova'. Von den 21 sequenzierten Allelen entsprachen zwei Fragmente dem ~1kbp großem *MYB10* Allel, vier Fragmente dem *MYB10* (R6) Allel und fünfzehn Fragmente dem *MYB10* (R1) Allel. Als Referenzen sind entsprechende *MYB10* Allelsequenzen publizierter Sequenzen von *M. xdomestica* 'Golden Delicious', *M. xdomestica* 'Royal Gala' und der Apfelsorte 'Niedzwetzkyana' mit aufgeführt. Für fast alle sequenzierten Fragmente konnte mittels Fragmentgrößenanalyse (siehe Abschnitt 3.4.1.1) ein entsprechendes, bis zu 6 bp größeres, PCR-Fragment detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Der Größenunterschied war auf die verwendete Einstellungen bei der Peakdetektion mit dem Kapillarsequenziergerät zurückzuführen.

Ein Vergleich aller sequenzierter *MYB10* Allele offenbarte eine konservierte Region stromabwärts des Mikrosatelliten (GT)_n, welche den Repeat 1 des Minisatellitenmotives enthielt (Abbildung 27, Tabelle 8).

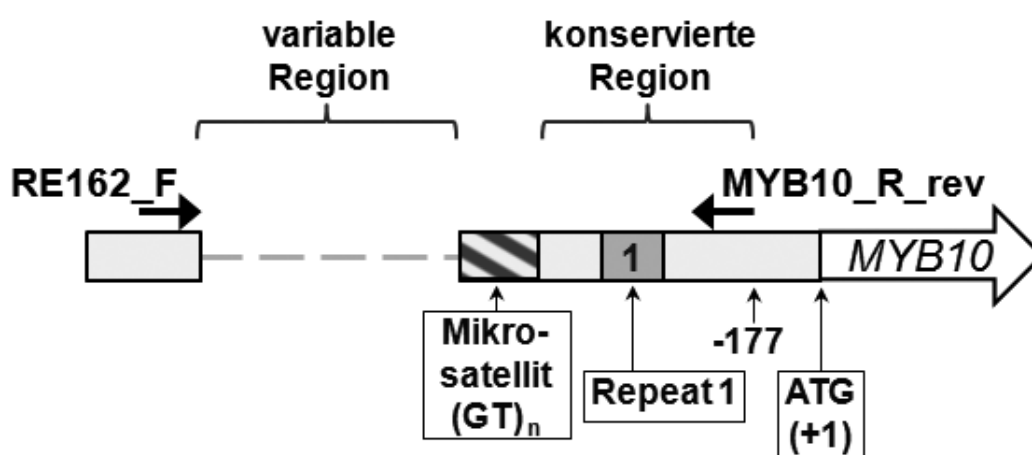


Abbildung 27 Generelle Struktur des *MYB10* Promotors auf Basis der 21 sequenzierten *MYB10* Allele. Modifiziert nach Würdig et al (2014). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Elsevier unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045> verfügbar. The original source of publication is available at Elsevier via <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045>.

Tabelle 8 Übersicht zu den sequenzierten *MYB10* Allelen ausgewählter Akzessionen der *Malus* Sammlung und der Sorte *M. xdomestica* 'Pinova'. Modifiziert nach Würdig et al (2014). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Elsevier unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045> verfügbar. The original source of publication is available at Elsevier via <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045>.

Akzession/ Sorte	Fragmentgröße [bp]/ Allel	GenBank Eintrag/GDR contig	Gr im Phyl tree	Minisatellitenmotiv			Minisatellitenmotiv			Länge (GT) _n			
				17. Position	Repeats [n]	stromaufwärts		stromabwärts		direkt	39 bp*	45 bp*	47 bp
						21 bp*	12 bp*	direkt	GCACGT				
MAL0236	123/MYB10 (R1)	KJ137207	II_b	A	1	T	T	-	3	GCACGT	A	T	T
MAL0774	119/MYB10 (R1)	KJ137206	II_c	A	1	T	T	-	4	-	A	T	T
MAL0055	125/MYB10 (R1)	KJ137216	II_c	A	1	T	T	-	7	-	A	T	T
MAL0267	131/MYB10 (R1)	KJ37217	II_c	A	1	T	T	-	10	-	A	T	T
MAL0174	135/MYB10 (R1)	KJ137219	IV	A	1	G	A	TT	11**	-	A	T	T
MAL0768	147/MYB10 (R1)	KJ137218	IV	A	1	G	A	TT	17	-	A	T	T
MAL0200	129/MYB10 (R1)	KJ137212	I	A	1	T	T	GA	8	-	G	T	T
M. xdomestica 'Royal Gala'	131/MYB10 (R1)	EU518249	I	A	1	T	C	GA	9	-	G	T	T
MAL0055	131/MYB10 (R1)	KJ137210	I	A	1	T	C	GA	9	-	G	T	T
MAL0373	131/MYB10 (R1)	KJ37220	I	A	1	T	C	GA	9	-	G	T	T
MAL0421	131/MYB10 (R1)	KJ137208	I	A	1	T	C	GA	9	-	G	T	T
MAL0714	131/MYB10 (R1)	KJ137209	I	A	1	T	C	GA	9	-	G	T	T
M. xdomestica 'Golden Delicious'	131/MYB10 (R1)	MDC013323.19	I	W	1	T	Y	GA	9	-	G	T	T
M. xdomestica	131/MYB10 (R1)	KJ137211	III	A	1	C	C	GA	9	-	G	T	T

Akzession/ Sorte	Fragmentgröße [bp]/ Allel	GenBank Eintrag/GDR contig	Gr im Phyl tree	Minisatellitenmotiv			Minisatellitenmotiv											
				17. Position	Repeats [n]	stromaufwärts		stromabwärts										
						21 bp*	12 bp*	direkt	direkt	39 bp*	45 bp*	47 bp						
'Pinova'																		
MAL0703	132/MYB10 (R1)	KJ137215	Il_a	A	1	T	T	CGAGTGTGTC	6	-	A	A	-	-	-	-	-	-
MAL0341	134/MYB10 (R1)	KJ137214	Il_a	A	1	T	T	CGAGTGTGTC	7	-	A	A	-	-	-	-	-	-
MAL0516	134/MYB10 (R1)	KJ137213	Il_a	A	1	T	T	CGAGTGTGTC	7	-	A	A	-	-	-	-	-	-
MAL0346	232/MYB10 (R6)	KJ137202	V	T	6	-	-	Minisatellit (R 2-6)	7	-	G	T	T	T	T	T	T	T
MAL0587	232/MYB10 (R6)	KJ137204	V	T	6	-	-	Minisatellit (R 2-6)	7	-	G	T	T	T	T	T	T	T
MAL0738	232/MYB10 (R6)	KJ137203	V	T	6	-	-	Minisatellit (R 2-6)	7	-	G	T	T	T	T	T	T	T
MAL0793	232/MYB10 (R6)	KJ137205	V	T	6	-	-	Minisatellit (R 2-6)	7	-	G	T	T	T	T	T	T	T
'Niedzweitzkyana'	232/MYB10 (R6)	EU518250	V	T	6	-	-	Minisatellit (R 2-6)	7	-	G	T	T	T	T	T	T	T
MAL0214	986/ ~1 kbp Allel	KJ137200	I	T	1	-	-	857 bp Insertion	8	-	G	T	T	T	T	T	T	T
MAL0945	981/ ~1 kbp Allel	KJ137201	I	T	1	-	-	852 bp Insertion	9	-	G	T	T	T	T	T	T	T

Für Vergleichszwecke sind die publizierten MYB10 Allelsequenzen von *M. domestica* 'Royal Gala' (EU518249) und der Apfelsorte 'Niedzweitzkyana' (EU518250) sowie die MYB10 Allelsequenz von *M. domestica* 'Golden Delicious' aus der *Genome Database for Rosaceae* mit angegeben. - -- nicht präsent; R – Repeat (Wiederholung); GDR – *Genome Database for Rosaceae*; bp – Basenpaare; kbp – Kilobasenpaare; Gr im *Phyl tree* – Gruppe im Phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 28); A, C, G T – Nukleinbasen Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin; *SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) Position; **Repeat 4 des Mikrosatelliten (GT) hat die Sequenz TT, ursächlich dafür könnte ein Basenaustausch sein.

Die amplifizierten *MYB10* Allelsequenzen unterschieden sich stromabwärts vom Mikrosatelliten (GT)_n nur in den Positionen 39 bp, 45 bp bzw. 47 bp, was den Positionen -212, -206 bzw. -204 relativ zum Startcodon ATG entsprach. Für die beiden erstgenannten Positionen lag ein SNP vor. Die Position 47 bp stromabwärts vom Mikrosatelliten (GT)_n war in drei analysierten Sequenzen deletiert. Eine Ausnahme stellte das *MYB10* (*R1*) Allel der Akzession MAL0236 dar, hier lag zusätzlich eine 6 bp große Insertion direkt stromabwärts vom Mikrosatelliten (GT)_n vor.

Für alle amplifizierten *MYB10* Allelsequenzen wurde ein weiterer SNP an der 17. Position des 23 bp langen Minisatellitenmotives detektiert, wo entweder ein Adenin oder ein Thymin vorlag (Tabelle 8). Alle sequenzierten *MYB10* (*R1*) Allele zeigten die Base Adenin an dieser Position des Minisatellitenmotives (Repeat 1). Im Gegensatz dazu war für alle Repeats der sequenzierten *MYB10* (*R6*) Allele und für das Repeat 1 der zwei sequenzierten ~1kbp großen *MYB10* Allele die Base Thymin an dieser Position nachweisbar.

Weitere Unterschiede zwischen den sequenzierten *MYB10* Promotorallelen wurden hauptsächlich innerhalb und direkt stromaufwärts des Mikrosatelliten (GT)_n gefunden. Die Region stromaufwärts vom Mikrosatelliten wurde als variabel eingeschätzt, wo SNPs, Insertionen und Deletionen auftreten konnten (Abbildung 27, Tabelle 8).

3.4.1.2.1 Sequenzanalyse der *MYB10* (*R1*) Allele

Die fünfzehn sequenzierten *MYB10* (*R1*) Allele konnten durch ihre Sequenz als solche bestätigt werden und waren zu großen Teilen untereinander identisch. Die Größe der sequenzierten Fragmente lag zwischen 119 bp und 147 bp (Tabelle 8). Diese Größenvariabilität ergab sich hauptsächlich aus der unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen der Mikrosatellitensequenz (GT)_n und kleineren Unterschieden (Insertionen bzw. Deletionen), die sich direkt stromaufwärts von Mikrosatelliten befanden.

3.4.1.2.2 Sequenzanalyse der *MYB10* (*R6*) Allele

Alle sequenzierten *MYB10* (*R6*) Allele wiesen das repetierte Minisatellitenmotiv stromaufwärts vom Mikrosatelliten (GT)_n auf und waren somit als *MYB10* (*R6*) Allele identifizierbar, die sich klar von den sequenzierten *MYB10* (*R1*) Allelen unterschieden (Tabelle 8). Fast alle sequenzierten *MYB10* (*R6*) Allele waren zur publizierten *MYB10* (*R6*) Allelsequenz von 'Niedzwetzkyana' (GenBank:

EU518250) identisch. Die *MYB10 (R6)* Sequenzen von MAL0346 und MAL0738 unterschieden sich zur Sequenz von 'Niedzwetzkyana' in einem Basenaustausch im Repeat 4 bzw. 3a des Minisatelliten (in Tabelle 8 nicht angegeben).

3.4.1.2.3 Sequenzanalyse der ~1 kbp Allele

Die zwei sequenzierten ~1 kbp Allele enthielten eine 857 bp (MAL0214) bzw. 852 bp (MAL0945) große Insertion, direkt stromaufwärts vom Mikrosatelliten (GT)_n (Tabelle 8). Die inserierten Sequenzen von MAL0214 und MAL0945 waren untereinander nahezu identisch, sie unterschieden sich in nur zwei Basenaustauschen und insgesamt fünf deletierten Nukleotiden im Allel von MAL0945. NCBI Nucleotide BLAST Analysen ergaben Sequenzähnlichkeiten zwischen Teilen des Inserts und Genen für F-Box Proteine und S-Ribonukleasen von *Pyrus pyrifolia*. Weitere Sequenzhomologien lagen zum zweiten Intron des *LFY* Gens von *Pyrus fauriei* vor. Für den mittleren Teil des Inserts konnten keine homologen Sequenzen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Eine NCBI BLAST Analyse in der GDR Datenbank zeigte eine Vielzahl homologer Sequenzen auf mehreren LGs von 'Golden Delicious'. Für zwei Teile des Inserts (55 bp und 75 bp groß) konnten keine homologen Sequenzen im 'Golden Delicious' Genom gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Die inserierte Sequenz wurde auf das Vorhandensein von repetitiven Elementen (z. B. Retrotransposons) hin mit dem Programm *RepeatMasker* unter Verwendung der *M. xdomestica* spezifischen Einstellungen von der *Replibase* Datenbank untersucht. Das Insert wurde als ein putatives nicht-autonomes DNA-Transposon der Harbinger Familie vom Apfel, mit dem Namen DNA3-8_Mad, identifiziert (Bao und Jurka, 2010). Die das Insert flankierenden Sequenzen konnten das ~1 kbp große Allel als ein *MYB10* spezifisches Allel bestätigen.

3.4.1.2.4 Phylogenetische Stammbaumanalyse

Eine phylogenetische Stammbaumanalyse der 24 analysierten Nukleotidsequenzen (Tabelle 8) ergab einen Baum mit fünf deutlichen Gruppen (Abbildung 28). Die *MYB10 (R6)* Sequenzen bildeten die Gruppe V, welche die größte genetische Distanz zu den anderen Gruppen aufwies. Die zwei ~1 kbp großen *MYB10* Allele clusterten mit sieben anderen *MYB10 (R1)* Allelsequenzen in Gruppe I. Die Gruppen II bis IV setzten sich ausschließlich aus *MYB10 (R1)* Allelen zusammen. Die genetische Stammbaumanalyse belegte eine engere Verwandtschaft zwischen den *MYB10 (R1)* Allelen und dem ~1 kbp großen

MYB10 Allelen als zu den *MYB10* (*R6*) Allelen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten bestimmter *MYB10* Allele und einer *Malus* Spezies oder zum geografischen Ursprung der *Malus* Spezies festgestellt werden.

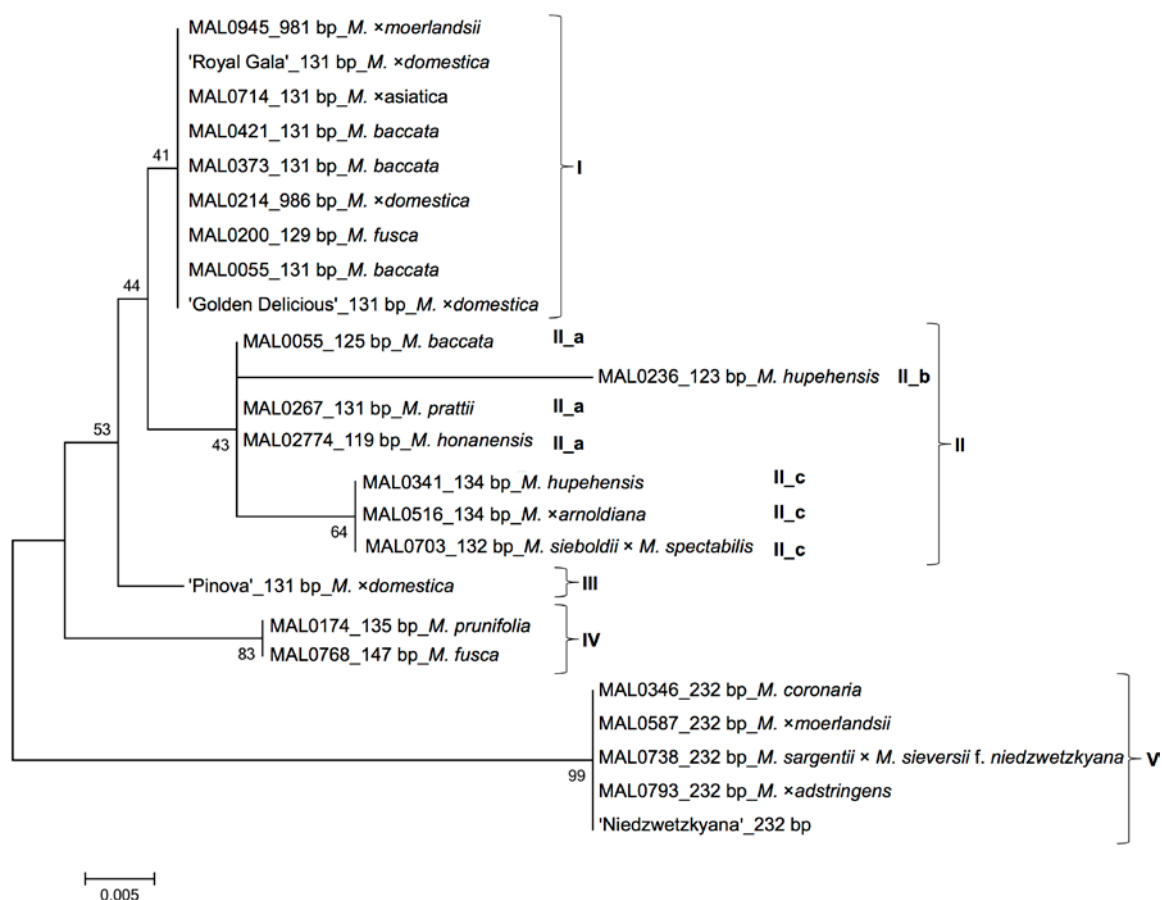


Abbildung 28 Phylogenetischer Stammbaum auf Basis von 24 *MYB10* Allelsequenzen. 21 Sequenzen wurden mit der Primerkombination RE162_F/ MYB10_R_rev amplifiziert. Drei weitere Sequenzen wurden den Datenbanken NCBI bzw. GDR entnommen. Die Stammbaumanalyse erfolgte mit MEGA 6.06 unter Verwendung der *Neighbor-joining* Methode (1000 *bootstrap* Wiederholungen). Die Darstellung des Stammbaums ist bei 40 % kondensiert. Ein *rooting* wurde nicht durchgeführt. Die *Malus* Spezies der Akzessionen und die Größe des verrechneten PCR-Fragmentes sind vermerkt. Die einzelnen Gruppen sind mit römischen Zahlen markiert.

3.4.1.3 Evaluierung der Fruchtfleischfarbe

Für die untersuchten Akzessionen der *Malus* Sammlung wurde die Farbe des Fruchtfleisches bereits in einer vorhergehenden Dissertation evaluiert (Ali, 2011). Die Einteilung erfolgte dabei in sechs verschiedene Kategorien (Abbildung 29).



Abbildung 29 Boniturnoten für Deskriptor Nr. 53 „Farbe des Fruchtfleisches“ gemäß den UPOV Richtlinien für Apfel (UPOV, 2005).

Akzessionen, die ein blassrosa oder rötlich gefärbtes Fruchtfleisch aufwiesen, wurden 2012 erneut evaluiert. Die vorliegenden Daten konnten verifiziert werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist Tabelle 9 zu entnehmen. Für 353 der 357 untersuchten Akzessionen war die Fruchtfleischfarbe determinierbar. Am häufigsten kam die Fruchtfleischfarbe gelblich vor, sie wurde für 32 % der Akzessionen bonitiert. Des Weiteren wurden die Fruchtfleischfarben grünlich, weiß und cremefarben bei 27 %, 17 % bzw. 13 % der evaluierten Akzessionen bonitiert. Für 10 % der untersuchten Akzessionen konnte rot pigmentiertes Fruchtfleisch bonitiert werden, wobei in die Farbabstufungen blassrosa (7 %) und rötlich (3 %) unterschieden wurde.

Tabelle 9 Fruchtfleischfarbe der 357 untersuchten Akzessionen der *Malus* Sammlung. Modifiziert nach Würdig et al (2014). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Elsevier unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045> verfügbar. The original source of publication is available at Elsevier via <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045>.

Deskriptor Nr. 53 (UPOV, 2005)		
Boniturnote	Farbe des Fruchtfleisches	Akzessionen [n]
1	weiß	60
2	cremefarben	45
3	gelblich	114
4	grünlich	97
5	blassrosa	26
6	rötlich	11
	nicht bestimmbar	4
	Summe	357

Die Fruchtfleischfarbe von vier Akzessionen war aufgrund fehlender Früchte nicht bestimmbar.

3.4.1.4 Zusammenhang zwischen dem *MYB10* (R6) Allel, rot pigmentierter Fruchtfleischfarbe und dem geografischen Ursprung der betreffenden *Malus* Spezies

Das *MYB10* (R6) Allel war für 40 der 357 analysierten Akzessionen der *Malus* Sammlung nachweisbar (Abschnitt 3.4.1.1 und Tabelle 10). Zu diesen 40 Akzessionen gehörten die 37 Akzessionen, für welche rot pigmentiertes Fruchtfleisch bonitiert wurde (Tabelle 9). Für diese 37 Akzessionen konnte somit das *MYB10* (R6) Allel als Ursache für die rote Fruchtfleischfarbe belegt werden. Unter allen analysierten Akzessionen konnte keine rotfleischige Akzession ohne *MYB10* (R6) Allel identifiziert werden.

Für drei Akzessionen (MAL0346; MAL0738 und MAL0793) mit *MYB10* (R6) wurde kein rot pigmentiertes Fruchtfleisch bonitiert (Tabelle 10, Abbildung 30). Eine Sequenzierung der amplifizierten *MYB10* (R6) Allele dieser drei Akzessionen ergab Sequenzen, die identisch bzw. nahezu identisch zum publizierten *MYB10* (R6) Allel von 'Niedzwetzkyana' (GenBank: EU518250) waren (siehe Abschnitt 3.4.1.2 und Tabelle 8).

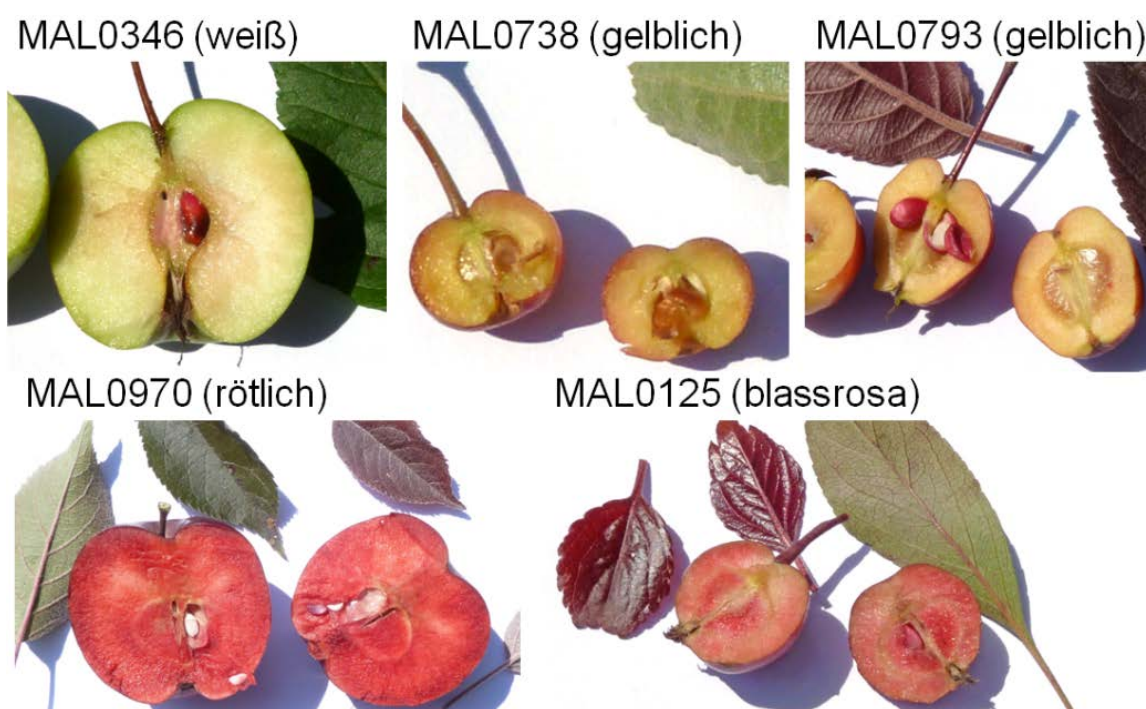


Abbildung 30 Halbierte Früchte ausgewählter Akzessionen der *Malus* Sammlung. Die bonitierte Fruchtfleischfarbe ist in Klammern angegeben. Für alle fünf gezeigten Akzessionen war das *MYB10* (R6) Allel nachweisbar (siehe Abbildung 25 bzw. Abschnitt 3.4.1.2). Die Früchte sind nicht im gleichen Maßstab dargestellt. Modifiziert nach Würdiger et al (2014). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Elsevier unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045> verfügbar. The original source of publication is available at Elsevier via <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045>.

Für eine phänotypische Beschreibung dieser drei Akzessionen wurden Bonituren im Freiland durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Alle drei Akzessionen entwickelten rot pigmentierte junge Blätter. Gleiches konnte auch für die anderen 37 Akzessionen mit *MYB10 (R6)* Allel beobachtet werden (Daten nicht gezeigt; Abbildung 30). Die Petalen von MAL0346 und MAL0738 waren leicht pink im Ballonstadium und leicht pink bzw. weiß in der Vollblüte. Die Akzession MAL0793 zeigte dunkelrote Petalen im Ballonstadium bzw. pinkfarbene Petalen in der Vollblüte. Im Vergleich dazu waren die Petalen der 37 Akzessionen, die rot pigmentiertes Fruchtfleisch ausprägten, in allen Blütenstadien intensiv rot, lila oder pink gefärbt (Daten nicht gezeigt). Die Akzessionen MAL0346 und MAL0793 zeigten, wie die anderen 37 Akzessionen mit *MYB10 (R6)* Allel, eine rot pigmentierte Testa (Daten nicht gezeigt; Abbildung 30).

Das *MYB10 (R6)* Allel konnte für drei Primärarten (*Malus hupehensis*, *M. sieversii* f. *niedzwetzkyana* und *Malus coronaria*), sechs Arthybriden (*Malus xadstringens*, *M. xdomestica*, *Malus xmoerlandsii*, *Malus xpurpurea*, *Malus xsoulardii* und *Malus xzumii*) und sieben synthetische Hybriden der *Malus* Sammlung nachgewiesen werden (Tabelle 10). Zwei der drei betreffenden Primärarten und alle sechs betreffenden Arthybriden waren ursprünglich in Asien beheimatet. Eine Akzession mit *MYB10 (R6)* Allel (MAL0346) war der Primärart *M. coronaria* zugeordnet, die ursprünglich aus Nordamerika stammte. Die sieben synthetischen Hybriden mit *MYB10 (R6)* Allel wiesen mindestens ein Elter von einer Primärart oder Arthybride auf, für die das Vorhandensein des *MYB10 (R6)* Allels gezeigt werden konnte (Tabelle 10).

Tabelle 10 *Malus* Spezies bzw. *Malus* Spezies der Eltern (bei synthetischen Hybriden) aller Akzessionen mit *MYB10* (R6) Allel von den 357 untersuchten Akzessionen der *Malus* Sammlung. Modifiziert nach Würdig et al (2014). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Elsevier unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045> verfügbar. The original source of publication is available at Elsevier via <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045>.

Primärrart/Arthybride/Synthetische Hybride	Akz. [n]	<i>MYB10</i> (R6)	blassrosa/rötlich	Geografischer Ursprung der Primärrart/Arthybride
Primärrart [ggf. Akzessionsnummer]				
<i>M. hupehensis</i>	1	+	+	China, Taiwan ¹
<i>M. sieversii</i> f. <i>niedzwetzkyana</i>	3	+	+	Asien ¹
<i>M. coronaria</i> [MAL0346]	1	+	- (weiß)	Nordamerika ¹
Arthybride (Genetischer Ursprung) [ggf. Akzessionsnummer]				
<i>M. ×adstringens</i> (<i>M. baccata</i> × <i>M. pumila</i> ²)	6	+	+	Asien ¹ (<i>M. baccata</i>); Osteuropa ² (<i>M. pumila</i>)
<i>M. ×adstringens</i> (<i>M. baccata</i> × <i>M. pumila</i> ²) [MAL0793]	1	+	- (gelblich)	Asien ¹ (<i>M. baccata</i>); Osteuropa ² (<i>M. pumila</i>)
<i>M. ×domestica</i> (<i>M. sieversii</i> × ? ¹)	8	+	+	Zentralasien ¹
<i>M. ×moerlandii</i> (<i>M. ×purpurea</i> 'Lemoinei' × <i>M. sieboldii</i> ²)	3	+	+	Asien ¹ (<i>M. sieboldii</i>); Osteuropa, Asien (siehe <i>M. ×purpurea</i>)
<i>M. ×purpurea</i> (<i>M. pumila</i> 'Niedzwetzkyana' × <i>M. ×atrosanguinea</i> ²)	8	+	+	Osteuropa ² (<i>M. pumila</i> 'Niedzwetzkyana'); <i>M. ×atrosanguinea</i> = <i>M. baccata</i> × <i>M. pumila</i> , Asien ¹ (<i>M. baccata</i>); Osteuropa ² (<i>M. pumila</i>)
<i>M. ×soulardii</i> (<i>M. ioensis</i> × <i>M. ×domestica</i>)	1	+	+	Nordamerika ¹ (<i>M. ioensis</i>); Zentralasien ¹ (<i>M. ×domestica</i>)
<i>M. ×zumii</i> (<i>M. mandshurica</i> × <i>M. sieboldii</i>)	1	+	+	Zentral- und Nordostchina, fernöstliches Russland, Japan ² (<i>M. mandshurica</i>), Asien ¹ (<i>M. sieboldii</i>)
Synthetische Hybride, gekennzeichnet durch Akzessionsnummer (Elter)				
MAL0759 (<i>M. sieboldii</i> × <i>M. spectabilis</i>) × <i>M. ×purpurea</i> 'Aldenhamensis')	1	+	+	Asien ¹ (<i>M. sieboldii</i>); Ostchina ² (<i>M. spectabilis</i>); Osteuropa, Asien (siehe <i>M. ×purpurea</i>)
MAL0761 (<i>M. ×purpurea</i> 'Aldenhamensis' × <i>M. floribunda</i>)	1	+	+	Osteuropa, Asien (siehe <i>M. ×purpurea</i>); unbekannt ² (<i>M. floribunda</i>)
MAL0806 (<i>M. sargentii</i> × <i>M. ×domestica</i> 'Baskatong')	1	+	+	unbekannt ² (<i>M. sargentii</i>)
MAL0765 (<i>M. floribunda</i> 'Exzellenz Thiel' × <i>M. sieversii</i> f. <i>niedzwetzkyana</i>)	1	+	+	unbekannt ² (<i>M. floribunda</i>); Asien (siehe <i>M. sieversii</i>)
MAL0736 (<i>M. ×purpurea</i> 'Eleyi' × <i>M. sieboldii</i>)	1	+	+	Osteuropa, Asien (siehe <i>M. ×purpurea</i>); Asien ¹ (<i>M. sieboldii</i>)
MAL0738 (<i>M. sargentii</i> × <i>M. sieversii</i> f. <i>niedzwetzkyana</i>)	1	+	- (gelblich)	unbekannt ² (<i>M. sargentii</i>); Asien (siehe <i>M. sieversii</i>)
MAL0978 (<i>M. florentina</i> × <i>M. ×domestica</i> 'Baskatong')	1	+	+	Europa ¹ (<i>M. florentina</i>)
Summe	40	40	37	

Der geografische Ursprung der *Malus* Spezies und das Vorhandensein von rot pigmentiertem Fruchtfleisch (blassrosa/rötlich) nach Deskriptor Nr. 53 (UPOV, 2005) ist angegeben. grau – Akzession mit *MYB10* R6 Allel, die kein rot pigmentiertes Fruchtfleisch ausprägten. Die botanische Nomenklatur der *Malus* Spezies folgte dem Klassifizierungssystem von Rehder (1949), Langenfeld (1991) und Forsline et al (2003). 1 – Pereira-Lorenzo et al, 2009; 2 – Luby, 2013; Akz. – Akzession; + – vorhanden; - – nicht vorhanden.

3.4.2 *MYB10 (R6)* als morphologischer Selektionsmarker

Um das Potenzial des *MYB10 (R6)* Allels als apfeleigenen morphologischen Selektionsmarker für die Transformation von Apfel zu evaluieren, wurden zwei verschiedene Arten transgener *MYB10* Linien von der Apfelsorte 'Pinova' einem Regenerationsversuch unterzogen. Die transgenen Apfellinien sollten dabei das positive Transformationsereignis simulieren.

3.4.2.1 Transgene *MYB10* Linien

Für die Testung von *MYB10 (R6)* als möglichen morphologischen Marker wurden transgene Linien der Sorte 'Pinova', generiert mit dem Vektor p9-Dao1-FLPi-MsMYB10 (Abbildung 1 D), genutzt (Daten nicht gezeigt; Linienbezeichnung: Endog*MYB10_(R6)*; Abbildung 31). Dieser Vektor wurde ursprünglich für die Erstellung cisgener rotfleischiger Apfelsorten unter Anwendung des Flp/*FRT* Rekombinasesystems konzipiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die transgenen Endog*MYB10_(R6)* Linien ausschließlich für die Evaluierung von *MYB10 (R6)* als morphologischen Marker verwendet. Zum Vergleich dienten transgene Linien der Sorte 'Pinova', in die *MYB10* cDNA unter Kontrolle des *CaMV 35S* Promotor eingebracht wurde (Daten nicht gezeigt, Linienbezeichnung: 35S::*MYB10_(cDNA)*; Abbildung 31).

Unter normalen Anzuchtbedingungen bildete die Sorte 'Pinova' in *in vitro* Kultur keine rote Pigmentierung aus (Abbildung 31). Der Gentransfer vom endogenen *MYB10 (R6)* als auch von *MYB10* cDNA unter Kontrolle des *CaMV 35S* Promotors führte zu einem veränderten Phänotyp von 'Pinova' (Abbildung 31). Die transgenen 35S::*MYB10_(cDNA)* Linien prägten stark rot pigmentierte Sprossachsen und Laubblätter aus. Die transgenen Endog*MYB10_(R6)* Linien zeigten ebenfalls rot pigmentiertes Gewebe, was sich allerdings auf die Sprossachse und die Leitgewebe der Laubblätter beschränkte (Abbildung 31).

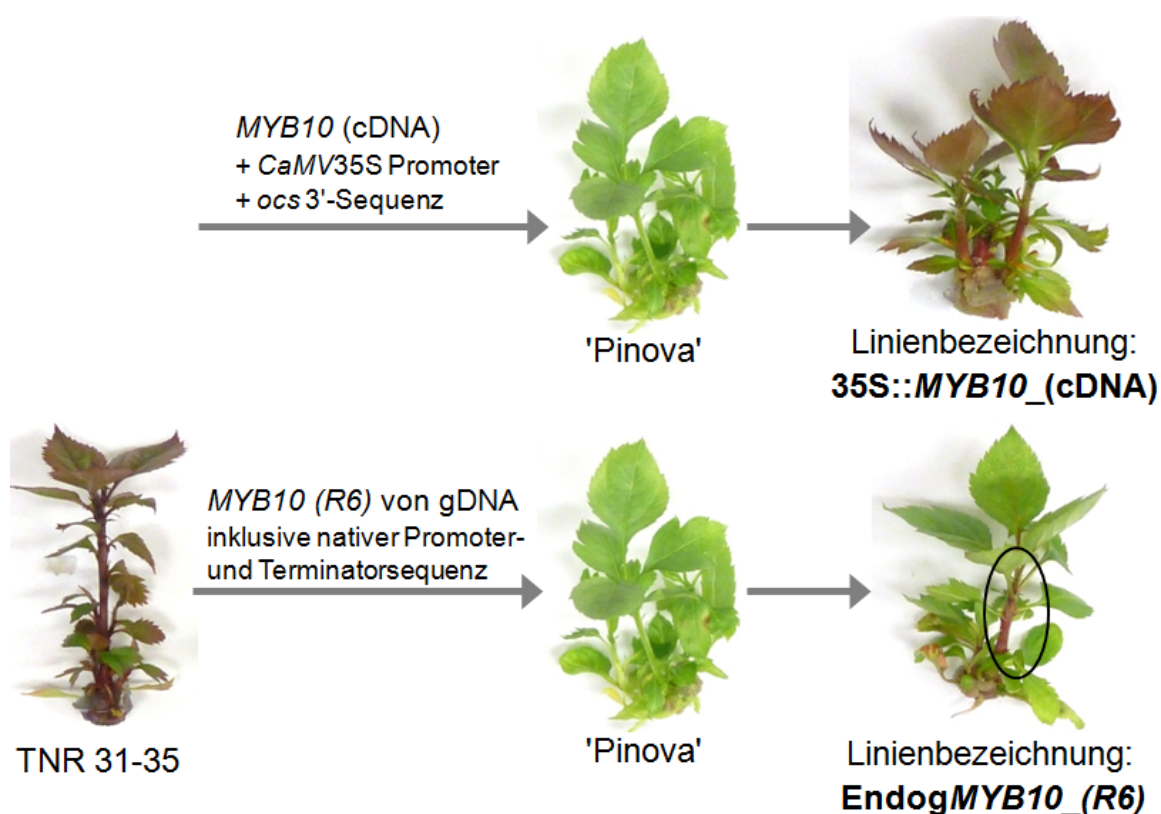


Abbildung 31 Phänotyp der transgenen *MYB10* Linien 35S::*MYB10*_(cDNA) und Endog*MYB10*_(R6) in *in vitro* Kultur unter normalen Anzuchtbedingungen (16 h Licht (0,65 klx) bei 23 °C/8 h Dunkelheit bei 17 °C). 35S::*MYB10*_(cDNA) – transgene Linie der Apfelsorte 'Pinova', beinhaltet *MYB10* cDNA unter Kontrolle des *CaMV* 35S Promotors und *ocs* Terminators. Endog*MYB10*_(R6) – transgene Linie der Apfelsorte 'Pinova', beinhaltet das endogene *MYB10* Gen im R6 Allelzustand aus dem *Malus* Genotyp TNR 31-35 unter Kontrolle seiner nativen Promoter- und Terminatorsequenz. TNR 31-35 – *Malus* Genotyp, in dem das *MYB10* (R6) Allel homozygot vorliegt (Lespinasse und Godicheau, 1980); 'Pinova' – *M. xdomestica* Sorte mit *MYB10* (R1) Allel.

3.4.2.2 Regenerationsversuch mit transgenen *MYB10* Linien

Um das Potenzial des apfeleigenen *MYB10* Gens in der R6 Allelvariante als optische Selektionsmarker zu bewerten, wurde die Aktivität von *MYB10* (R6) im Zuge des Regenerationsprozesses, wie er nach der Transformation durchgeführt wurde, anhand der Pigmentausprägung genauer charakterisiert werden. Dafür wurden Blätter der transgenen *MYB10* Linien Endog*MYB10*_(R6) und 35S::*MYB10*_(cDNA) (Vergleichslinien) einem Regenerationsprozess unterzogen. Im Anschluss an die Dunkelphase wurde die Regeneration an den Explantaten in regelmäßigen Abständen dokumentiert. In Abbildung 32 ist diese Dokumentaion für je eine Endog*MYB10*_(R6) Linie und eine 35S::*MYB10*_(cDNA) Linie zu sehen.

Direkt nach der Dunkelphase war Regeneration in Form von Kallusbildung an den Explantaten beider Linienarten sichtbar. Die Explantate der Linie

EndogMYB10_(R6) waren leicht grün und der gebildete Kallus war gelblich gefärbt; es war keine rote Pigmentierung sichtbar. Die Explantate der Linie 35S::MYB10_(cDNA) und der daran gebildete Kallus waren rosa bis stark rot pigmentiert. Nach 24 h unter Langtagbedingungen (16 h Licht (0,65 klx) bei 23 °C/8 h Dunkelheit bei 17 °C) veränderte sich die Färbung der Explantate von der Linie EndogMYB10_(R6). Sowohl die Leitbahnen der Explantate als auch der Kallus zeigten eine rote Pigmentierung. Nach sieben Tagen im Langtag waren die Explantate beider Linienarten grün pigmentiert. Die vorher rot pigmentierten Gewebe zeigten nun eine bräunliche Farbe.

Nach 30 Tagen im Langtag setzte an den Explantaten beider Linienarten die Regeneration von Pflänzchen ein. Zu diesem Zeitpunkt waren die Explantate der Linie EndogMYB10_(R6) überwiegend grün pigmentiert und zeigten nur vereinzelt rot pigmentierte Bereiche. Im Vergleich dazu waren die Explantate der Linie 35S::MYB10_(cDNA) ebenfalls grün pigmentiert, zeigten jedoch große Bereiche stark roter Pigmentierung, die bereits violett wirkte.

Nach 87 Tagen im Langtag – der Transfer auf M8-Medium (Sprossproliferations-Medium) fand bereits statt – hatten die Explantate beider Linienarten sich zu Regeneraten entwickelt, die Sprosse mit Laubblättern aufwiesen. Die Regenerate der Linie EndogMYB10_(R6) zeigten grün pigmentierte Laubblätter. Im Gegensatz dazu zeigten die Regenerate der Linie 35S::MYB10_(cDNA) rot pigmentierte Laubblätter.

Nach 170 Tagen im Langtag hatten die Sprossspitzen der Regenerate bereits zweimal einen *in vitro* Erhaltungszyklus von 4 Wochen durchlaufen. Im Gegensatz zur Linie 35S::MYB10_(cDNA) zeigten die Regenerate der Linie EndogMYB10_(R6) erst nach dem Einsetzen des Sprosslängenwachstums rot pigmentiertes Gewebe, welches sich auf die Sprossachsen und die Leitgewebe der Laubblätter beschränkte. Im *in vitro* Erhaltungszyklus prägten beide transgene MYB10 Linienarten ihren typischen Phänotyp aus (vgl. Abschnitt 3.4.2.1). Im Zuge der Regeneration war eine eindeutige rote Pigmentierung von Gewebe aufgrund des MYB10 (R6) Allels erst nach dem Einsetzen des Sprosslängenwachstums sichtbar, ca. fünf Monate nach Beginn des Regenerationsversuches. Der Regenerationsversuch ergab auch für weitere EndogMYB10_(R6) Linien und 35S::MYB10_(cDNA) Linien das gleiche Ergebnis.

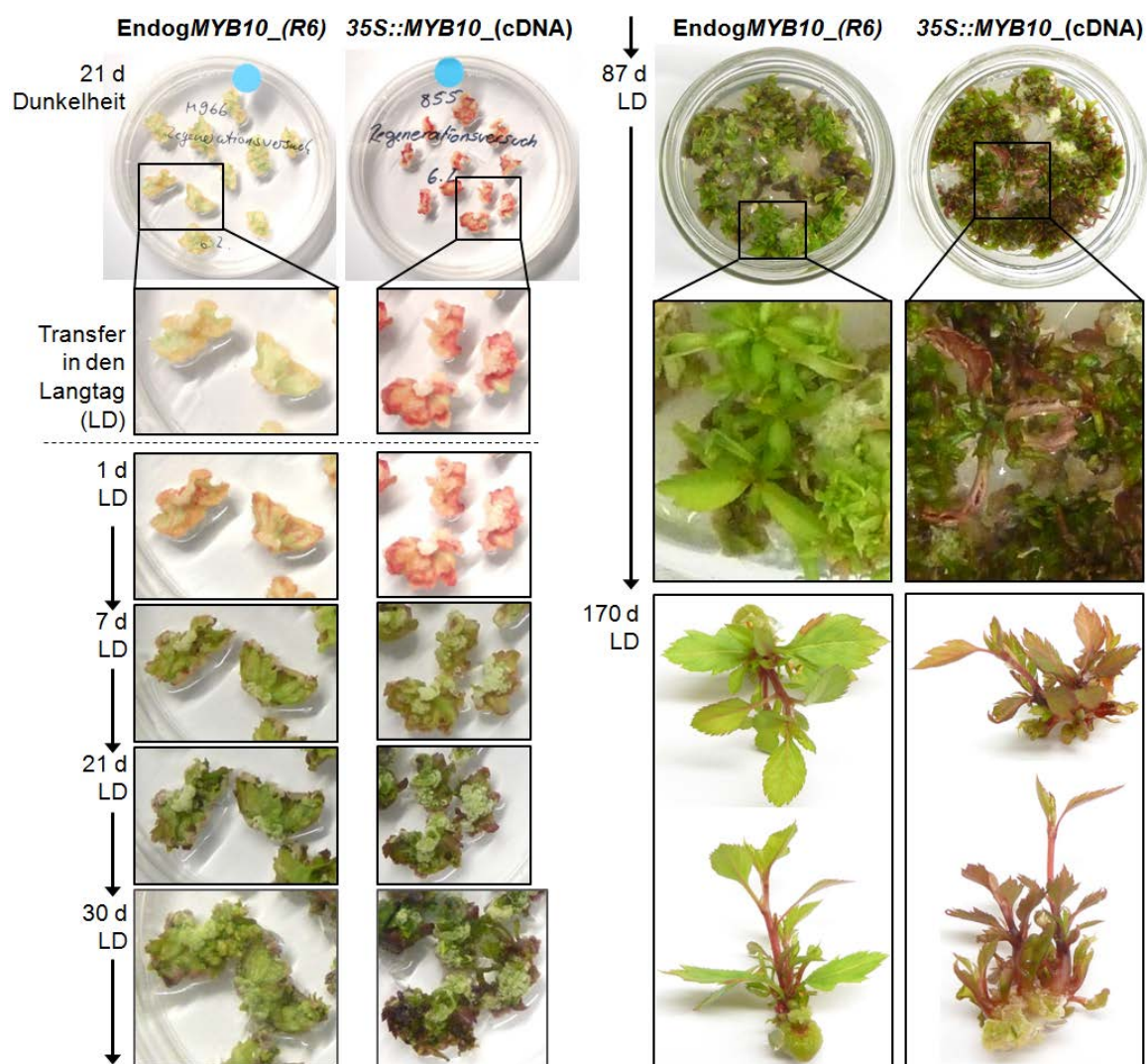


Abbildung 32 Regenerationsversuch mit zwei verschiedenen transgenen *MYB10* Linienarten. *35S::MYB10_(cDNA)* – transgene Linie der Apfelsorte 'Pinova', beinhaltet *MYB10* cDNA unter Kontrolle des *CaMV* 35S Promotors und *ocs* Terminators. *EndogMYB10_(R6)* – transgene Linie der Apfelsorte 'Pinova', beinhaltet das endogene *MYB10* Gen im R6 Allelzustand aus dem *Malus* Genotyp TNR 31-35 unter Kontrolle seiner nativen Promotor- und Terminatorsequenz. Die Regeneration an den Blattexplantaten erfolgte unter gleichen Bedingungen wie nach einer Transformation. LD – Langtagbedingungen (16 h Licht (0,65 klx) bei 23 °C/8 h Dunkelheit bei 17 °C).

3.4.3 Zusammenfassung

Auf Grundlage von 357 Akzessionen der Deutschen *Malus* Sammlung wurde der Promotor des apfeleigenen *MYB10* Gens für die Gattung *Malus* genauer charakterisiert. Bei diesen Untersuchungen wurde eine Vielzahl verschiedener *MYB10* Promotorallele gefunden. Durch Sequenzanalysen von gewählten Allelen konnten drei Hauptformen für den *MYB10* Promotors identifiziert werden: das *MYB10 (R1)* Allel, das *MYB10 (R6)* Allel und das ~1 kb *MYB10* Allel. Für die Akzessionen der *Malus* Sammlung waren Daten zur Fruchtfleischpigmentierung vorhanden. Auf Basis dieser und der erhobenen Daten konnte der

Zusammenhang zwischen der Präsenz des *MYB10 (R6)* Allels und der Ausprägung von rot pigmentiertem Fruchtfleisch für den Apfel artübergreifend beschrieben werden. Für 40 der 357 charakterisierten Akzessionen wurde das *MYB10 (R6)* Allel nachgewiesen; 38 dieser Akzessionen zeigten eine rot pigmentierte Fruchtfleischfarbe. Es wurden keine weiteren Akzessionen mit rot pigmentiertem Fruchtfleisch gefunden. Fast alle Akzessionen mit *MYB10 (R6)* Allel und rot pigmentiertem Fruchtfleisch gehörten zu *Malus* Spezies, deren Ursprung in Asien lag.

Um die Eignung der R6 Allelvariante des *MYB10* Gens als morphologischen Marker abzuschätzen, kamen transgene Linie der Apfelsorte 'Pinova' zum Einsatz, in die das *MYB10 (R6)* Allel aus dem rot pigmentierten Genotyp TNR 31-35 mit seinen endogenen regulatorischen Sequenzen übertragen wurde. In einem Regenerationsversuch konnte gezeigt werden, dass das *MYB10 (R6)* Allel als morphologischer Marker für den Genotyp 'Pinova' nur eingeschränkt verwendet werden kann.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems mittels Monitoringvektor

Die Umsetzung des cisgenetischen Konzeptes wird beim Apfel primär durch den Einsatz von *Clean Vector* Technologie-Vektoren fokussiert (Herzog et al, 2012; Vanblaere et al, 2011). Diese Vektoren beinhalten ein induzierbares bzw. aktivierbares Rekombinasesystem, wodurch die gezielte Entfernung unerwünschter DNA-Sequenzen, wie Markergene, zu einem gewählten Zeitpunkt möglich ist. Am JKI Dresden-Pillnitz wurde ein hitzeinduzierbares Flp/*FRT* Rekombinasesystem für die gesteuerte Markergenentfernung aus dem Genom des Apfels erfolgreich etabliert (Herzog et al, 2012; Herzog, 2012; Abbildung 1 A). Nach einer Hitzebehandlung wird Flp Rekombinase gebildet, welche die Rekombination der Rekombinasekassette vermittelt. Die Flp Rekombinase schneidet jede DNA-Sequenz zwischen zwei gleich orientierten *FRT*-Sequenzen, inklusive einer der beiden *FRT*-Sequenzen, aus einem DNA-Strang heraus. Im Endprodukt verbleibt von der Rekombinasekassette lediglich eine einzelne *FRT*-Sequenz (34 bp).

Mit dem Ziel, die Effektivität der Induktion des Systems zu erhöhen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit drei neue Methoden zur HÜ konzipiert und getestet (Abbildung 2, Kap. 3.1.1). Wie in den vorhergehenden Arbeiten (Herzog et al, 2012; Herzog, 2012) wurden dafür transgene Linien verwendet, die mit dem Monitoringvektor pB-Npt-Hsp-Flp-Gus (Abbildung 1^B) ausgestattet sind. Im Gegensatz zu der ursprünglichen Induktionsstrategie (Herzog et al, 2012) wurde bei den neuen Methoden beim hitzeübertragenden Medium variiert (Flüssigkeit, Luft mit hoher Luftfeuchte bzw. festes Medium) und die Hitzebehandlung an einzelnen Blättern bzw. Blattexplantaten durchgeführt. Analog zur ursprünglichen Induktionsstrategie erfolgte die Hitzebehandlung bei 42 °C über 4 h (Herzog et al, 2012). Um genetisch einheitliche Sprosse zu erzeugen, ist ein Regenerationsschritt notwendig (Herzog et al, 2012; Herzog, 2012). Vermutlich erfolgt die Sprossregeneration ausgehend von einzelnen bzw. von wenigen Zellen, wodurch hauptsächlich genetisch einheitlich Sprosse entstehen (Herzog,

2012). Deswegen wurde bei den drei neuen Methoden der HÜ ein Regenerationsschritt direkt an die Hitzebehandlung angeschlossen (Abbildung 2).

Die meisten Blätter bzw. Blattexplantate waren nach den HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ vital. Im Gegensatz dazu waren durchschnittliche nur 26 % der Blätter nach der HÜ „ddH₂O“ vital (Abbildung 3). Der Unterschied in der Blattvitalität zwischen den HÜ spiegelt sich in der nachfolgend bestimmten Regenerationsrate wieder (Abbildung 3). Nur vitale und ein Teil der semivitalen Blätter behalten das Potenzial, um anschließend Kallusgewebe zu bilden. Die Kategorie semivital ist mit einem Anteil an nekrotischem Gewebe zwischen 25 % und 75 % vielleicht zu großzügig gewählt und sollte bei zukünftigen Arbeiten in zwei Kategorien unterteilt werden. Eine Ursache für die schlechte Überlebensrate der Blätter nach der HÜ „ddH₂O“ kann die deutlich höhere thermische Leitfähigkeit von Wasser ($\lambda = 0,6322 \text{ W}/(\text{m} \times \text{K})$, bei 42 °C (Ramires et al, 1995)) im Vergleich zur die thermische Leitfähigkeit von Luft ($\lambda = \text{ca. } 0,027 \text{ W}/(\text{m} \times \text{K})$ bei 42 °C (McQuillan et al, 1984)) sein. Die thermische Leitfähigkeit beeinflusst die tatsächliche Menge an Hitze, die das Gewebe innerhalb von 4 h Hitzebehandlung erreicht. Für die HÜ „ddH₂O“ ist eine Temperatur von 42 °C offensichtlich zu hoch, da das Gewebe der hitzebehandelten Blätter kollabiert. Dies resultierte in einer schlechten Vitalität und einer geringen Regenerationsrate für die HÜ „ddH₂O“ (Abbildung 3). Obwohl vergleichbare Systeme für die zielgerichtete Eliminierung von Markergenen in andere Pflanzenspezies verwendet wurden (Hoff et al, 2001; Zhang et al, 2003; Fladung et al, 2005; Khattri et al, 2011), sind nur wenige Studien bekannt, bei denen die Hitzebehandlung an Blättern bzw. Blattexplantaten stattfand (Khattri et al, 2011). In den meisten Studien wurden ganze Pflanzen oder Kalluskulturen hitzebehandelt. Für die Induktion des Rekombinasesystems bei der Kartoffel, resultierte die Hitzebehandlung von Sprossen bei 42 °C über 3 h in halbflüssigem Medium in 30 % Regeneration (Cuellar et al, 2006). Wiederholte Hitzebehandlungen bei 37 °C bzw. 38 °C führten zu keinen höheren Regenerationsraten bei Kartoffel (Cuellar et al, 2006). Um die Vitalität der Zellen im Zuge der HÜ zu erhalten, sollten in weiteren Experimenten geringere Temperaturen für die HÜ „ddH₂O“ getestet werden. Unter den getesteten Methoden gelang die Hitzebehandlung von Blättern/Blattexplantaten bei 42 °C für 4 h mit den HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ am besten. Anhand eines GUS-Assays an Explantaten mit Regeneration aus den drei HÜ konnte gezeigt werden, dass die Induktion des

Rekombinasesystems bei allen drei Methoden erfolgte (Abbildung 4, Kap. 3.1.1.2). Darüber hinaus wurde deutlich, dass die HÜ „ddH₂O“ das effektivste von den drei getesteten Verfahren war. Im Vergleich zu Explantaten aus den HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ zeigten die Explantate aus der HÜ „ddH₂O“ wesentlich größere blaugefärbte Areale mit einer deutlich stärkeren Farbintensität. Nach dem GUS-Assay konnte ein komplett blau gefärbtes Pflänzchen für die Linie T670 aus der HÜ „Feuchtekammer“ entdeckt werden (Abbildung 4). Dieser Fund belegte, dass die Produktion von Markergen-freien Sprossen mit der HÜ „Feuchtekammer“ möglich ist.

Im Anschluss fand eine weitergehende Charakterisierung der HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ statt, indem der Zustand der Rekombinasekassette in regenerierten Einzelsprossen aus den zwei HÜ per PCR charakterisiert wurde (Abschnitt 3.1.1.3, Abbildung 5). Von insgesamt 120 untersuchten Einzelsprossen aus den HÜ „Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ (je 60 Sprosse), konnte für nur einen Spross eine Flp vermittelte Rekombination detektiert werden. Dieser Spross, T791⁽⁺⁾-5 (FK), stammte aus der HÜ „Feuchtekammer“ und erwies sich als einheitlich Markergen-frei, was durch einen GUS-Assay belegt werden konnte (Abbildung 5). Für die Produktion von einheitlich Markergen-freien Sprossen durch die HÜ „Feuchtekammer“ bzw. „Mediumplatte“, ergab sich daraus eine Erfolgsrate von 1,6 % bzw. 0 %. Für insgesamt 60 untersuchte Einzelsprosse aus den Kontrollbehandlungen (T791⁽⁻⁾) war keine Rekombination nachweisbar (Abschnitt 3.1.1.3). Die fehlende Aktivität der Rekombinase wies auf die erwünschte Inaktivität des *Gmhsp17.5-E* Promotors bei RT hin (Herzog et al, 2012). In der Kartoffel führte die Anwendung eines vergleichbaren Rekombinasesystems mit ähnlicher Induktionsstrategie zu einer vollständigen Rekombination bei 3,6 % der untersuchten Sprosse (Cuellar et al, 2006). Dieses Ergebnis ist mit den vorliegenden Ergebnissen vergleichbar. Um jedoch zumindest einige Markergen-freie Sprosse pro HÜ zu erhalten, sollte die Anzahl der untersuchten Sprosse in zukünftigen Experimenten erhöht werden. In der Vergangenheit erfolgte die Induktion des verwendeten Rekombinasesystems beim Apfel durch die Hitzebehandlung von Sprossen in geschlossenen Glasgefäßen bei 42 °C über 2 bis 8 h, gefolgt von einer Sprossregeneration (Herzog et al, 2012). Diese Induktionsstrategie führte zu durchschnittlich 19,9 % Markergen-freien Sprossen (Herzog et al, 2012). Die getesteten HÜ

„Feuchtekammer“ und „Mediumplatte“ ergaben somit keine höheren Rekombinationsraten als die ursprüngliche Induktionsstrategie.

Für eine genauere molekulare Charakterisierung des Flp/*FRT* Rekombinasesystems im Apfel, wurde die Expression der T-DNA lokalisierten Gene *flp*, *nptII* und *gusA* im Zuge von zwei unterschiedlichen Hitzebehandlungsregimen (ZR I und ZR II) analysiert (Abschnitt 3.1.2, Abbildung 6). Die Hitzebehandlung der Blätter erfolgte dabei entsprechend der HÜ „Feuchtekammer“.

Bei permanenter Hitzebehandlung von 42 °C über 4 h (ZR II) war das *flp* Transkript bereits nach 30 min Hitzebehandlung nachweisbar (Abbildung 7 B). Die erfolgreiche Induktion des *Gmhsp17.5-E* Promotors nach 30 min Hitzebehandlung bei 42 °C wurde bereits durch Herzog et al (2012) gezeigt. Im weiteren Verlauf der permanenten Hitzebehandlung stieg die Menge an *flp* Transkript deutlich an. In den Linien T782 und T791 erreichte die *flp* Transkriptmenge nach 2 h Hitzebehandlung ein leichtes Maximum, gefolgt von einer leichten Abnahme nach 4 h permanenter Hitzebehandlung (Abbildung 7 B). Die Stabilität einer mRNA wird durch die Syntheserate, in Abhängigkeit von der Promotorsequenz, und durch die Transkript spezifische Abbaurate bedingt. Bei Sojabohne führt eine kontinuierliche Hitzebehandlung bei 40 °C zu einer starken Akkumulation von Hitzeschockgen Transkripten innerhalb von 1–3 h (Kimpel et al, 1990). Bei weiterer Hitzegabe kommt es zur allmählichen Abnahme der Hitzeschockgen Transkriptmenge (Kimpel et al, 1990). Für die Apfellinien T782 und T791 wurde ein vergleichbarer Expressionsverlauf des *flp* Gens unter Kontrolle des Hitzeschockgen Promotors *Gmhsp17.5-E* aus der Sojabohne bei permanenter Hitzegabe beobachtet (Abbildung 7 B). Eine weitere Erklärung für die Abnahme des *flp* Transkriptlevel nach 2 h Hitzebehandlung, trotz kontinuierlicher Hitzegabe, könnte die zunehmende Anzahl an Zellen mit Rekombinationsereignis sein, wodurch das *flp* Gen aus dem Genom der Zelle entfernt wird. Die Anzahl der rekombinierten Zellen erhöht sich mit der Dauer der Hitzebehandlung (Herzog et al, 2012). Die leicht abweichende *flp* Expression der Linie T670 in ZR II konnte durch die Präsenz von vier Kopien der T-DNA in dieser Linie erklärt werden (Kap. 2.1.5.1).

Die einmalige Hitzebehandlung bei 42 °C über eine Stunde (ZR I) führte beim Apfel zur *flp* Transkriptakkumulation innerhalb dieses Zeitraums (Abbildung 7 A). Nach der Hitzebehandlung nahm die *flp* Expression in den Blättern sukzessive ab

(ZP 2 h bis 32 h). Dieser Verlauf der *flp* Expression war für alle drei untersuchten Linien identisch. Die Linie T670 zeigte insgesamt eine stärkere *flp* Expression als die Linien T782 und T791, was durch das Vorhandensein mehrere T-DNA-Kopien in Linie T670 erklärbar war (Herzog et al, 2012). Die Halbwertszeit des *flp* Transkriptes im Apfel schien nur wenige Stunden zu betragen. Für die Linie T791 war zum ZP 32 h (31 h nach Beendigung der Hitzeabgabe) kein *flp* Transkript mehr detektierbar (Abbildung 7 A).

Die *flp* spezifische PCR ergab neben dem erwarteten Produkt von 575 bp für die *flp* cDNA (Abbildung 7, markiert mit a), zwei weitere PCR-Produkte mit den Größen 800 bp und 950 bp (Abbildung 7, markiert mit b bzw. c). Alle *flp* PCR-Produkte schienen ihren Ursprung auf der T-DNA zu haben, sie waren nur in den transgenen Linien und hauptsächlich nach Hitzebehandlung detektierbar. Das 800 bp große *flp* PCR-Produkt könnte von unprozessierter *flp* prä-mRNA stammen, da es eine vergleichbare Größe zum amplifizierten Produkt von DNA zeigte (Abbildung 7). Um eine Aktivität der Flp Rekombinase im Zuge der Klonierung und der Transformation zu vermeiden, wurde künstlich das zweite Intron des *ST-LS1* Gens aus der Kartoffel in das *flp* Rekombinasegen integriert (vgl. Abbildung 1 B). Eine Ursache für das 800 bp PCR-Produkt könnte ein unzureichendes Spleißen der künstlich erzeugten, chimären *flp* prä-mRNA sein. Dieser Faktor könnte ebenfalls eine Ursache für die geringe Anzahl erzeugter Markergen-freier Sprosse sein. Für das zweite unerwartete *flp* PCR-Produkt (950 bp) konnte keine Erklärung gefunden werden. Alle Versuche, die beiden zusätzlichen PCR-Produkte zu klonieren, schlugen fehl (Daten nicht gezeigt). Deswegen konnte in beiden Fällen die Möglichkeit eines PCR-Artefaktes nicht ausgeschlossen werden.

Für zwei ZP der nicht induzierten Kontrollbehandlung (T791, ni) und für den 0 h ZP (vor Hitzebehandlung) der Linie T670 war *flp* Expression nachweisbar (Abbildung 7). Offensichtlich wurde der *Gmhsp17.5-E* Promotor durch andere Einflüsse – neben Hitze – zu einem gewissen Grad aktiviert. Diese Annahme wurde durch Befunde für andere Pflanzenspezies gestützt. In der Sojabohne wird beispielweise die Expression der Gene für Hitzeschockproteine mit geringem Molekulargewicht durch Arsenit, Cadmium und das Prolin-Analog Azetidin-2-Carbonsäure induziert (Czarnecka et al, 1985; Lee et al, 1996). Bei der Verwendung von Hitzeschockgen Promotorsequenzen als induzierbare

Promotoren für das Rekombinasegen in einem Rekombinasesystem, wurde das Phänomen des „undichten“ (*leaky*) induzierbaren Rekombinasesystems bereits beobachtet (Hoff et al, 2001). Bei den untersuchten transgenen Apfellinien könnte eine unerwünschte Induktion des *flp* Gens zu einem Rekombinationsereignis vor Hitzeinduktion führen und sollte als *gusA* Expression in nicht induzierten Geweben sichtbar sein.

Im Rahmen der Expressionsuntersuchungen konnte eine *gusA* Expression in den transgenen Linien (induziert und nicht induziert) zu fast allen ZP (vor, während und nach Hitzeinduktion) nachgewiesen werden (Abbildung 7). Dieses Ergebnis stützte die vorherige Annahme, dass der *Gmhsp17.5-E* Promotor nicht nur durch Hitze induziert werden kann. Diese Beobachtungen standen im Kontrast zu den Untersuchungen durch Herzog et al (2012), wo keine *gusA* Expression für dieselben, nicht induzierten transgenen Linien nachweisbar war. Zwischen den Untersuchungen durch Herzog et al (2012) und der vorliegenden Arbeit lag ein Zeitraum von mehreren Jahren. In dieser Zeit erfolgte die Erhaltung der transgenen Linien als *in vitro* Kultur (vgl. Abschnitt 2.2.1.1). Aufgrund der *gusA* Expressionsergebnisse in der vorliegenden Arbeit, konnte kein Rückschluss über die Dauer des Prozesses zwischen Beginn der Hitzeinduktion und der Rekombination für das untersuchte Flp/*FRT* Rekombinasesystem im Apfel gezogen werden. Durch die zeitgleiche Expression von *nptII* und *gusA* in der Kontrollbehandlung (T791, ni) und vor Hitzeinduktion (ZP 0 h) in den transgenen Linien, wurde von einer Chimerität der verwendeten transgenen Linien ausgegangen.

Die Evaluierung der *nptII* Expression ergab ein positives Ergebnis für die untersuchten transgenen Linien zu allen ZP (Abbildung 7). Wahrscheinlich war die alleinige Hitzebehandlung von Blattmaterial nicht ausreichend, um eine Rekombination in allen hitzebehandelten Zellen zu erreichen. Vorherige Studien am Apfel unterstützten diese Annahme. Die Hitzebehandlung bei 42 °C über 4 h führte zur Bildung von chimärem Gewebe bezüglich des molekularen Zustandes der Rekombinasekassette (Herzog et al, 2012). Um den molekularen Zustand der Rekombinasekassette in den Zellen mit Sicherheit zu bestimmen, wäre ein PCR-basierter Nachweis der Gene *flp* und *nptII* bei analogen ZR denkbar.

Um den molekularen Zustand der Rekombinasekassette im verwendeten Ausgangsmaterial zu klären, wurden die transgenen Linien T670, T782 und T791

mit PCR, RT-PCR und GUS-Assay analysiert (Abschnitt 3.1.2.1, Abbildung 9). Für die Ausgangslinien konnte die zeitgleiche Präsenz als auch Expression der T-DNA lokalisierten Gene *nptII* und *gusA* belegt werden. Das *flp* Rekombinasegen war ebenfalls in allen drei Ausgangslinien vorhanden, jedoch expressionsinaktiv (Abbildung 9 A). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von einer möglichen Chimerität der Ausgangslinien ausgegangen. Eine *gusA* mRNA-Expression sollte erst nach Entfernung der Rekombinasekassette möglich sein (Abbildung 1 B). Trotzdem besaß ein Teil der Zellen noch eine vollständige Rekombinasekassette, was durch die *nptII* und *flp* spezifischen PCR bezeugt werden konnte. Das Vorhandensein eines unerwünschten „Megatranskriptes“, ausgehend vom *CaMV* 35S Promotor über die gesamte Rekombinasekassette hinweg (inklusive zweier Terminatoren) bis hin zum *gusA* Gen mit *NOS* Terminator, konnte ausgeschlossen werden, da sonst ebenfalls eine konstante *flp* Expression detektierbar sein müsste. Die Ergebnisse zweier weiterer Untersuchungen, eine Rekombinasekassette überspannende PCR und ein GUS-Assay, sprachen gegen eine Chimerität der Ausgangslinien (Abbildung 9 B und C). Die Rekombinasekassette überspannende PCR lieferte für keine der drei Ausgangslinien ein 1,2 kb großes PCR-Produkt, welches nach einem Rekombinationsereignis amplifizierbar sein sollte. Das GUS-Assay ergab keine Blaufärbung der *in vitro* Sprosse, wodurch auf die Abwesenheit von β -Glucuronidase in den Ausgangslinien geschlossen wurde. Die Ergebnisse aller drei Untersuchungen standen im Widerspruch zueinander. Wenn das detektierte Signal in der *gusA* RT-PCR einem *gusA* Transkript entsprechen sollte, so schien die Anzahl der Zellen mit Rekombinationsereignis so gering zu sein, dass weder die Rekombinasekassette überspannende PCR noch das GUS-Assay das Rekombinationsereignis bestätigen konnte. Eine genaue Analyse des vermeintlichen *gusA* Transkriptes sollte durchgeführt werden, um seine Identität als *gusA* spezifische mRNA sicher zu belegen. Für die drei getesteten Ausgangslinien konnte kein Rekombinationsereignis auf DNA-Ebene und auf Proteinebene belegt werden.

Das hitzeinduzierbare Flp/*FRT* Rekombinasesystem im Apfel konnte erfolgreich durch die drei neuen Methoden der HÜ aktiviert werden. Die effektivste Induktion erfolgte durch die HÜ „ddH₂O“; allerdings führte diese Art der HÜ zu einer starken Verminderung der Gewebsvitalität und resultierte in einer geringen Regenerationsrate. Regenerierte Sprosse aus den HÜ „Feuchtekammer“ und

„Mediumplatte“ wurden eingehender analysiert, wobei für diese Methoden Rekombinationsraten von 1,6 % bzw. 0 % ermittelt wurden. Die molekularen Untersuchungen des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems im Apfel offenbarten die mögliche Anwesenheit von ungespleißter *flp* prä-mRNA. Durch die Untersuchungen konnte eine Aussage über die Stabilität der *flp* mRNA nach Hitzegabe getroffen werden, wodurch eine Feinjustierung für die Länge der Hitzegabe erfolgen kann. Die Expressionsanalysen ergaben darüber hinaus eine eventuelle molekulare Chimerität der Ausgangslinien, die allerdings nicht eindeutig belegt werden konnte.

4.2 Erzeugung cisgener schorfresistenter Apfelsorten mit einem hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystem

Für die Erzeugung schorfresistenter cisgener Apfelsorten wurde ein neuer Vektor (p9-*Dao1-FLPi-HcrVf2*; Abbildung 1 C) am JKI Dresden-Pillnitz entwickelt. Die Konzeption des Vektors erfolgte entsprechend der *Clean Vector* Technologie, wobei die Basis des Vektors ein hitzeinduzierbares Flp/*FRT* Rekombinasesystem bildet, das bereit beim Apfel für die Markergenentfernung etabliert wurde (Herzog et al, 2012; Herzog, 2012; Abschnitt 3.1). Die Erhöhung der Schorfresistenz sollte durch die Übertragung des apfeleigenen Schorfresistenzgens *Rvi6* erreicht werden, welches das GOI des Vektors p9-*Dao1-FLPi-HcrVf2* (Abbildung 1 C) ist. Im Rahmen der Arbeit konnte die Schorfresistenz von zwei Apfelsorten in einem cisgenetischen Ansatz durch die Anwendung des Vektors p9-*Dao1-FLPi-HcrVf2* erfolgreich verbessert werden.

Im ersten Schritt mussten transgene Apfelinien durch die Transformation des Vektors p9-*Dao1-FLPi-HcrVf2* (Abbildung 1 C) in Apfelsorten erzeugt werden (Abschnitt 3.2.1.1). Die T-DNA des Vektors p9-*Dao1-FLPi-HcrVf2* konnte erfolgreich in die vier Apfelsorten 'Brookfield Baigent' ('Royal Gala' Mutante), 'Mitchgla' ('Gala' Mutante), 'Novajo' ('Jonagold' Mutante) und 'Pinova' übertragen werden (Tabelle 2), wobei insgesamt 22 transgene Linien entstanden sind. Für alle transgenen Linien konnte die Integration der T-DNA lokalisierten Gene gezeigt werden (Abbildung 10). Die höchste Transformationseffizienz wurde für die Sorte 'Brookfield Baigent' mit 0,4 % erreicht. Für die Sorten 'Mitchgla' (0,2 %), 'Pinova' (0,2 %), und 'Novajo' (0,15 %) lagen etwas geringere Transformationseffizienzen vor. Obwohl die *in vitro* Kultivierung und die Transformation identisch durchgeführt wurde, konnten für die Sorten 'Kanzi', 'Mariri Red' ('Braeburn' Mutante) und 'Red Jonaprince' ('Jonagold' Mutante) keine transgenen Linien mit dem Vektor p9-*Dao1-FLPi-HcrVf2* erzeugt werden (Tabelle 2). Beim Apfel schien die Transformationseffizienz abhängig vom verwendeten Genotyp zu sein, was bereits durch De Bondt und Mitarbeiter (1996) vermerkt wurde. Auch wenn bei einer Apfelsorte und ihren Mutanten von einer vergleichbaren Transformationseffizienz ausgegangen wird (De Bondt et al, 1996), war dies nicht der Fall für 'Novajo' und 'Red Jonaprince', beides Farbmutanten der Sorte 'Jonagold' (Tabelle 2). Die erzielten

Transformationseffizienzen für die auf 'Gala' zurückgehenden Mutanten 'Brookfield Baigent' und 'Mitchgla' sowie für die 'Jonagold' Mutante 'Novajo' waren im Vergleich zu anderen Studien geringer, wo Effizienzen von 1–2 % und 2–3 % für 'Jonagold' bzw. 'Gala' erreicht wurden (De Bondt et al, 1996; Maximova et al, 1998; Puite und Schaart, 1996). Andere Versuche, die Sorten 'Braeburn' und 'Pinova' mit einem *A. tumefaciens* vermittelten Ansatz zu transformieren, resultierten in Transformationseffizienzen von 0,0 bzw. 0,8 % (De Bondt et al, 1996; Wenzel et al, 2013). Mit der Sorte 'Kanzi' wurden bisher noch keine Transformationsexperimente durchgeführt. Für die Sorten 'Kanzi', 'Mariri Red' und 'Red Jonaprince' sollten zukünftig alternative Transformationsstrategien getestet werden. Bei der *A. tumefaciens* vermittelten Übertragung einer T-DNA mit ähnlicher Größe (10,6 kb) in 'Gala', erzielten Vanblaere und Mitarbeiter (2011) mit 0,6 % eine vergleichbare Transformationseffizienz wie in der vorliegenden Arbeit. Erst kürzlich wurde der am JKI Dresden-Pillnitz entwickelte Vektor für die Erstellung der ersten cisgenen feuerbrandresistenten Apfelpflanze verwendet, wobei sich das Feuerbrandresistenzgen *FB_Mr5* aus *Malus xrobusta* 5 anstelle des *Rvi6* Gens im Vektor befand (Vektorbezeichnung: p9-Dao-FLPi-FB_MR5) (Kost et al, 2015). Bei diesen Arbeiten wurde mit einer durchschnittlichen Transformationseffizienz von 3,4 % für die Sorte 'Gala Galaxy' ('Gala' Mutante) eine deutlich höhere Transformationsrate erzielt.

Durch Southern Blot Analysen konnte eine T-DNA-Integration an einem einzelnen, zweien bzw. vier Orten im Genom für 27 %, 68 % bzw. 5 % der transgenen Linien festgestellt werden (Abbildung 11; Tabelle 3). Im Vergleich dazu lag nach der Transformation von 'Gala' mit einem pMF1 Vektor (Schaart et al, 2004) eine T-DNA-Integration an einem einzelnen bzw. zwei Orten im Genom in 65 % bzw. 27 % der transgenen Linien vor (Joshi et al, 2011). Für 23 % der hier erzeugten transgenen Linien konnte die Integration von Vektorrückgrat festgestellt werden (Tabelle 3, Daten nicht gezeigt). Die Häufigkeit von Vektorrückgrat-Integration war nach Verwendung des pMF1 Vektors größer (Vanblaere et al, 2011) bzw. vergleichbar (Joshi et al, 2011).

Im Anschluss wurde die Expression der T-DNA lokalisierten Gene in den erstellten transgenen Linien unter Standard *in vitro* Kulturbedingungen mittels RT-PCR überprüft (Abbildung 12). Für alle transgenen Linien konnte die Expression der Selektionsmarker *nptII* und *dao1* sowie des Schorfresistenzgens

Rvi6 belegt werden. Offensichtlich wurde die *dao1* prä-mRNA störungsfrei gespleißt und das künstlich eingebaute Intron problemlos entfernt. Für keine Linie konnte *flp* Expression nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass der HSP *Gmhsp17.5-E* zum Zeitpunkt der Untersuchung inaktiv war. Aufgrund der Ergebnisse des ersten Abschnittes (Abschnitt 3.1.2), konnte jedoch eine Aktivität des HSP unter Standard *in vitro* Kulturbedingungen nicht ausgeschlossen werden.

Um zu prüfen, ob die Übertragung des Schorfresistenzgens *Rvi6* in die schorfanfälligen Apfelsorten zu einer Verbesserung der Resistenz gegenüber Apfelschorf führte, wurde ein Schorfresistenztest an den transgenen Linien mit zwei verschiedenen Isolaten durchgeführt (Abschnitt 3.2.1.4). Das Isolat 104 wurde ursprünglich von 'Golden Delicious' gewonnen und kann das Apfelschorfresistenzgen *Rvi1* brechen (Caffier et al, 2014), jedoch nicht die *Rvi6* Schorfresistenz überwinden. Das Isolat D42a wurde ursprünglich von 'Prima' gewonnen und kann die Apfelschorfresistenzgene *Rvi1*, *Rvi6* und *Rvi10* brechen (Caffier et al, 2014). Pflanzen mit einem funktionellem *Rvi6* Gen sollten gegenüber dem Isolat 104 resistent und gegenüber dem Isolat D42a anfällig sein. Somit konnte das Isolat 104 für die Identifizierung von transgenen Linien mit einer verbesserten Schorfresistenz genutzt werden. Das Isolat D42a diente zur Identitätsbestätigung des transferierten *Rvi6* Gens. Alle erzeugten transgenen Linien waren anfällig gegenüber dem Isolat D42a (Tabelle 3), wie es für Pflanzen mit *Rvi6* Gen erwartet wird (Parisi et al, 1993). Sechszehn der 22 transgenen Linien waren gegenüber dem Isolat 104 resistent (Tabelle 3), wodurch eine verbesserte Schorfresistenz für diese Linien belegt werden konnte. Schorfanfällige transgene Linien gegenüber dem Isolat 104 wurden für die Sorten 'Brookfield Baigent' (eine von 8 Linien) und 'Novajo' (5 von 6 Linien) identifiziert (Tabelle 3), obwohl für alle transgenen Linien sowohl die Präsenz (Abbildung 10) als auch die Expression (Abbildung 12) des *Rvi6* Gens gezeigt werden konnte. Die qRT-PCR-Analyse zweier anfälliger transgener Linien gegenüber Isolat 104 ergab eine vergleichbare *Rvi6* Expression, wie in resistenten transgenen Linien und resistenten *Rvi6* tragenden Sorten (Tabelle 3, Abbildung 14). Somit konnte eine verminderte *Rvi6* Expression als Ursache für die Schorfanfälligkeit einiger transgener Linien gegenüber dem Isolat 104 ausgeschlossen werden. Ein ähnlicher Fall konnte bereits durch Joshi und Mitarbeiter (2011) beobachtet werden. Eine mögliche Ursache für die beobachtete Anfälligkeit gegenüber Isolat

104 kann eine Mutation in der *Rvi6* kodierenden Region sein, wodurch ein nicht-funktionales Genprodukt entstehen könnte.

Abgesehen davon konnte für alle vier erfolgreich transformierten Apfelsorten mindestens eine schorfresistente transgene Linie erzeugt werden. Um die Schorfresistenz der Sorten 'Brookfield Baigent', 'Mitchgla', 'Pinova' und 'Novajo' zu verbessern, war die alleinige Übertragung des *Rvi6* Schorfresistenzgens ausreichend. Bei früheren Studien wurde das *Rvi6* Schorfresistenzgen bereits in die Sorte 'Gala' (Belfanti et al, 2004; Joshi et al, 2011; Szankowski et al, 2009; Vanblaere et al, 2011) sowie in die Sorte 'Elstar' (Szankowski et al, 2009) übertragen. In den meisten Fällen war das Resistenzlevel der transformierten Pflanzen erhöht. In wenigen Fällen wurde trotzdem ein vermindertes Resistenzlevel im Vergleich zur *Rvi6* tragenden Sorte 'Florina' beobachtet (Vanblaere et al, 2014). Alle bisher durchgeführten Transformationsexperimente mit *Rvi6* deuten auf eine stark konservierte nachfolgende Resistenzkaskade hin, die in allen Apfelsorten vorhanden ist. Die Aktivierung des Resistenzmechanismus benötigt lediglich die Präsenz eines passenden Resistenzgens wie *Rvi6*, wodurch ein Rezeptor-ähnliches Protein (RLP, *receptor like protein*) gebildet wird. Das gebildete RLP vermittelt die Erkennung eines bisher unbekanntem extrazellulären Effektors, der durch *V. inaequalis* in den Apolplasten der Apfelpflanze sekretiert wird (Stotz et al, 2014).

Um dem durch Schouten und Mitarbeiter (2006a; 2006b) vorgeschlagenen cisgenetischen Konzept zu entsprechen, wurde das *Rvi6* Gen vom BAC Klon 18-5 der *Rvi6* tragenden Sorte 'Florina' (Vinatzer et al, 2001), inklusive 1315 bp bzw. 536 bp seiner endogenen 5'- bzw. 3'-regulatorischen Sequenzen, kloniert. Die genaue Untersuchung der *Rvi6* Expression von vierzehn ausgewählten transgenen Linien und fünf *Rvi6* tragenden Sorten mittels qRT-PCR ergaben ein vergleichbares *Rvi6* mRNA-Expressionslevel zwischen den erzeugten transgenen Linien und traditionell gezüchteten *Rvi6* tragenden Sorten (Tabelle 3, Abbildung 14). In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Joshi et al, 2011), konnte keine Korrelation zwischen der Stärke der *Rvi6* mRNA-Expression und der Anzahl der T-DNA-Integrationsorten festgestellt werden (Abbildung 14). Die erhobenen *Rvi6* mRNA-Expressionsdaten der transgenen Linien (0,2- bis 3,0-fach relativ zu 'Santana') waren vergleichbar mit Daten von Joshi et al (2011). In diesen Arbeiten wurde eine 288 bp bzw. 2000 bp lange native *Rvi6* Promotorsequenz, jeweils in

Kombination mit 437 bp der nativen 3'-Terminatorsequenz, verwendet und eine durchschnittliche *Rvi6* mRNA-Expression von 0,6- bzw. 3,3-fach relativ zu 'Santana' gemessen. Deutlich höhere *Rvi6* mRNA-Expressionslevel wurden durch Szankowski und Mitarbeiter (2009) festgestellt, die verschiedene Längen der nativen Promotorsequenz getestet haben. Ob das höhere *Rvi6* mRNA-Expressionsniveau durch den verwendeten NOS Terminator oder durch andere Faktoren, wie den T-DNA-Integrationsort, bedingt wurde, ist unklar. Sehr geringe *Rvi6* mRNA-Expressionslevel wurden bei den durch Vanblaere und Mitarbeiter (2011) entwickelten *Rvi6* tragenden 'Gala'-Pflanzen gemessen, in denen *Rvi6* durch 242 bp und 220 bp seiner nativen Promotor- bzw. Terminatorsequenz reguliert wird (Vanblaere et al, 2014). Obwohl die gemessene *Rvi6* mRNA-Expression bei den verschiedenen Studien variierte, konnte immer eine gesteigerte Schorfresistenz erzielt werden. Die gewählte endogene *Rvi6* Promotorlänge von 1315 bp der vorliegenden Arbeit scheint für einen cisgenen Ansatz optimal zu sein, da alle entwickelten transgene Linien ein vergleichbares *Rvi6* Expressionslevel zu traditionell gezüchteten *Rvi6* tragenden Sorten aufwiesen.

Um unerwünschte Gensequenzen (*nptII*, *dao1* und *flp*) aus dem Genom transgener Apfelpflanzen zu entfernen, wurde das hitzeinduzierbare Flp/*FRT* Rekombinasesystem (Herzog et al, 2012; Kap. 3.1), wie in Abbildung 1 C illustriert, verwendet. Dafür wurden nur transgene Linien gewählt, die einen einzelnen T-DNA-Integrationsort aufwiesen, resistent gegenüber dem *V. inaequalis* Isolat 104 waren und möglichst eine vergleichbare *Rvi6* mRNA-Expression zu traditionell gezüchteten *Rvi6* tragenden Sorten zeigten. Dies traf auf die Linien M879, M896, M898 und M946 von den Sorten 'Pinova' und 'Brookfield Baigent' zu (Kap. 3.2.3). Für keine der vier gewählten transgenen Linien konnte die Integration vom Vektorrückgrat festgestellt werden (Abschnitt 3.2.2.1). Nachdem die Genauigkeit der T-DNA-Integration untersucht wurde (Abschnitt 3.2.2.1), konnte problemlos der T-DNA-Integrationsort für alle vier transgenen Linien bestimmt werden (Abschnitt 3.2.2.2, Tabelle 4). Für zwei Linien (M879, M946) war die T-DNA-Integrationsortbestimmung von beiden T-DNA *border* Sequenzen ausgehend erfolgreich. Für die beiden anderen Linien (M896, M898) konnte der T-DNA-Integrationsort nur von einer *border* Sequenz ausgehend bestimmt werden. Der Einbau der T-DNA führte bei diesen Linien stets zu einem Verlust von T-DNA Sequenz. Manchmal waren davon lediglich

Teile der *border* Sequenz betroffen (LB, Linie M898 und M946), doch meist fehlten über die *border* Sequenz hinaus Teile der T-DNA. Für die Linien M879 und M946 wurde der Verlust von Apfelgenomsequenz am T-DNA-Integrationsort festgestellt, wobei für die Linie M946 eine zusätzliche Integration von 80 bp gefunden wurde (Tabelle 4). Die *A. tumefaciens* vermittelte T-DNA-Integration in das Apfelgenom führt oft zu Verlust der T-DNA Grenzsequenzen, kann aber auch die Integration unerwünschter Vektorrückgratsequenz zur Folge haben (Yao et al, 2013; Weigl et al, 2015; Vanblaere et al, 2014; Kost et al, 2015). Beim Apfel konnte der Verlust von genomischer DNA am T-DNA-Integrationsort ebenfalls in anderen Arbeiten beobachtet werden (Yao et al, 2013; Flachowsky et al, 2011; Weigl et al, 2015; Kost et al, 2015). Erst die Kenntnis über den konkreten T-DNA-Integrationsort ermöglichte eine genaue Analyse später produzierter cisgenerer Pflanzen.

Unter Ausnutzung des hitzeinduzierbaren Flp/*FRT* Rekombinasesystems in der T-DNA, konnten durch Ausführung der HÜ „MSO“ und „Feuchtekammer“ an ausgewählten transgenen Linien (Abbildung 2, Abschnitt 3.2.3.1) zwei cisgene Apfellinien, je eine für die Sorten 'Pinova' und 'Brookfield Baigent', hergestellt werden (Abschnitt 3.2.3.2, Tabelle 5). Das T-DNA integrierte D-Aminosäure/DAAO Selektionssystem, welches durch Hättasch und Mitarbeiter (2009) für die Selektion von Sprossen ohne *dao1* und somit ohne Rekombinasekassette auf Basis vom D-Ile vorgeschlagen wurde, ermöglichte keine Selektion von cisgenen Apfelsprossen. Unter dem Einfluss von D-Ile setzte bei den regenerierten Apfelpflänzchen kein Sprosslängenwachstum ein. Eine Vermehrung von Einzelsprossen war infolgedessen nicht durchführbar. Zusätzlich überlebten transgene Zellen für mehrere Monate auf Medium mit D-Ile (Abschnitt 3.2.3.2). Diese beiden Befunde konnten aus vorhergehenden Arbeiten nicht abgeleitet werden (Hättasch et al, 2009), schließen jedoch das D-Aminosäure/DAAO Selektionssystem als negatives Selektionssystem für den Apfel aus. Bei zukünftigen *Clean Vector* Technologie-Vektoren sollte das *dao1* Gen durch das *codA* Gen ersetzt werden, um die gleiche negative Selektionsstrategie wie für die pMF1 Vektoren (Schaart et al, 2004) zu nutzen. Dennoch war die Produktion cisgener Apfelpflanzen durch Verwendung des Vektors p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 (Abbildung 1 C) möglich, obwohl der negative Selektionsschritt nach Induktion des Systems entfiel. Die Identifikation cisgener Sprosse erfolgte PCR-basiert, wobei insgesamt 978 putativ cisgene Sprosse auf

ein Flp vermitteltes Rekombinationsereignis hin untersucht wurden (Abschnitt 3.2.3.2, Tabelle 5). Für nur zwei Einzelsprosse konnte die Abwesenheit der Rekombinasekassette lokalisierten Transgene belegt werden (Abbildung 16). Daraus ergab sich eine erfolgreiche Rekombination nach Anwendung der HÜ „MSO“ und „Feuchteammer“ für 2,2 % bzw. 0,1 % der analysierten Einzelsprosse (Tabelle 5). Die Erfolgsrate der Rekombination nach der HÜ „Feuchteammer“ war für den Vektor p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 im Vergleich zum Vektor pB-Npt-Hsp-Flp-Gus (Abschnitt 3.1.1.3) deutlich geringer. Bei der Erstellung der ersten cisgenen feuerbrandresistenten Pflanze mit dem Vektor p9-Dao-FLPi-FB_MR5 wurde ebenfalls eine PCR-basierte Selektion von cisgenen Sprossen durchgeführt (Kost et al, 2015). Die dort verwendete Methode der Induktion des Rekombinasesystems über Hitze ähnelt der hier entwickelten HÜ „Feuchteammer“ (vgl. Abbildung 2) sehr stark und führte bei 0,9 % der analysierten Sprosse (4 von 447) zu einer Rekombination (Kost et al, 2015). Bei der Verwendung des pMF1 Vektors für die Erzeugung cisgener 'Gala'-Pflanzen war die Erfolgsrate der Rekombination nach Aktivierung des Rekombinasesystems deutlich größer, allerdings konnte bei diesen Arbeiten eine negative Selektion durch 5-Fluorocystein auf Basis des *codA* Gens nach Aktivierung des Rekombinasesystems angewendet werden (Vanblaere et al, 2011). In jüngsten Experimenten war die erfolgreiche Rekombination für die Erzeugung cisgener 'Gala'-Pflanzen auf Basis des pMF1 Vektors, trotz negativer Selektion, sehr gering (Krens et al, 2015). Für die zwei hier erzeugten cisgenen Linien wurde die Abwesenheit der Rekombinasekassette lokalisierten Transgene durch Southern Blot Analyse und durch Kultivierung auf selektiven Agenzien bestätigt (Abbildung 17 und Abbildung 18). Auf Grundlage des bekannten T-DNA-Integrationsortes der jeweiligen transgenen Ursprungslinie (Tabelle 4), konnten Rekombinationsort überspannende PCR-Produkte für die cisgenen Linien iM879-68 und iM946-193 erzeugt und sequenziert werden (Abschnitt 3.2.4.3). Die Ergebnisse bestätigten für die cisgenen Linien den für die transgenen Ursprungslinien bestimmten T-DNA-Integrationsort und belegten eine fehlerfreie Exzision der Rekombinasekassette zwischen den FRT-Sequenzen (Abbildung 19). Die fehlerfreie Funktion des Flp/*FRT* Rekombinasesystems im Apfel wurde bereits durch vorhergehende Arbeiten gezeigt (Herzog et al, 2012).

Das Ausschneiden der Rekombinasekassette aus der im pflanzlichen Genom integrierten T-DNA hatte keinen Einfluss auf die Schorfresistenz der erzeugten

cisgenen Linien im Vergleich zu ihren transgenen Ursprungslinien (Kap. 3.2.4.5, Abbildung 21). Ungeachtet dessen, wurde für die cisgene Linie iM879-68 eine Änderung im *Rvi6* mRNA-Expressionslevel im Vergleich zu ihrer transgenen Ursprungslinie M879 festgestellt (Kap. 3.2.4.4, Abbildung 20, Tabelle 6). Eine Veränderung des *Rvi6* mRNA-Expressionslevels nach dem Ausschneiden der Rekombinasekassette konnte auch für die durch Vanblaere und Mitarbeiter (2011) entwickelten cisgenen Apfelinien beobachtet werden (Vanblaere et al, 2014). Inwiefern und mit welchem Ausmaß die Expression des GOIs solcher Vektoren durch die Rekombinasekassette beeinflusst wird ist unbekannt und muss durch weitere Experimente geklärt werden.

Der am JKI Dresden-Pillnitz entwickelte Vektor p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2 bietet eine Alternative zum pMF1 Vektorsystem (Schaart et al, 2004), auch wenn Verbesserungen im Vektordesign notwendig sind. Mit dem Vektor p9-*Dao1*-FLPi-HcrVf2 wurden in der vorliegenden Arbeit zwei neue cisgene Apfelinien für zwei verschiedene Apfelsorten produziert, die dem durch Schouten und Mitarbeiter (2006a; 2006b) definierten Konzept der Cisgenetik entsprachen. Beide Linien besaßen ein funktionelles *Rvi6* Gen, wodurch nachweislich eine vollständige Resistenz gegenüber *V. inaequalis* Isolat 104 erzeugt wurde. Die Markteinführung solcher Linien würde sowohl für den Anbauer als auch den Verbraucher sowie für die Umwelt einen großen Vorteil bringen. Seit Jahren werden traditionell gezüchtete *Rvi6* tragende Sorten, in Regionen wo *V. inaequalis* Rasse 6 vorhanden ist, im kommerziellen Anbau verwendet. Studien belegen einen ca. 80 % verminderten Verbrauch von Fungiziden in der Saison beim Anbau von *Rvi6* tragenden Sorten im Vergleich zum Anbau von schorfanfälligen Sorten (Fischer, 2004; Fischer und Fischer, 2008; Sansavini et al, 2004). Der Anbau von *Rvi6* tragenden cisgenen Linien würde die Produktion von marktrelevanten Apfelsorten bei einem drastisch gesenktem Fungizideinsatz ermöglichen.

Die Einstufung cisgener Pflanzen vor dem europäischen Gesetz ist bisher noch nicht erfolgt. Somit ist ungeklärt, ob in Europa die Regularien für gentechnisch veränderte Organismen (GVO) für cisgene Pflanzen gelten. Im Jahr 2011 präsentierte die durch die Europäische Kommission gegründete *New Techniques Working Group* (NTWG) einen Bericht, demzufolge im Falle eines pflanzlichen Genoms ein DNA-Abschnitt mindestens 20 Nukleotide betragen muss, damit er

als einzigartig betrachtet werden kann (Lusser et al, 2011; Lusser et al, 2012). Des Weiteren kann die vorsätzliche Anwendung einer genetischen Modifizierungstechnik ebenfalls erst für DNA-Abschnitte ab dieser Größe nachgewiesen werden (Lusser et al, 2011; Lusser et al, 2012). Auf nationaler Ebene stimmte die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) der Stellungnahme durch die NTWG zu (BVL, 2012).

Die beiden erzeugten cisgenen Linien besaßen neben der verbliebenden einzelnen FRT-Sequenz (34 bp) zusätzlich einige nicht-kodierende DNA-Abschnitte von der T-DNA in ihrem Genom (Abschnitt 3.2.4.3, Abbildung 19). Diese Abschnitte waren größer als 20 bp und sind beim Vektorkonstruktionsprozess entstanden. Insgesamt umfassten diese DNA-Abschnitte eine Gesamtgröße von 223 bp für die cisgene Linie iM879-68 und 423 bp für die cisgene Linie iM946-193 (Abbildung 19). Auf Basis des Endberichtes der NTWG und der Stellungnahme durch die ZKBS werden die produzierten cisgenen Linien wahrscheinlich als GVOs eingestuft. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, *European Food Safety Authority*) hat eine wissenschaftliche Stellungnahme zur Sicherheit von cisgenen Pflanzen veröffentlicht (EFSA, 2012). Darin steht, dass von einem vergleichbaren Risiko bei cisgenen Pflanzen wie bei traditionell gezüchteten Pflanzen ausgegangen werden kann. Für entwickelte cisgene Pflanzen empfiehlt diese Stellungnahme eine Einzelfallbegutachtung, basierend auf den existierenden Richtlinien „*Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants*“ (EFSA, 2011) und „*Guidance on the environmental risk assessment for genetically modified plants*“ (EFSA, 2010). Ob diese Vorgehensweise zu einem anderen Schluss bezüglich des GVO Status für die neu entwickelten cisgenen Apfelinien führen würde, ist unklar. Das Europäische Parlament hat bis heute noch keine Entscheidung getroffen, wie cisgene Pflanzen eingestuft werden. Die politische Situation um die neue Züchtungsmethode der Cisgenetik ist nach wie vor ungeklärt.

Ungeachtet der zuvor beschriebenen offenen politischen Situation stellt der cisgenetische Ansatz eine neue Züchtungsstrategie dar, die ein großes Nutzenpotenzial sowohl für den Anbauer und als auch für den Verbraucher besitzt. Aus diesem Grund sollte die Cisgen-Technologie weiterentwickelt werden. Eine Verbesserung wären neue Transformationsvektoren, die im Endprodukt

möglichst wenig, im besten Falle weniger als 20 bp zusammenhängende Fremd-DNA zurücklassen. Solch ein Ansatz würde die Chance erhöhen, dass cisgene Pflanzen nicht als GVOs eingestuft werden. Ein hypothetischer Transformationsvektor, reduziert um die oben erwähnten nicht-kodierenden Fremd-DNA Abschnitte, würde lediglich eine einzelne FRT-Sequenz (34 bp) im Endprodukt zurücklassen. Eine BLAST Analyse der FRT-Sequenz gegen das Apfelgenom ergab identische Sequenzen zum mittleren und zum hinteren Teil der FRT-Sequenz (Tabelle 11).

Tabelle 11 Untersuchung zur Präsenz der FRT-Sequenz im Apfelgenom. Modifiziert nach Würdig et al (2015). Die Originalquelle der Veröffentlichung ist bei Springer unter <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8> verfügbar. The original source of publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-015-0291-8>.

Suchanfrage	Sequenz	Treffer (Strang)
FRT-Sequenz	gaagttcctatttctctagaaagtataggaacttc	
	cctatttctctagaaagt	LG9:1320451..1320435 (+/-)
	aaagtataggaacttc	LG1:3870208..3870223 (+/+)
	aaagtataggaacttc	LG1:3893221..3893236 (+/+)
	cctatttctctagaaagt	LG12:21344336..21344351 (+/+)
	aaagtataggaacttc	LG1:3905214..3905229 (+/+)

Die Nukleotidsequenz der FRT-Sequenz wurde, unter Verwendung der NCBI BLAST Funktion der *Genome Database for Rosaceae* (GDR) *Malus xdomestica* v1.0, im Apfelgenom (*Apple Genome V1.0 contigs*) gesucht.

Aufgrund dieser Erkenntnis ist es fraglich, ob eine einzelne FRT-Sequenz, im Sinne der Stellungnahmen durch die NTWG und der ZKBS, als einzigartig eingestuft werden kann.

Um die „20 bp Regel“ zu umgehen, wären alternative Transformationsvektoren denkbar. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Transformationsvektoren ohne Selektionsmarker, was allerdings eine aufwendige PCR-basierte Selektionsstrategie erfordert (De Vetten et al, 2003; Malnoy et al, 2010). Die Anwendung von Transformationsvektoren mit einem apfeleigenen Selektionsmarker (Kortstee et al, 2011) stellt auch eine Option dar. In beiden Fällen wäre die Anwendung eines Rekombinasesystems nicht mehr notwendig.

4.3 Untersuchungen zum *Rvi15* Schorfresistenzlocus

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der *Rvi15* Locus aus GMAL 2473 (Abbildung 22) in ausgewählten Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' × GMAL 2473 (Galli et al, 2010b) genauer charakterisiert. Der Locus umfasst die drei Schorfresistenzkandidatengene *Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C* (Galli et al, 2010a). Dreizehn ausgewählte Nachkommen der Kartierungspopulation wurden genauer untersucht, sie beinhalteten fünf rekombinante Pflanzen (33, 84, 595, 860 und 918) für den *Rvi15* Locus. Für alle dreizehn Nachkommen standen dem JKI Dresden-Pillnitz Markerdaten sowie Daten zur Schorfresistenz zur Verfügung (Abbildung 22, Tabelle 7). Durch einen PCR-basierten Ansatz sollte die Präsenz der drei Kandidatengene in den rekombinanten Pflanzen untersucht werden. Nach einem Abgleich der jeweiligen Kandidatengensequenzen mit der Genomsequenz von 'Golden Delicious' wurden GMAL 2473 spezifische Primerkombinationen zum Nachweis der Kandidatengene *Vr2-B* und *Vr2-C* sowie Primer für den Nachweis GMAL 2473 charakteristischer SNPs stromabwärts vom Kandidatengen *Vr2-A* entwickelt (Abschnitt 3.3.3).

In den Pflanzen 33, 595 und 918 lag die Rekombination zwischen dem Markern ARGH17 und 43M10RP vor (Abbildung 22), die lediglich einen Abstand von 4224 bp aufweisen (Galli et al, 2010a). Der Marker ARGH17 befindet sich im 2. Exon der proteinkodierenden Region des Kandidatengens *Vr2-A* (Abbildung 22; Galli et al, 2010a). Der Marker 43M10RP ist zwischen den Kandidatengenen *Vr2-A* und *Vr2-B* lokalisiert (Abbildung 22; Galli et al, 2010a). Obwohl sich das Kandidatengen *Vr2-A* am Rand des *Rvi15* Locus befindet, wurde es als potentiell Schorfresistenzgen nicht ausgeschlossen (Galli et al, 2010a). In den drei rekombinanten Pflanzen 33, 595 und 918 hat die Rekombination möglicherweise innerhalb des *Vr2-A* Gens stattgefunden, wodurch sich sowohl ein Funktionsverlust als auch eine Funktionssteigerung des Schorfresistenzkandidatengens ergeben kann (Galli et al, 2010a). Die rekombinanten Pflanzen 33 und 918 wurden als schorfresistent bonitiert, beide Pflanzen zeigten für den Marker ARGH17 das 'Golden Delicious' Allel, wohingegen der Marker 43M10RP das GMAL 2473 Allel aufwies (Tabelle 7). Für beide Pflanzen konnten GMAL 2473 charakteristische SNPs 387 bp bis 1382 bp stromabwärts des *Vr2-A* Gens nachgewiesen werden (Abbildung 23 A). Die

Position 1382 bp stromabwärts von *Vr2-A* liegt innerhalb der Region, die der SCAR Marker 43M10RP amplifizierte (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Rekombinationsort für die Pflanzen 33 und 918 auf die Region zwischen dem ARGH17 Marker und 387 bp stromabwärts des *Vr2-A* Gens eingeschränkt. Da der physikalische Abstand zwischen diesen zwei Positionen weniger als 3,5 kbp beträgt und davon ca. 3,1 kbp zum *Vr2-A* Gen gehören, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Rekombination innerhalb des Kandidatengens stattgefunden hat. Zusätzlich konnte für beide Pflanzen die Präsenz der Kandidatengene *Vr2-B* und *Vr2-C* gezeigt werden (Abbildung 23 B und C). Die rekombinante Pflanze 595 wurde als schorfanfällig eingestuft. In dieser Pflanze lag der Marker ARGH17 im GMAL 2473 Zustand und der Marker 43M10RP im 'Golden Delicious' Zustand vor (Tabelle 7). Für diese Pflanze konnten keine GMAL 2473 charakteristischen SNPs 387 bp bis 1382 bp stromabwärts des *Vr2-A* Gens nachgewiesen werden (Abbildung 23 A). Auch hier ist der Rekombinationsort wahrscheinlich im *Vr2-A* Gen zu finden. Darüber hinaus war in der rekombinanten Pflanze 595 weder das *Vr2-B* noch das *Vr2-C* Kandidatengen nachweisbar (Abbildung 23 B und C). Durch die rekombinanten Pflanzen 33, 595 und 918 konnte keines der drei Kandidatengene als Schorfresistenz vermittelndes Gen ausgeschlossen oder identifiziert werden. Trotzdem ist das *Vr2-A* Gen vermutlich nicht das gesuchte Schorfresistenzgen. Obwohl eine große Homologie für die *Vr2-A* proteinkodierende Region zwischen GMAL 2473 und 'Golden Delicious' besteht, ist es unwahrscheinlich, dass *Vr2-A* in den rekombinanten Pflanzen 33 und 918 noch voll funktionsfähig ist, nachdem die Rekombination mutmaßlich innerhalb des *Vr2-A* Gens stattgefunden hat. Die Untersuchung der Expression von *Vr2-A* in den rekombinanten Pflanzen 33, 595 und 918 könnte weitere Erkenntnisse liefern.

Für die rekombinanten Pflanzen 84 und 860 wurde das Rekombinationsereignis zwischen den Markern 41A24T7 und 21K14T7 detektiert. Der Marker 41A24T7 ist zwischen den Kandidatengenen *Vr2-B* und *Vr2-C* lokalisiert. Der Marker 21K14T7 liegt stromabwärts vom Kandidatengen *Vr2-C* (Abbildung 22; Galli et al, 2010a). Die rekombinante Pflanze 84 wurde als schorfresistent evaluiert, für diese Pflanze zeigte der Marker 41A24T7 das GMAL 2473 Allel und der Marker 21K14T7 wies das 'Golden Delicious' Allel auf (Tabelle 7). Für diese Pflanze wurde die Anwesenheit der Kandidatengene *Vr2-B* und *Vr2-C* sowie die Präsenz GMAL 2473 charakteristischer SNPs stromabwärts vom Kandidatengen *Vr2-A*

gezeigt (Abbildung 23 A, B und C). Für die Pflanzen 84 konnte somit der Rekombinationsort auf den Bereich stromabwärts von *Vr2-C* beschränkt werden, wodurch jedoch kein Kandidatengen als Schorfresistenz vermittelndes Gen ausschließbar oder identifizierbar war. Die rekombinante Pflanze 860 wurde als schorfanfällig bewertet, hier lag der Marker 41A24T7 im 'Golden Delicious' und der Marker 21K14T7 im GMAL 2473 Zustand vor (Tabelle 7). Für die Pflanze 860 konnten weder die Kandidatengene *Vr2-B* und *Vr2-C*, noch die Anwesenheit GMAL 2473 spezifischer SNPs stromabwärts vom Kandidatengen *Vr2-A* gezeigt werden. Wie für die Pflanze 84 konnte der Rekombinationsort für die Pflanze 860 auf den Bereich stromabwärts von *Vr2-C* beschränkt werden. Durch die erhaltenen Ergebnisse für die Pflanze 84 war gleichermaßen kein Kandidatengen als Schorfresistenz vermittelndes Gen ausschließbar oder identifizierbar.

Neben den rekombinanten Pflanzen dienten acht weitere Nachkommen der Kartierungspopulation als Referenzen (169, 419, 551, 638, 803, 825, 855 und 934). Von diesen Pflanzen waren drei schorfresistent und fünf schorfanfällig; keine dieser Pflanzen zeigte eine Rekombination im *Rvi15* Schorfresistenzlocus (Tabelle 7). Wie erwartet, konnten für die schorfresistenten Referenzpflanzen die Kandidatengene *Vr2-B*, *Vr2-C* und die GMAL2473 charakteristischen SNPs stromabwärts von *Vr2-A* nachgewiesen werden. Für die schorfanfälligen Referenzpflanzen konnten weder die GMAL2473 spezifischen SNPs noch die Kandidatengene *Vr2-B* und *Vr2-C* nachgewiesen werden (Abbildung 23 A, B und C).

Erst kürzlich wurde *Vr2-C* als Schorfresistenz vermittelndes Gen des *Rvi15* Resistenzlocus identifiziert (Schouten et al, 2014). Dafür wurden die Kandidatengene *Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C* jeweils als Cisgene in den pMF1 Vektor (Schaart et al, 2004) kloniert und in die schorfanfällige Sorte 'Gala' transformiert. Die erzeugten transgenen *Vr2-A*, *Vr2-B* und *Vr2-C* 'Gala' Linien wurden einem Schorfresistenztest unterzogen, wobei nur die *Vr2-C* transgenen 'Gala' Linien sich als schorfresistent erwiesen (Schouten et al, 2014).

4.4 ***MYB10 (R6)* als Alternative zum Rekombinase-system für den cisgenetischen Ansatz beim Apfel**

Bei *MYB10 (R6)* handelt es sich um ein Allel des *MYB10* Gens aus dem Apfel (Espley et al, 2009). Das *MYB10* Gen kodiert für einen TF, der die Anthocyanbiosynthese im Apfel als Schlüsselregulator positiv beeinflusst (Espley et al, 2007). Im *MYB10 (R6)* Allelzustand des Gens liegt eine Mutation im Promotor vor, wodurch eine Autoinduktion der *MYB10* Genexpression bedingt wird (Espley et al, 2009). Eine starke *MYB10* Expression äußert sich in abundanten Anthocyanmengen, die deutlich sichtbar sind (Espley et al, 2007; Espley et al, 2009). Das *MYB10 (R6)* Allel führt beim Apfel zur phänotypischen Ausprägung rot pigmentierter Gewebe, insbesondere der Sprossachse, der Laubblätter und des Fruchtfleisches (Espley et al, 2009). Strukturell weist der *MYB10* Promotor des *MYB10 (R6)* Allels eine fünffache Wiederholung eines 23 bp langen *MYB10* Promotorsegmentes auf, wodurch sich eine Minisatelliten-ähnliche Struktur ergibt (Espley et al, 2009). Auf Grundlage dieser Fakten besitzt *MYB10 (R6)* nachweislich das Potenzial, um als apfeleigener morphologischer Marker zu fungieren (Kortstee et al, 2011). Für eine zuverlässige Verwendung von *MYB10 (R6)* als Marker ist jedoch eine umfangreiche Charakterisierung von *MYB10*, mit Fokus auf das *MYB10 (R6)* Allel, notwendig.

Im ersten Teil des Abschnittes 3.4.1 wurde die Länge einer definierten *MYB10* Promotorregion für den Apfel artübergreifend evaluiert (Kap. 3.4.1.1). Die Untersuchung erfolgte PCR-basiert, durch die Verwendung von *MYB10* Promotor Mini- und Mikrosatellit flankierende Primern. In diesem Ansatz wurde der Fragmentlängenpolymorphismus dieser Region zwischen Pflanzen mit *MYB10 (R6)* und *MYB10 (R1)* Allel ausgenutzt (Abschnitt 3.4.1.1, Abbildung 24). Ein besonderes Interesse galt dem möglichen Vorhandensein von Allelen mit Größen zwischen dem *MYB10 (R1)* Allel (ca. 130 bp) und dem *MYB10 (R6)* Allel (ca. 230 bp). Die hypothetische Annahme, dass die Insertion des Minisatelliten nicht auf ein einzelnes Integrationsereignis zurückgeht, sondern das Ergebnis mehrerer aufeinanderfolgender Integrationen ist, lässt auf die Anwesenheit von Zwischenallelen schließen. Diese Zwischenallele (R2 bis R5) sollten Mikrosatelliten mit einem bis vier Wiederholungen des 23 bp langen Mikrosatellitenmotives GTTAGACTGGTAGCTATTAACAA (Espley et al, 2009) aufweisen. Bisher wurden solche Zwischenallele für den *MYB10* Promotor noch

nicht gefunden. Um Größenunterschiede von ≥ 23 bp detektieren zu können, wurde der klassische PCR-Ansatz für die Detektion der *MYB10 (R1)* und *MYB10 (R6)* Allele (Espley et al, 2009; Van Nocker et al, 2011) mit einer Fragmentgrößenanalyse kombiniert. Mit dieser Strategie wurden für die 357 untersuchten Akzessionen der *Malus* Sammlung eine unerwartete Diversität an *MYB10* Promotorallelen detektiert (Abbildung 25, Abbildung 26). Insgesamt konnten 32 verschiedene Allellängen nachgewiesen werden, die Größen von 121 bp bis hin zu ~ 1 kbp aufwiesen. Je Akzession konnten ein bis vier unterschiedliche *MYB10* Promotorallellängen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit von mehreren *MYB10* Allelen in einer Akzession konnte durch das erhöhte Ploidielevel in einigen *Malus* Arten bzw. Akzessionen erklärt werden. Höfer und Meister (2010) haben den Ploidiegrad aller Akzessionen der *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden untersucht. Die meisten Akzessionen waren diploid, eine Vielzahl der Akzessionen wurde als tri- bzw. tetraploid identifiziert und einzelne Akzessionen von *Malus sikkimensis* und *Malus sargentii* besaßen einen penta- bzw. hexaploiden Chromosomensatz. Alle Akzessionen die drei oder vier verschiedene *MYB10* Promotorallele aufwiesen gehörten zu *Malus* Arten, die als tri-, tetra- oder pentaploid beschrieben wurden (Höfer und Meister, 2010)

Am häufigsten kamen *MYB10* Promotorallele mit einer Größe von 125 bis 138 bp sowie von 236 bp vor (Abbildung 26). Das letztgenannte Allel entsprach dem *MYB10 (R6)* Allel. Allele mit anderen Größen (139 bis 427 bp, 121 bp und 124 bp) wurden nur vereinzelt detektiert (Abbildung 26). PCR-Produkte > 140 bp wurden nur mit der Fragmentgrößenanalyse erfasst und waren nicht im Agarosegel sichtbar (Daten nicht gezeigt). Die Magnitude der Peaks dieser Produkte war wesentlich kleiner, als die Magnitude von Peaks die häufig vorkommenden Allele repräsentierten (Daten nicht gezeigt). Mit Ausnahme des 147 bp großen Produktes von der *Malus fusca* Akzession MAL0768 (Tabelle 8), gelang die Klonierung dieser Produkte nicht (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund war der Ursprung der größeren PCR-Produkte unklar, möglicherweise handelte es sich um PCR-Artefakte. Ein Sonderfall stellte das 1 kbp große PCR-Produkt dar, das nicht in der Fragmentgrößenanalyse nachgewiesen werden konnte (außerhalb des Detektionsbereiches), allerdings im Agarosegel deutlich sichtbar war (Abbildung 25, Abbildung 26).

Die Sequenzanalyse von 21 amplifizierten *MYB10* Allelen und der Vergleich mit bereits publizierten *MYB10* Promotorsequenzen (Abschnitt 3.4.1.2; Tabelle 8) führte für den untersuchten *MYB10* Promotorabschnitt zu der Identifizierung einer konservierten Region stromabwärts vom Mikrosatelliten (GT)_n und einer variablen Region stromaufwärts vom Mikrosatelliten (Abbildung 27). Die sequenzierten *MYB10* (*R1*) Allele konnten als solche bestätigt werden. Zwischenformen des *MYB10* Promotors, wie beispielsweise ein *MYB10* (*R2*) Allel, konnten nicht identifiziert werden. Der Größenunterschied unter den sequenzierten *MYB10* (*R1*) Allelen (119 bp bis 147 bp) ergab sich primär durch die variable Länge des Mikrosatelliten (GT)_n und durch die Insertion von bis zu 11 bp direkt stromaufwärts des Mikrosatelliten (Tabelle 8). Die Anzahl detektierter Wiederholungen des Mikrosatellitenmotives GT variierten zwischen drei bis siebzehn (Tabelle 8). Bisher wurden sechs bis neun Wiederholungen des Mikrosatellitenmotives (GT) für den *MYB10* Promotor beschrieben (Espley et al, 2009). Aufgrund der variablen Länge des Mikrosatelliten und des Auftretens des Minisatelliten direkt stromaufwärts davon, schätzen Espley und Mitarbeiter (2009) den Mikrosatelliten im *MYB10* Promotor als Ort der Instabilität ein. Die hier erhaltenen Ergebnisse unterstützen diese Hypothese. Für die vier sequenzierten *MYB10* (*R6*) Allele wurde der Minisatellit ebenfalls direkt stromaufwärts vom Mikrosatelliten lokalisiert. Die vier untersuchten *MYB10* (*R6*) Allele wiesen eine fast identische Sequenz zur publizierten *MYB10* Promotorsequenz aus 'Niedzwetzkyana' (GenBank: EU518250) auf. Darüber hinaus wurde neben den bekannten *MYB10* (*R1*) und *MYB10* (*R6*) Allelen eine bisher unbekannte *MYB10* Promotorallelform entdeckt (~1 kbp Allel), welche eine ~850 bp große Insertion direkt stromaufwärts vom Mikrosatelliten aufwies (Tabelle 8). Der Mikrosatellit und die Region stromabwärts des Mikrosatelliten identifizierten das ~1 kbp Allel eindeutig als *MYB10* Promotorallel. Das ~1 kbp *MYB10* Allel wurde für insgesamt fünf verschiedene Akzessionen gefunden (Abschnitt 3.4.1.1). Diese fünf Akzessionen waren von den Apfelarten *M. sieversii* und *M. xdomestica* und bildeten weißes, cremefarbenes oder grünes Fruchtfleisch aus (Daten nicht gezeigt). Die ca. 850 bp große Insertion der sequenzierten 1 kbp Allele von MAL0214 und MAL0945 war fast identisch und wurde als ein putatives nicht-autonomes DNA-Transposon der Harbinger Familie, namentlich DNA3-8_Mad (Bao und Jurka, 2010), identifiziert. Die Insertion des putativen

Transposons in den *MYB10* Promotor erfolgte an exakt der gleichen Stelle, wie die Insertion des Minisatelliten im *MYB10 (R6)* Allel.

Eine weitere interessante Entdeckung war ein A/T SNP an der 17. Position des Minisatellitenmotives (Tabelle 8). Alle publizierten und sequenzierten *MYB10 (R1)* Allelsequenzen besaßen die Base Adenin an dieser Position. Im Gegensatz dazu wiesen alle publizierten und sequenzierten *MYB10 (R6)* Allelsequenzen und die beiden sequenzierten ~1 kbp *MYB10* Allele ein Thymin an der 17. Position des Minisatellitenmotives auf. Im Falle der *MYB10 (R6)* Allelsequenzen war Thymin für alle Repeats des Minisatelliten nachweisbar. Espley und Mitarbeiter (2009) beschrieben den Mechanismus der Autoregulation für die *MYB10* Genexpression beim Apfel. Sie identifizierten die *MYB10* Binderegion im *MYB10* Promotor, zwischen dem 6. und dem 18. Nukleotid des Minisatellitenmotives (ACTGGTAGCTATT). Der beschriebene SNP könnte die *MYB10* Autoregulation durch eine veränderte Interaktion zwischen dem *MYB10* Protein und dem *MYB10* Promotor (Espley et al, 2009) beeinflussen. Aufgrund des Adenins an der 17. Position des Minisatellitenmotives in *MYB10 (R1)* Promotorallelen, wäre eine verminderte Interaktion zwischen dieser Art *MYB10* Promotorallel und *MYB10* denkbar. Die Präsenz der Base Thymin an der 17. Position des Minisatellitenmotives der ~1 kbp *MYB10* Promotorallele ließ eine engere Verwandtschaft zwischen diesem *MYB10* Allel und dem *MYB10 (R6)* Allel vermuten. Diese beiden *MYB10* Allele könnten aus einem Ursprungsallel entstanden oder durch einen Austausch der inserierten Region auseinander hervorgegangen sein. Im Gegensatz dazu deutete eine Stammbaumanalyse der sequenzierten *MYB10* Promotorsequenzen auf eine engere Verwandtschaft zwischen den *MYB10 (R1)* Allelen und den ~1 kbp *MYB10* Allelen hin (Abbildung 28).

Um das Vorkommen des *MYB10 (R6)* Allels in Bezug zur Fruchtfleischfarbe zu setzen, wurden Daten zur Fruchtfleischfarbe von den Akzessionen der *Malus* Sammlung verwendet (Abschnitt 3.4.1.3). Ein Fokus lag dabei auf Akzessionen mit rot pigmentiertem Fruchtfleisch. Von 357 analysierten Akzessionen der *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden, die 26 verschiedenen Primärarten und 20 unterschiedliche Arthybriden der Gattung *Malus* repräsentieren, zeigten 10 % (37 Akzessionen) rot pigmentiertes Fruchtfleisch (Abschnitt 3.4.1.3, Tabelle 9).

Die Zusammenführung der Daten aus dem PCR-Screening des *MYB10* Promotors (Kap. 3.4.1.1) und zur Fruchtfleischfarbe (Kap. 3.4.1.3) ergaben eine deutliche Korrelation zwischen dem Vorkommen von rot pigmentiertem Fruchtfleisch und dem *MYB10 (R6)* Promotorallel (Abschnitt 3.4.1.4, Tabelle 10). Die gleiche Erkenntnis ging aus analogen Prüfungen von 100 Akzessionen aus zwei Kollektionen (Espley et al, 2009) und von einer Vielzahl von Akzessionen aus vier Sammlungen (Van Nocker et al, 2011) hervor. Innerhalb der *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden konnte das *MYB10 (R6)* Allel für insgesamt 40 Akzessionen detektiert werden. Unter diesen 40 Akzessionen befanden sich alle 37 Akzessionen, die rot pigmentiertes Fruchtfleisch aufwiesen (Tabelle 10). Für diese 37 Akzessionen konnte somit das *MYB10 (R6)* Allel als Ursache für die rot pigmentierte Fruchtfleischfarbe belegt werden (Espley et al, 2009). Diese Genotypen sind demzufolge dem genetischen Typ 1 für Rotfleischigkeit beim Apfel zuzuordnen (Volz et al, 2006; Volz et al, 2009). Da in der *Malus* Sammlung alle rotfleischigen Akzessionen stets das *MYB10 (R6)* Allel aufwiesen, konnte unter den 357 analysierten Akzessionen kein genetischer Typ 2 für Rotfleischigkeit beim Apfel gefunden werden (Volz et al, 2006; Volz et al, 2009). Des Weiteren wurde ebenfalls kein neuer Typ von Rotfleischigkeit beim Apfel in der *Malus* Sammlung entdeckt. Wie bereits durch anderen Studien belegt, bestätigen die Ergebnisse eine stärkere Verbreitung des Typ 1 im Vergleich zum Typ 2 für Rotfleischigkeit beim Apfel (Espley et al, 2009; Van Nocker et al, 2011). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass der Typ 2 für Rotfleischigkeit beim Apfel durch das Gen *MdMYB110a* gesteuert wird, welches auf LG 17 lokalisiert ist und ein Paralog von *MYB10* darstellt (Chagné et al, 2013, Umemura et al, 2013).

Unter den analysierten Akzessionen der *Malus* Sammlung wurden drei Akzessionen identifiziert (MAL0346; MAL0738 und MAL0793), die das *MYB10 (R6)* Allel besaßen aber kein rot pigmentiertes Fruchtfleisch ausbildeten (Tabelle 10, Abbildung 30). Die Sequenzierung der amplifizierten *MYB10 (R6)* Allele dieser Akzessionen ergab keinen Unterschied bzw. einen Basenaustausch im Vergleich zur publizierten Sequenz von 'Niedzwetzkyana' (Abschnitt 3.4.1.4). Eine Mutation im autoregulatorischen Abschnitt des *MYB10* Promotors konnte somit als mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp ausgeschlossen werden. Des Weiteren könnte bei diesen Akzessionen eine Mutation im genkodierenden Bereich des *MYB10* Gens vorliegen oder Gene der nachfolgenden Anthocyanbiosynthese durch eine Mutation inaktiviert sein. Die

Akzession MAL0793 zeigte eine gewebspezifische Anthocyanbildung (Abbildung 30), wodurch die Mutation eines nachgeschalteten Gens der Anthocyanbiosynthese wahrscheinlich ist. Die Akzession MAL0793 wies eine starke rote Pigmentierung der Laubblätter, der Fruchtschale und der Testa auf, allesamt typische Merkmale von Genotypen mit *MYB10 (R6)* Allel (Volz et al, 2006; Volz et al, 2009). Die anderen Fruchtgewebe der Akzession MAL0793 zeigten jedoch keine rote Pigmentierung (Abbildung 30). Die Akzessionen MAL0346 und MAL0738 besaßen ebenfalls rot pigmentierte junge Blätter (Daten nicht gezeigt) und die Akzession MAL0346 zeigte zusätzlich eine rotgefärbte Testa (Abbildung 30). Im Gegensatz zur Akzession MAL0793 entsprach die Pigmentierung der Blüte von den Akzessionen MAL0346 und MAL0738 eher nicht dem Phänotyp von Akzessionen mit *MYB10 (R6)* Allel (Abschnitt 3.4.1.4). Vergleichbare Untersuchungen fanden ebenfalls sechs Akzessionen mit *MYB10 (R6)* Allel, die kein rot pigmentiertes Fruchtfleisch ausbildeten (Van Nocker et al, 2011). Van Nocker und Mitarbeiter (2011) vermuteten, dass die Aktivität des *MYB10 (R6)* Allels stark durch den Genotyp beeinflusst wird. Sie schlossen allerdings Mutationen im *MYB10* Gen selbst oder auch von vorgeschalteten bzw. nachgeschalteten Faktoren oder Genen als Auslöser für diese Phänotypen nicht aus. Um die Ursache für solche Phänotypen zu identifizieren, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

In früheren Arbeiten wurde die Entstehung des *MYB10 (R6)* Allels als sehr alt eingeschätzt (Espley et al. 2009). Diese Annahme beruhte auf der Tatsache, dass das *MYB10 (R6)* Allel in Genotypen verschiedenster Apfelspezies detektiert werden konnte (Espley et al, 2009). Van Nocker und Mitarbeiter (2011) haben sich dieser Hypothese angeschlossen und vermuteten 'Niedzwetzkyana' als den Ursprung des *MYB10 (R6)* Allels. 'Niedzwetzkyana' ist der Primärart *M. sieversii* zugeordnet, die ursprünglich in Zentralasien beheimatet war (Van Nocker et al, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde der geografische Ursprung der Apfelarten betrachtet, die das *MYB10 (R6)* Allel zeigten (Tabelle 10). Das *MYB10 (R6)* Allel konnte für die Primärarten *M. hupehensis*, *M. sieversii* f. *niedzwetzkyana* und *M. coronaria* sowie für die Arthybriden *M. ×adstringens*, *M. ×domestica*, *M. ×moerlandsii*, *M. ×purpurea*, *M. ×soulardii* und *M. ×zumi* nachgewiesen werden. Die Bestätigung des *MYB10 (R6)* Allels in drei Primärarten und sechs

Arthybriden steht mit der Hypothese durch Espley et al (2009) im Einklang, die das *MYB10 (R6)* Allel als sehr alt einschätzten. Die Primärarten *M. hupehensis* und *M. sieversii* f. *niedzwetzkyana* stammten aus Asien (Tabelle 10). Überraschenderweise konnte das *MYB10 (R6)* Allel für eine der neun untersuchten Akzessionen von *M. coronaria* nachgewiesen werden, einer Primärart, die ursprünglich aus Nordamerika stammte (Tabelle 10). Bisher konnte das *MYB10 (R6)* Allel noch nie für amerikanische Apfelarten belegt werden (Espley et al, 2009; Van Nocker et al, 2011). Bei der betreffenden *M. coronaria* Akzession (MAL0346) handelte es sich um eine der drei Akzessionen, die das *MYB10 (R6)* Allel aufwiesen aber kein rot pigmentiertes Fruchtfleisch entwickelten. Um eine Fehlklassifizierung dieser Akzession auszuschließen, wurde ein phylogenetischer Baum betrachtet. Dieser Baum wurde auf Basis von elf SSR Markern konstruiert und beinhaltete die 357 untersuchten Akzessionen der *Malus* Sammlung (Ali, 2011). Die Akzession MAL0346 clusterte mit allen anderen *M. coronaria* Akzessionen eng beieinander, welche die acht *M. coronaria* Akzessionen aus dieser Arbeit umfassten (Daten nicht gezeigt). Eine Hauptkomponentenanalyse für die *Malus* Sammlung auf Basis von morphologischen Daten sprach ebenfalls für eine enge Verwandtschaft zwischen MAL0346 und anderen *M. coronaria* Akzessionen (Höfer et al, 2014). Aufzeichnungen zeigten, dass die Akzession MAL0346 mit dem Vermerk 'Red Tip' in die *Malus* Sammlung der Obstgenbank Dresden eingegangen war. In der Literatur wird 'Red Tip' als Selektion aus einer Kreuzung zwischen *M. coronaria* cv. 'Elk River' × *M. pumila* var. *niedzwetzkyana* beschrieben, die durch Niels E. Hansen ausgeführt wurde (Jefferson, 1970). Aus diesem Grund wurde 'Niedzwetzkyana' als Donor für das *MYB10 (R6)* Allel in der *M. coronaria* Akzession MAL0346 vermutet.

Das Vorkommen des *MYB10 (R6)* Allels in den Arthybriden *M. xadstringens*, *M. xdomestica*, *M. xmoerlandsii* und *M. xpurpurea* (Tabelle 10) wurde bereits durch Espley und Mitarbeiter (2009) sowie Van Nocker und Mitarbeiter (2011) beschrieben und bestätigte die vorliegenden Ergebnisse. Eine einzelne *MYB10 (R6)* beinhaltende Akzession von der Arthybride *M. xsoulardii* (Tabelle 10) wird in der *Malus* Sammlung mit dem Vermerk 'Red Flesh' geführt (Daten nicht gezeigt). Laut Jefferson (1970) ist 'Red Flesh' eine Selektion aus einer Kreuzung zwischen *M. coronaria* cv. 'Elk River' × *M. pumila* var. *niedzwetzkyana*, die 1928 durchgeführt wurde. Auch hier wurde 'Niedzwetzkyana' als Donor des

MYB10 (R6) Allels vermutet. Zu der *MYB10 (R6)* beinhaltenden Akzession von der Arthybride *M. xzumi* (Tabelle 10), die in der *Malus* Sammlung mit dem Vermerk var. *calocarpa* 'Wild Red' geführt wird (Daten nicht gezeigt), konnten keine zusätzlichen Informationen gefunden werden. Unabhängig davon wiesen alle sechs Arthybriden, für die das *MYB10 (R6)* Allel belegt werden konnte, mindestens ein Elter mit einem asiatischen Ursprung auf (Tabelle 10). Entsprechend dieser Befunde und in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Espley et al, 2009; Van Nocker et al, 2011) wurde die Entstehung des *MYB10 (R6)* Allels als ein einzelnes Ereignis eingestuft, was in Bezug zur Historie des Apfels vor langer Zeit in den Wildapfelwäldern von Asien stattgefunden hat.

Das cisgenetische Konzept setzt die Abwesenheit von artfremden Sequenzen im Endprodukt voraus (Schouten et al, 2006a; Schouten et al, 2006b). Beim klonal vermehrten Apfel wurde dieses Ziel bisher über die Anwendung von induzierbaren Rekombinasesystemen realisiert (Vanblaere et al, 2011; Krens et al, 2015; Kost et al, 2015; Kap. 3.2). Dadurch können nach der Übertragung des GOI alle artfremden Selektionsmarker entfernt werden. Eine mögliche Alternative wäre die Verwendung eines arteigenen Selektionsmarkers (Kap. 1.6.2). Ein potentieller morphologischer Marker ist das apfeleigene *MYB10* Gen in der R6 Allelvariante. Das *MYB10 (R6)* Allel bewirkt eine erhöhte Anthocyanbildung in verschiedenen Geweben des Apfels, was sich phänotypisch in der roten Pigmentierung dieser Gewebe äußert (Espley et al, 2009). Bei der Anwendung von *MYB10 (R6)* als Selektionsmarker sollte eine erfolgreiche Transformation durch rote Pigmentierung des betreffenden Regenerats sichtbar werden (Kortstee et al, 2011).

Im zweiten Teil des Kap. 3.4 wurde das Potenzial von *MYB10 (R6)* als apfeleigener morphologischer Selektionsmarker für die Transformation getestet. Dafür wurden zwei verschiedene transgene *MYB10* Linienarten der Apfelsorte 'Pinova' einem Regenerationsversuch unterzogen (Abschnitt 3.4.2). Der Regenerationsversuch entsprach dem standardmäßigen Regenerationsprozess, wie er bei der Transformation von Apfel am JKI Dresden-Pillnitz vorgenommen wird. Die eine transgene Linienart war mit *MYB10* als Cisgen in der *MYB10 (R6)* Allelvariante ausgestattet (Linienbezeichnung: Endog*MYB10_(R6)*, Abbildung 31). Zum Vergleich wurde der Regenerationsversuch ebenfalls mit einer anderen transgenen Linienart der Sorte 'Pinova' durchgeführt, in der *MYB10* cDNA unter

Kontrolle des *CaMV* 35S Promotors vorlag (Linienbezeichnung: 35S::*MYB10*_cDNA), Abbildung 31). Die Verwendung der transgenen Linien im Regenerationsversuch sollte das positive Transformationsereignis widerspiegeln und ermöglichte die Abschätzung von *MYB10* (*R6*) als morphologischen Selektionsmarker. Beide Linienarten bewirkten eine erhöhte Anthocyanbildung der Sorte 'Pinova' in *in vitro* Kultur unter Standardanzuchtbedingungen (Abbildung 31, Abschnitt 3.4.2.1). Im Vergleich zu den 35S::*MYB10*_cDNA Linien, die eine deutliche rote Pigmentierung aller Gewebe zeigten, war bei den Endog*MYB10*_*(R6)* Linien die erhöhte Anthocyanbildung auf die Sprossachse und die Leitgewebe der Blätter beschränkt (Abbildung 31). Der beobachtete Phänotyp der Endog*MYB10*_*(R6)* Linien der Sorte 'Pinova' stand im Widerspruch zu den Arbeiten von Espley et al (2009), Kortstee et al (2011) und Krens et al (2015). Bei diesen Arbeiten wurde zum einen *MYB10* unter Kontrolle des *MYB10* (*R6*) Promotors in die Apfelsorte 'Royal Gala' transformiert (Espley et al, 2009) bzw. das *MYB10* Gen als Cisgen in der *MYB10* (*R6*) Allelvariante, mit vergleichbaren Promotor- und ähnlichen Terminatorlängen wie im Vektor p9-Dao1-FLPi-Ms*MYB10* (Abbildung 1 D), für die Transformation der Apfelsorten 'Gala', 'Mitchgla' ('Gala' Mutante), 'Junami' und 'Wellant' verwendet (Kortstee et al, 2011; Krens et al, 2015). Für alle fünf Sorten bewirkte der Gentransfer meist eine rote Pigmentierung sämtlicher Gewebe. Auch der Phänotyp der 35S::*MYB10*_cDNA 'Pinova' Linien (Abbildung 31) zeigte eine schwächere Rotpigmentierung im Vergleich zu 'Royal Gala'-Pflanzen, die ebenfalls mit *MYB10* cDNA unter Kontrolle des *CaMV* 35S Promotors ausgestattet wurden (Espley et al, 2007; Espley et al, 2009; Espley et al, 2013).

Im Zuge des Regenerationsprozesses war eine deutliche rote Pigmentierung der Endog*MYB10*_*(R6)* Linien erst im Stadium des erneuten Sprosslängenwachstum sichtbar (Abschnitt 3.4.2.2; Abbildung 32). Eine Ausnahme stellte der Zeitpunkt 1 d nach dem Transfer der Explantate vom Dunkeln in den Langtag dar; zu diesem Zeitpunkt war das Kallusgewebe an den Explantaten der Endog*MYB10*_*(R6)* Linien kurzzeitig leicht rot pigmentiert. Im Vergleich dazu zeigten die 35S::*MYB10*_cDNA Linien im Prozess der Regeneration stets rot pigmentierte Areale. Unter den Regenerationsbedingungen, wie sie nach einer Transformation am JKI Dresden-Pillnitz standardmäßig angewendet werden, war das apfeleigene *MYB10* Gen als Cisgen in der *MYB10* (*R6*) Allelvariante als morphologischer Selektionsmarker für die Sorte 'Pinova' nur beschränkt

verwendbar. Bei anderen Apfelsorten scheint das *MYB10* Gen in der *MYB10 (R6)* Allelvariante als Cisgen eine deutlich stärkere Rotpigmentierung zu bewirken (Kortstee et al, 2011; Krens et al, 2015). Möglicherweise liegt in der Sorte 'Pinova' eine eingeschränkte Anthocyanbildung vor, die weder durch das *MYB10 (R6)* Allel noch durch *MYB10* cDNA unter Kontrolle des *CaMV 35S* Promotors vollständig behoben werden kann. Aus diesem Grund sollten ähnliche Experimente für weitere Apfelsorten durchgeführt und verschiedene Lichtbedingungen im Zuge des Regenerationsprozesses getestet werden.

Literaturverzeichnis

- Ali M (2011) Genotypic and phenotypic evaluation of the wild apple collection of the JKI. PhD, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Allan AC, Hellens RP, Laing WA (2008) MYB transcription factors that colour our fruit. Trends in Plant Science 13:99-102 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.012>
- Aoyama T, Chua N-H (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. The Plant Journal 11:605-612 doi:10.1046/j.1365-313X.1997.11030605.x
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T (2007) Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. Plant & cell physiology 48:958-970 doi:10.1093/pcp/pcm066
- Bao W, Jurka J (2010) DNA transposons from the apple genome. Rebase Reports 10 (10):1461-1514
- Barbieri M et al. (2003) Progress of map-based cloning of the Vf-resistance gene and functional verification: Preliminary results from expression studies in transformed apple. Hortscience 38:329-331
- Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. The Plant journal : for cell and molecular biology 39:366-380 doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x
- Baumgartner IO, Patocchi A, Frey JE, Peil A, Kellerhals M (2015) Breeding Elite Lines of Apple Carrying Pyramided Homozygous Resistance Genes Against Apple Scab and Resistance Against Powdery Mildew and Fire Blight. Plant Mol Biol Rep 33:1573-1583 doi:10.1007/s11105-015-0858-x
- Belfanti E et al. (2004) The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. P Natl Acad Sci USA 101:886-890 doi:DOI 10.1073/pnas.0304808101
- Benaouf G, Parisi L (1997) Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains from *Malus floribunda* 821: comparison with race 6 on apple clones. IOBC/WPRS Bulletin 20:8-11
- Benaouf G, Parisi L (2000) Genetics of Host-Pathogen Relationships Between *Venturia inaequalis* Races 6 and 7 and *Malus* Species. Phytopathology 90:236-242 doi:10.1094/phyto.2000.90.3.236
- Bonny S (2003) Why Are Most Europeans Opposed to GMOs? Factors Explaining Rejection in France and Europe. The Electronic Journal of Biotechnology 6:50-71
- Boone DM (1971) Genetics of *Venturia Inaequalis*. Annual Review of Phytopathology 9:297-318 doi:doi:10.1146/annurev.py.09.090171.001501

- Borejsza-Wysocka E, Norelli J, Aldwinckle H, Malnoy M (2010) Stable expression and phenotypic impact of attacin E transgene in orchard grown apple trees over a 12 year period. *BMC Biotechnol* 10:1-9 doi:10.1186/1472-6750-10-41
- Bowen JK, Mesarich CH, Bus VGM, Beresford RM, Plummer KM, Templeton MD (2011) *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Mol Plant Pathol* 12:105-122 doi:DOI 10.1111/j.1364-3703.2010.00656.x
- Brown S, K., Maloney K, E. (2003) The Genetic Improvement of Apple. *The Compact Fruit Tree* 36:38-42
- Bus VGM, Rikkerink EHA, Caffier V, Durel CE, Plummer KM (2011) Revision of Nomenclature of the Differential Host-Pathogen Interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annu Rev Phytopathol* 49:391-413 doi:DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095339
- BVL (2012) Position statement of the ZKBS on new plant breeding techniques. http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/02_Allgemeine_Stellungnahmen_englisch/05_plants/zkbs_plants_new_plant_breeding_techniques.pdf?__blob=publicationFile&v=2 Accessed 18 June 2014
- Caddick MX et al. (1998) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat Biotechnol* 16:177-180 doi:10.1038/nbt0298-177
- Caffier V et al. (2014) Erosion of quantitative host resistance in the apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infection, Genetics and Evolution* 27:481-489 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.003
- Chagne D et al. (2013) An ancient duplication of apple MYB transcription factors is responsible for novel red fruit-flesh phenotypes. *Plant physiology* 161:225-239 doi:10.1104/pp.112.206771
- Chagné D et al. (2007) Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC genomics* 8:212 doi:10.1186/1471-2164-8-212
- Chevalier M, Lespinasse Y, Renaudin S (1991) A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* 40:249-256 doi:10.1111/j.1365-3059.1991.tb02374.x
- Cornille A et al. (2012) New Insight into the History of Domesticated Apple: Secondary Contribution of the European Wild Apple to the Genome of Cultivated Varieties. *PLoS Genet* 8:e1002703 doi:10.1371/journal.pgen.1002703
- Crandall CS (1926) Apple Breeding at the University of Illinois. *Ill Agric Exp Stn Bull* 275:341-600
- Cuellar W et al. (2006) Self-excision of the antibiotic resistance gene nptII using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato *Plant Mol Biol* 62:71-82 doi:10.1007/s11103-006-9004-3
- Czarnecka E, Gurley WB, Nagao RT, Mosquera LA, Key JL (1985) DNA sequence and transcript mapping of a soybean gene encoding a small heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:3726-3730
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833

- De Bondt A, Eggermont K, Penninckx I, Goderis I, Broekaert WF (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 doi:10.1007/bf00232992
- De Vetten N et al. (2003) A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Biotechnol* 21:439-442 doi:10.1038/nbt801
- EFSA (2010) Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA J* 8:1–111 doi:10.2903/j.efsa.2010.1879
- EFSA (2011) Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA J* 9:1-37 doi:10.2903/j.efsa.2011.2150
- EFSA (2012) Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA J* 10:1-33 doi:10.2903/j.efsa.2012.2561
- Erikson O, Hertzberg M, Nasholm T (2004) A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nat Biotechnol* 22:455-458
- Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC (2007) Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal* 49:414-427 doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02964.x
- Espley RV et al. (2009) Multiple Repeats of a Promoter Segment Causes Transcription Factor Autoregulation in Red Apples. *The Plant Cell* 21:168-183 doi:10.1105/tpc.108.059329
- Espley RV et al. (2013) Analysis of genetically modified red-fleshed apples reveals effects on growth and consumer attributes. *Plant biotechnology journal* 11:408-419 doi:10.1111/pbi.12017
- FAO (2015) FAOSTATS 2012 <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Accessed 20 December 2015
- Fischer M (2004) Die Zukunft: krankheitsresistente Apfelsorten. *Erwerbs-Obstbau* 46:1-6 doi:10.1007/s10341-004-0017-2
- Fischer M, Fischer C (2008) The Pillnitz Re-Series of Apple Cultivars – Do They Hold Promise? – 80 Years of Professional German Fruit Breeding. *Erwerbs-Obstbau* 50:63-67 doi:10.1007/s10341-008-0061-4
- Flachowsky H, Hanke MV, Peil A, Strauss SH, Fladung M (2009) A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding* 128:217-226 doi:10.1111/j.1439-0523.2008.01591.x
- Flachowsky H, Le Roux PM, Peil A, Patocchi A, Richter K, Hanke MV (2011) Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus x domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *The New phytologist* 192:364-377 doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03813.x

- Flachowsky H, Riedel M, Reim S, 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* 11:26-40
- Fladung M, Nowitzki O, Kumar S, Hönicka H (2005) The sitespecific recombination systems Cre-lox and FLP-FRT are functionally active in poplar. *Forest Genetics* 12(2):121-130
- Flor HH (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296 doi:doi:10.1146/annurev.py.09.090171.001423
- Forsline PL, Aldwinckle HS, Dickson EE, Luby JJ, Hokanson SC (2003) Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples of Central Asia. In: Janick J (ed) *Wild Apple and Fruit Trees of Central Asia.*, vol 29. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp 1-62
- Galli P, Patocchi A, Brogginini GA, Gessler C (2010a) The Rvi15 (Vr2) apple scab resistance locus contains three TIR-NBS-LRR genes. *Mol Plant Microbe Interact* 23:608-617 doi:10.1094/MPMI-23-5-0608
- Galli P, Brogginini G, Kellerhals M, Gessler C, Patocchi A (2010b) High-resolution genetic map of the Rvi15 (Vr2) apple scab resistance locus. *Mol Breeding* 26:561-572 doi:10.1007/s11032-010-9391-7
- Gaskell G et al. (2010) Europeans and biotechnology in 2010 – Winds of change? Directorate-General for Research Science in Society and Food, Agriculture & Fisheries, & Biotechnolog EUR 24537 EN:1-172
- Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfranceschi L (2006) *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Crit Rev Plant Sci* 25:473-503 doi:Doi 10.1080/07352680601015975
- Gessler C, Patocchi A (2007) Recombinant DNA technology in apple. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 107:113-132 doi:10.1007/10_2007_053
- Gessler C, Pertot I (2012) Vf scab resistance of *Malus*. *Trees-Struct Funct* 26:95-108 doi:DOI 10.1007/s00468-011-0618-y
- Gladieux P, Zhang X-G, Afoufa-Bastien D, Valdebenito Sanhueza R-M, Sbaghi M, Le Cam B (2008) On the Origin and Spread of the Scab Disease of Apple: Out of Central Asia. *PLoS ONE* 3:e1455 doi:10.1371/journal.pone.0001455
- Hanke MV, Flachowsky H (2010) Fruit Crops. In: Kempken F, Jung CH (eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 64. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 307-348
- Hättasch C, Flachowsky H, Hanke MV (2009) Evaluation of an alternative D-amino acid/DAAO selection system for transformation in apple (*Malus X domestica* Borkh.). *J Hortic Sci Biotech*:188-194
- Herzog K (2012) Etablierung einer Flp/FRT-vermittelten Rekombination des Selektionsmarkers und Untersuchungen zur RNAi-induzierten Resistenzhöhung gegenüber pilzlichen Schaderregern beim Apfel (*Malus x domestica* BORKH.). PhD, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Herzog K, Flachowsky H, Deising HB, Hanke MV (2012) Heat-shock-mediated elimination of the nptII marker gene in transgenic apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Gene* 498:41-49 doi:DOI 10.1016/j.gene.2012.01.074
- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V (2011) Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/erq442
- Höfer M, Eldin Ali MAMS, Sellmann J, Peil A (2014) Phenotypic evaluation and characterization of a collection of *Malus* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 61:943-964 doi:10.1007/s10722-014-0088-3
- Höfer M, Meister A (2010) Genome Size Variation in *Malus* Species. *Journal of Botany* 2010 doi:10.1155/2010/480873
- Hoff T, Schnorr KM, Mundy J (2001) A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 45:41-49
- Plant Research International (2015) Info sheet pmf vectors. http://www.wageningenur.nl/upload_mm/3/1/c/c97bd3cc-a5e6-4545-a1f4-a31460c80dac_pmf-infosheetpdf. Accessed 14 December 2015
- Jacobsen E, Schouten HJ (2007) Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in biotechnology* 25:219-223 doi:10.1016/j.tibtech.2007.03.008
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, Bevan M (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant cell reports* 7:658-661 doi:10.1007/bf00272054
- Janick J, Cummins JN, Brown SK, Hemmat M (1996) APPLES. In: Janick J, Moore JN (eds) *Fruit Breeding*, vol I. John Wiley & Sons, Inc., pp 1-77
- Jänsch M et al. (2014) A Phenotypic, Molecular and Biochemical Characterization of the First Cisgenic Scab-Resistant Apple Variety 'Gala' Plant. *Mol Biol Rep* 32:679-690 doi:10.1007/s11105-013-0682-0
- Jefferson RM (1970) History, Progeny, and Location of Crabapples of Documented Authentic Origin. In: *National Aboretum Contribution*, vol 2. Agricultural Research Service U. S. Department of Agriculture, Washington.
- Jha G, Thakur K, Thakur P (2009) The Venturia Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009:10 doi:10.1155/2009/680160
- Joshi SG, Schaart JG, Groenwold R, Jacobsen E, Schouten HJ, Krens FA (2011) Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Mol Biol* 75:579-591 doi:DOI 10.1007/s11103-011-9749-1
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and genome research* 110:462-467 doi:10.1159/000084979
- Khattari A, Nandy S, Srivastava V (2011) Heat-inducible Cre-lox system for marker excision in transgenic rice. *Journal of biosciences* 36:37-42

- Kimpe JA, Nagao RT, Goekjian V, Key JL (1990) Regulation of the Heat Shock Response in Soybean Seedlings. *Plant Physiol* 94:988-995
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* 10:236-242 doi:10.1016/j.tplants.2005.03.002
- Kortstee AJ et al. (2011) Anthocyanin production as a potential visual selection marker during plant transformation. *Transgenic research* 20:1253-1264 doi:10.1007/s11248-011-9490-1
- Kost TD, Gessler C, Jansch M, Flachowsky H, Patocchi A, Brogini GAL (2015) Development of the First Cisgenic Apple with Increased Resistance to Fire Blight. *PLoS ONE* 10:e0143980 doi:10.1371/journal.pone.0143980
- Krens FA et al. (2015) Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Frontiers in plant science* 6:286 doi:10.3389/fpls.2015.00286
- Langenfeld VT (1991) Apple trees: morphological evolution, phylogeny, geography and systematics of the genus. Zinatne, Riga
- Lee YRJ, Nagao RT, Lin CY, Key JL (1996) Induction and Regulation of Heat-Shock Gene Expression by an Amino Acid Analog in Soybean Seedlings. *Plant Physiol* 110:241-248
- Lespinasse Y, Godicheau M (1980) Obtention and Description of One Haploid Apple tree (*Malus-Pumila* Mill). *Ann Amelior Plant* 30:39-44
- Lin-Wang K et al. (2010) An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC plant biology* 10:50 doi:10.1186/1471-2229-10-50
- Luby JJ (2013) Taxonomic Classification and History. In: Ferree DC, Warrington IJ (eds) *Apples: Botany. Production and Uses*. CABI Publishing, Cambridge, MA,, pp 1-14
- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E (2011) New plant breeding techniques State-of-the-art and prospects for commercial development. JRC Scientific and Technical Reports/EUR 24760 EN
- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E (2012) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotechnol* 30:231-239
- MacHardy WE (1996) *Apple Scab: Biology Epidemiology, and Management*. The American Phytopathological Society, St. Paul
- Malnoy M, Boresza-Wysocka E, Norelli J, Flaishman M, Gidoni D, Aldwinckle H (2010) Genetic transformation of apple (*Malus x domestica*) without use of a selectable marker gene. *Tree Genet Genomes* 6:423-433 doi:10.1007/s11295-009-0260-7
- März L (2011) *Das Apfelhandbuch: Wissenswertes rund um den Apfel*. Diplomica Verlag GmbH, Hamburg
- Matsunaga E, Sugita K, Ebinuma H (2002) Asexual production of selectable marker-free transgenic woody plants, vegetatively propagated species. *Mol Breeding* 10:95-106 doi:10.1023/a:1020308216747

- Maximova S, Dandekar A, Gultinan M (1998) Investigation of Agrobacterium-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Mol Biol* 37:549-559 doi:10.1023/A:1006041313209
- McQuillan FJ, Culham JR, Yovanovich MM (1984) PROPERTIES OF DRY AIR AT ONE ATMOSPHERE. *Microelectronics Heat Transfer Laboratory Report UW/MHTL 8406 G-01*
- Meyers BC, Kaushik S, Nandety RS (2005) Evolving disease resistance genes. *Current opinion in plant biology* 8:129-134 doi:10.1016/j.pbi.2005.01.002
- Padidam M (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Current opinion in plant biology* 6:169-177
- Parisi L, Lespinasse Y, Guillaumes J, Kruger J (1993) A New Race of *Venturia-inaequalis* Virulent to Apples with Resistance Due to the Vf Gene. *Phytopathology* 83:533-537 doi:Doi 10.1094/Phyto-83-533
- Park YN, Morschhauser J (2005) Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* 4:1328-1342 doi:10.1128/ec.4.8.1328-1342.2005
- Patocchi A, Gianfranceschi L, Gessler C (1999) Towards the map-based cloning of Vf: fine and physical mapping of the Vf Region. *Theor Appl Genet* 99:1012-1017 doi:10.1007/s001220051409
- Patocchi A, Vinatzer BA, Gianfranceschi L, Tartarini S, Zhang HB, Sansavini S, Gessler C (1999) Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene Vf. *Molecular & general genetics* : MGG 262:884-891
- Patocchi A, Bigler B, Koller B, Kellerhals M, Gessler C (2004) Vr2: a new apple scab resistance gene. *Theor Appl Genet* 109:1087-1092 doi:10.1007/s00122-004-1723-8
- Patocchi A, Frei A, Frey JE, Kellerhals M (2009) Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: *Venturia inaequalis* virulence surveys and standardization of molecular marker alleles associated with resistance genes. *Mol Breeding* 24:337-347 doi:10.1007/s11032-009-9295-6
- Peil A, Kellerhals M, Höfer M, Flachowsky H (2011) Apple breeding—from the origin to genetic engineering. *Fruit Veg Cereal Sci Biotechnol* 5:118-138
- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Fischer M (2009) Breeding Apple (*Malus xDomestica* Borkh). In: Jain SM, Priyadarshan PM (eds) *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*. Springer Science + Business Media, New York, pp 33-81
- Potter D et al. (2007) Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* 266:5-43 doi:10.1007/s00606-007-0539-9
- Puite KJ, 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 doi:http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(96)04448-2

- Vaillancourt LJ, Hartman JR (2000) Apple scab. The American Phytopathological Society. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/AppleScab.aspx>. Accessed 14 2015
- Ramires MLV, Nieto de Castro CA, Nagasaka Y, Nagashima A, Assael MJ, Wakeham WA (1995) Standard Reference Data for the Thermal Conductivity of Water. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 24:1377-1381 doi:doi:<http://dx.doi.org/10.1063/1.555963>
- Rehder A (1949) *Bibliography of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America*. Arnold Arboretum of Harvard University, Jamaica Plain
- Roberts AL, Crute IR (1994) Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*. *Norw J Agric Sci Suppl* 17:403-406
- Roßberg D (2009) NEPTUN 2007 – Obstbau Berichte JKI 147:1-71
- Roßberg D (2013) Erhebungen zur Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in der Praxis im Jahr 2011. *Journal für Kulturpflanzen* 65:141-151
- Salter MG, Paine JA, Riddell KV, Jepson I, Greenland AJ, Caddick MX, Tomsett AB (1998) Characterisation of the ethanol-inducible *alc* gene expression system for transgenic plants. *The Plant Journal* 16:127-132 doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00281.x
- Saghai-Marooif MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:8014-8018
- Sansavini S, Donati F, Costa F, Tartarini S (2004) Advances in apple breeding for enhanced fruit quality and resistance to biotic stresses: new varieties for the European market. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 12
- Saß A (2013) Molekularbiologische Charakterisierung von Schorfresistenzgenen an *Malus* spp. Masterarbeit, Technische Universität Dresden; Internationales Hochschulinstitut Zittau
- Schaart JG, Krens FA, Pelgrom KTB, Mendes O, Rouwendal GJA (2004) Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnol J* 2:233-240 doi:DOI 10.1111/j.1467-7652.2004.00067.x
- Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E (2006) Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nat Biotechnol* 24:753-753 doi:Doi 10.1038/Nbt0706-753
- Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen K, Jacobsen E (2006) Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants – International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *Embo Rep* 7:750-753 doi:DOI 10.1038/sj.embor.7400769
- Schouten HJ, Brinkhuis J, van der Burgh A, Schaart JG, Groenwold R, Broggini GAL, Gessler C (2014) Cloning and functional characterization of the *Rvi15* (Vr2) gene for apple scab resistance. *Tree Genet Genomes* 10:251-260 doi:DOI 10.1007/s11295-013-0678-9

- Sekido K, Hayashi Y, Yamada K, Shiratake K, Matsumoto S, Maejima T, Komatsu H (2010) Efficient Breeding System for Red-fleshed Apple Based on Linkage with S(3)-RNase Allele in 'Pink Pearl'. *Hortscience* 45:534-537
- Silfverberg-Dilworth E et al. (2005) Identification of functional apple scab resistance gene promoters. *Theor Appl Genet* 110:1119-1126 doi:DOI 10.1007/s00122-005-1940-9
- Smit AFA, Hubley R, Green P (1996-2010) RepeatMasker Open-3.0. <http://www.repeatmasker.org>
- Stotz HU, Mitrousis GK, de Wit PJGM, Fitt BDL (2014) Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* doi:10.1016/j.tplants.2014.04.009
- Szankowski I et al. (2009) Highly scab-resistant transgenic apple lines achieved by introgression of HcrVf2 controlled by different native promoter lengths. *Tree Genet Genomes* 5:349-358 doi:10.1007/s11295-008-0191-8
- Takos AM, Jaffe FW, Jacob SR, Bogs J, Robinson SP, Walker AR (2006) Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiol* 142:1216-1232 doi:10.1104/pp.106.088104
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30:2725-2729 doi:10.1093/molbev/mst197
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54:733-749 doi:10.1111/j.1365-3113X.2008.03447.x
- Umemura H, Otagaki S, Wada M, Kondo S, Matsumoto S (2013) Expression and functional analysis of a novel MYB gene, MdMYB110a_JP, responsible for red flesh, not skin color in apple fruit. *Planta* 238:65-76 doi:10.1007/s00425-013-1875-3
- UPOV (2005) Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability (Apple-fruit Varieties). TG/14/9 Intl Union Protection New Varieties Plants, Geneve
- Van Nocker S et al. (2011) Genetic diversity of red-fleshed apples (*Malus*). *Euphytica* 185:281-293 doi:10.1007/s10681-011-0579-7
- Van Nocker S, Gardiner SE (2014) Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Horticulture Research* 1:14022 doi:10.1038/hortres.2014.22
- Vanblaere T, Szankowski I, Schaart J, Schouten H, Flachowsky H, Broggin GAL, Gessler C (2011) The development of a cisgenic apple plant. *J Biotechnol* 154:304-311 doi:DOI 10.1016/j.jbiotec.2011.05.013
- Vanblaere T, Flachowsky H, Gessler C, Broggin GAL (2014) Molecular characterization of cisgenic lines of apple 'Gala' carrying the Rvi6 scab resistance gene. *Plant Biotechnol J* 12:2-9 doi:Doi 10.1111/Pbi.12110

- Vinatzer AB, Zhang H-B, Sansavini S (1998) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of apple. *Theor Appl Genet* 97:1183-1190 doi:10.1007/s001220051008
- Vinatzer BA, Patocchi A, Gianfranceschi L, Tartarini S, Zhang HB, Gessler C, Sansavini S (2001) Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 14:508-515 doi:10.1094/mpmi.2001.14.4.508
- Volz RK et al. Breeding for red flesh in apple. In: Mercer CF (ed) 13th Australasian Plant Breeding Conference, Christchurch, New Zealand, 2006.
- Volz RK, Oraguzie NC, Whitworth CJ, How N, Chagné D, Carlisle CM, Gardiner SE (2009) Red flesh breeding in apple: progress and challenges. *Acta Horticulturae* 814:337-342
- Wang Y, Yau YY, Perkins-Balding D, Thomson JG (2011) Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant cell reports* 30:267-285 doi:10.1007/s00299-010-0938-1
- Weigl K, Wenzel S, Flachowsky H, Peil A, Hanke MV (2015) Integration of BpMADS4 on various linkage groups improves the utilization of the rapid cycle breeding system in apple. *Plant Biotechnol J* 13:246-258 doi:10.1111/pbi.12267
- Wenzel S, Flachowsky H, Hanke M-V (2013) The Fast-track breeding approach can be improved by heat-induced expression of the FLOWERING LOCUS T genes from poplar (*Populus trichocarpa*) in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 115:127-137 doi:10.1007/s11240-013-0346-7
- Würdig J, Flachowsky H, Hanke MV (2013) Studies on heat shock induction and transgene expression in order to optimize the Flp/FRT recombinase system in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Cell Tiss Org* 115:457-467 doi:DOI 10.1007/s11240-013-0376-1
- Würdig J, Flachowsky H, Höfer M, Peil A, Eldin Ali MAMS, Hanke M-V (2014) Phenotypic and genetic analysis of the German *Malus* Germplasm Collection in terms of type 1 and type 2 red-fleshed apples. *Gene* 544:198-207 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.045
- Würdig J, Flachowsky H, Saß A, Peil A, Hanke M-V (2015) Improving resistance of different apple cultivars using the Rvi6 scab resistance gene in a cisgenic approach based on the Flp/FRT recombinase system. *Mol Breeding* 35:1-18 doi:10.1007/s11032-015-0291-8
- Xu M, Song J, Cheng Z, Jiang J, Korban SS (2001) A bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Malus floribunda* 821 and contig construction for positional cloning of the apple scab resistance gene Vf. *Genome* 44:1104-1113
- Xu M, Korban SS (2002) AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the Vf locus in the apple genome. *Plant Mol Biol* 50:803-818
- Xu M, Korban SS (2002) A cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* 162:1995-2006

- Yao JL, Tomes S, Gleave AP (2013) Transformation of apple (*Malus x domestica*) using mutants of apple acetolactate synthase as a selectable marker and analysis of the T-DNA integration sites. *Plant cell reports* 32:703-714 doi:10.1007/s00299-013-1404-7
- Zhang W, Subbarao S, Addae P, Shen A, Armstrong C, Peschke V, Gilbertson L (2003) Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theor Appl Genet* 107:1157-1168 doi:10.1007/s00122-003-1368-z

Danksagung

Als erstes möchte ich Frau Prof. Prof. Dr. Magda-Viola Hanke danken, die mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation am Julius Kühn-Institut, in der Arbeitsgruppe Biotechnologie, durchzuführen. Ich bedanke mich für ihre stets allumfassende Unterstützung, die hilfreichen Vorschläge, die anregenden Diskussionen und für ihre kontinuierliche Förderung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Henryk Flachowsky, der mit seinen Ideen in die experimentelle Planung besonders involviert war.

Sowohl Frau Prof. Prof. Dr. Magda-Viola Hanke als auch Herr Dr. Henryk Flachowsky beantworteten mir meine Fragen stets geduldig und standen mir mit fachlichen Ratschlägen und thematischen Anregungen immer zur Seite.

Im Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller bedanken, die die Betreuung meiner Arbeit an der TU-Dresden übernahm.

Bei Uta Hille, Ines Hiller, Herr Dr. Andreas Peil, Kerstin Neumann und Frau Dr. Höfer möchte ich mich für die Einweisung in die Methoden und für die technische Unterstützung bei meinen Experimenten ganz besonders bedanken.

Des Weiteren danke ich ebenfalls Andrea Saß, Rosi Müller, Teresa Strunz, Arvid Lauber, Sabine Bartsch, Marlene Tronicke, Ines Polster, Volkmar Vogt und Frank Urbitsch für Ihre tatkräftige Unterstützung bei meinen Untersuchungen.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Julius Kühn-Institutes Dresden-Pillnitz, die mich am Institut willkommen hießen und die mir bei allen Fragen und Lagen immer behilflich waren.

An dieser Stelle will ich meiner Familie und meinen Freunden sowie den anderen Doktoranden Julius Kühn-Institutes Dresden-Pillnitz danken, die mir über den gesamten Zeitraum beistanden und mich motivierten.

Bei meinem Freund Ingo bedanke ich mich für seine Geduld, Bestärkung und Einfühlsamkeit, mit der er mir fortwährend Rückhalt gab.

Anhang

Tabelle A 1 Angaben zu den Bezugsfirmen.

Firma (Kurzform)	Firmenname	Firmensitz, Land
Adobe Systems	Adobe Systems Inc.	San José, CA, US
AIR LIQUIDE	AIR LiQUIDE Deutschland GmbH	Düsseldorf, DE
Amersham Bioscience	Amersham Bioscience, Teil von GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, DE
Analytik Jena	Analytik Jena AG	Jena, DE
Bartscher	Bartscher GmbH	Salzkotten, DE
Beckman Coulter	Beckman Coulter Inc.	Brea, CA, US
Biodeal	Biodeal Handelsvertretung Edelmann e.K.	Markkleeberg, DE
Biogazelle	Biogazelle NV	Zwijnaarde, BE
Biometra	Biometra GmbH	Göttingen, DE
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories Inc.	Hercules, CA, US
Biosan	Biosan	Riga, LV
Biozym	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, DE
Brill	Gebr. Brill Substrate GmbH & Co. KG	Georgsdorf, DE
Carl Roth	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
Carl Zeiss	Carl Zeiss Mikroskopy GmbH	Jena, DE
Clontech	Clontech Laboratories Inc.	Mountain View, CA, US
Corning	Corning Incorporated	Corning, NY, US
DNA Cloning Service	DNA Cloning Service e.K.	Hamburg, DE
DROL	DROL Laborgeräte & Zubehör Dr. Otto Lorey	Reichertshausen, DE
DUCHEFA	DUCHEFA BIOCHEMIE B. V.	Haarlem, NL
E-C Apparatus	E-C Apparatus Corporation	St. Petersburg, FL, US
Eppendorf	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Ecolab	Ecolab Deutschland GmbH	Monheim am Rhein, DE
Eurofins Genomics	Eurofins Genomics	Ebersberg, DE
Fermentas	Fermentas GmbH (2010 durch Thermo Fisher Scientific übernommen)	St. Leon-Roth, DE
FLUKA	FLUKA (1989 durch Sigma-Aldrich übernommen)	Buchs, CH
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, DE
Grant Instruments	Grant Instruments (Cambridge) Ltd	Shepreth, GB
Greiner Bio One	Greiner Bio One International GmbH	Kremsmünster, AT
Hanna Instruments	Hanna Instruments GmbH	Vöhringen, DE
Hettich	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, DE
Ibis Biosciences	Ibis Biosciences	Carlsbad, CA, US
Iris Biotech	Iris Biotech GmbH	Marktredwitz, DE

Firma (Kurzform)	Firmenname	Firmensitz, Land
Kendro	Kendro Laboratory Products GmbH	Hanau, DE
Kisker	Kisker Biotech GmbH & Co. KG	Steinfurt, DE
Liebherr	Liebherr-International AG	Bulle, CH
MACHEREY-NAGEL	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG	Düren, DE
Merck	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Microsoft	Microsoft Corporation	Redmond, WA, US
NEB	New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main, DE
neoLab	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	Heidelberg DE
OTTO NORDWALD	OTTO NORDWALD GmbH	Hamburg, DE
Panasonic	Panasonic Corporation	Kadoma, JP
Percival Scientific	Percival Scientific Inc.	Perry, US
QIAGEN	QIAGEN GmbH	Hilden, DE
Reitsport Springer	Reitsport Springer	Lemgo, DE
RETSCH	RETSCH GmbH	Haan, DE
Riebesam	Riebesam GmbH & Co. KG	Genthin, DE
Roche Diagnostics	Roche Diagnostics International AG	Rotkreuz, CH
SNAIGĖ	SNAIGĖ	Alytus, LT
Sartorius	Sartorius AG	Göttingen, DE
SAS	SAS Institute Inc.	Cary, NC, US
Scientific Industries	Scientific Industries Inc.	Bohemia NY, US
Serva	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, DE
SG	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH	Barsbüttel, DE
Siemens	Siemens AG	München, DE
Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Sigma Laborzentrifugen	Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz, DE
Stratec	Stratec Molecular GmbH	Berlin, DE
Systec	Systec GmbH	Linden, DE
Thermo Fisher Scientific	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, US
Tuttnauer	Tuttnauer Europe B. V.	Breda, NL
VEB MLW	VEB MLW	Leipzig, DE
VWR	VWR International	Radnor, PA, US
Whatman	Whatman Int. Ltd.	Maidstone, GB

Tabelle A 2 Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Bezugsfirma
Acetosyringon (3,5 Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon)	Sigma-Aldrich
6-Benzylaminopurin (BAP)	Serva
Betain-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Cetyltrimethylammonium-bromid (CTAB)	Sigma-Aldrich
Chloroform (=Trichlormethan)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
D-Isoleucin (D-Ile)	Iris Biotech
D-Serin (D-Ser)	Sigma-Aldrich
Essigsäure, 99 % (Eisessig)	Carl Roth
Ethanol (EtOH), 99,8 %	VWR
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA- Na_2)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Carl Roth
Formamid (deionisiert)	Carl Roth
Indol-3-Buttersäure (IBA)	Serva
Isoamylalkohol (=Isopentylalkohol)	Carl Roth
Kaliumferricyanid	Sigma-Aldrich
Kanamycin-Monosulfat (Km)	DUCHEFA
Kresolrot	Sigma-Aldrich
Maleinsäure	Carl Roth
N-Lauroylsarkosin ($\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_3$)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumbisulfit	FLUKA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
2-Propanol (=Isopropanol)	Carl Roth
Rifampicin (Rif)	Sigma-Aldrich
Stickstoff (flüssig)	AIR LIQUIDE
Saccharose	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl), 37 %	Carl Roth
Sorbitol	DUCHEFA
Spectinomycin-Dihydrochlorid-Pentahydrat (Sp)	DUCHEFA
Tartrazin	Sigma-Aldrich
Thidiazuron (TDZ)	Sigma-Aldrich
Timentin (Ticarcillin 2NA:Clavulanate K (15:1) (v:v))	DUCHEFA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich

Chemikalie	Bezugsfirma
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth
Tween 20	Sigma-Aldrich
X-Gluc	Fermentas

Tabelle A 3 Verwendete technische Geräte.

Gerätetyp	Gerätename	Hersteller
Autoklav	Systec VX-150	Systec
	Systec 3870 ELV	Tuttnauer
Binokular	Stemi 1000	Carl Zeiss
Brutschrank/Inkubator	INCU-line IL-10	VWR
	Kelvitron® t	Kendro
	Heraeus® HERAcool	Kendro
	Heraeus® B15	Thermo Fisher Scientific
Feinwaage	BP 110 S	Sartorius
Geldokumentationssystem	ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer	Typ Midi	neoLab
	Typ Maxi	neoLab
Heissluftsterilidator	Heraeus® Heissluftsterilidator	Kendro
Kamera	Lumix DMC-TZ10	Panasonic
Kapillarsequenziergerät	GenomeLab™ GeXP	Beckman Coulter
Klimaschrank	CU-36L4	Percival Scientific
Kühlschrank (6 °C)	glass line	Liebherr
	comfort	Liebherr
	SC-50	Bartscher
Kühlzentrifugen	Microcentrifuge 5415R	Eppendorf
	Sigma 3-18K	Sigma Laborzentrifugen
Laborwaage	LC 620 P	Sartorius
Magnetrührer	RH3	VEB MLW
Mikrowelle	HF 12M240	Siemens
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments
Pipetten	Reference®	Eppendorf
	Research® plus	Eppendorf
Plattenzentrifuge	Universal 32R	Hettich
Real-Time PCR Detektionssystem	iCycler iQ™	Bio-Rad
Reinigungsautomat	26-03	Riebesam
Reinstwasseranlage	LaboStar	SG
Schwingmühle	Retsch® MM 300	RETSCH
Shaker	DOS-20S	neoLab
Spannungsquellen	Powerpac 200	Bio-Rad
	EC105	E-C Apparatus
Spektrophotometer	NanoDrop2000c	Thermo Fisher Scientific
Sterilwerkbank	Heraeus® HERAguard	Kendro
	Heraeus® HERAsafe	Kendro
Thermomixer	TS-100	Biosan
	Thermomixer compact	Eppendorf

Gerätetyp	Gerätename	Hersteller
Thermocycler	iCycler	Bio-Rad
	FlecCycler	Analytik Jena
	MyCycler	Bio-Rad
	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad
	Arktik Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific
Tiefkühlschrank (–20 °C)	Active Soft	SNAIGÉ
Tiefkühlschrank (–80 °C)	Heraeus® HERAFreeze HFU 686 Top	Thermo Fisher Scientific
	Heraeus® HERAFreeze HFU Basic	Kendro
Tischzentrifugen	Heraeus® Biofuge pico	Kendro
	Mikro 120	Hettich
Tischzentrifugen (mini)	Rotilabo®	Carl Roth
Verdampfer	GeneVac SF50	Biometra
Vortexer	Grant-bio	Grant Instruments
	Vortex Genie 2®	Scientific Industries
Wärmeschrank/ Trockenschrank	Heraeus UT 6420	Kendro
Wasserbad	GLS400	Grant Instruments
	GFL 1083	GFL

Tabelle A 4 Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth
Chromatographiepapier (P81)	Whatman
dNTPs	Thermo Fisher Scientific
Einmalküvetten (2,5 ml)	Carl Roth
Einweghandschuhe aus Nitril/Latex	VWR
DB Falcon™ Röhrchen 14 ml (REF 352059)	VWR
Fermacidal D2 (Flächendesinfektion)	DROL
Filterpapier, Ø 90 mm	MACHEREY-NAGEL
PCR 8-Softstrips, farblos (0,2 ml)	Biozym
PCR-Reaktionsgefäße, einzeln (0,2 ml)	Kisker
Pipettenspitzen	Carl Roth
Reaktionsgefäße (1,5 ml/2 ml)	Carl Roth
Reaktionsgefäße safe-lock (1,5 ml/2 ml)	Eppendorf
RNaseZap®	Thermo Fisher Scientific
Rotilabo®-Spritzenfilter (Sterilfilter)	Carl Roth
Rotilabo® Zentrifugenröhrchen 15 ml	Carl Roth
Skinman® clear (Handdesinfektion)	Ecolab
Zellkulturschalen Ø 94 x 16 mm	Greiner Bio One
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Corning

Tabelle A 5 Genutzte Primerpaare für PCR-Reaktionen und verwendete PCR-Bedingungen.

Primerpaar	Methode	Verwendung	Zielgen/-locus	Atemp [°C]	Zyklen [n]	Zeit	DNA-Pol	Produktgröße [bp]
NptII F1/ NptII R1	PCR	Nachweis <i>nptII</i>	<i>nptII</i>	65	30	1'	D	304 (gDNA)
	RT-PCR	Expression <i>nptII</i>	<i>nptII</i>	65	30	1'	D	304 (cDNA)
NptII F/ NptII R	PCR	Sondenherstellung	<i>nptII</i>	58	33	1'	DIG Probe	780 (gDNA)
dao1 F1/ dao1 R1	PCR	Nachweis <i>dao1</i>	<i>dao1</i>	64	35	1'	D	1295 (gDNA)
	RT-PCR	Expression <i>dao1</i>	<i>dao1</i>	64	35	1'	D	1106 (cDNA) ^a
Flp F/ Flp R	PCR	Nachweis <i>flp</i>	<i>flp</i>	63	30	1'	D	774 (gDNA)
	RT-PCR	Expression <i>flp</i>	<i>flp</i>	63	30	1'	D	585 (cDNA) ^a
EF1 α F/ EF1 α R	PCR	Nachweis <i>EF1-α</i>	<i>EF1α</i>	56	30	1'	D	800/900 (gDNA)
	RT-PCR	Expression <i>EF1-α</i>	<i>EF1α</i>	56	30	1'	D	700 (cDNA)
Vfa2-F/ Vfa2-Rev	PCR	Nachweis <i>Rvi6</i>	<i>Rvi6</i>	60	35	1'	D	533 (gDNA)
	RT-PCR	Expression <i>Rvi6</i>	<i>Rvi6</i>	60	35	1'	D	533 (cDNA)
	qRT-PCR	Expression <i>Rvi6</i>	<i>Rvi6</i>	61,4	40	1'	Max SYBR	533 (cDNA)
RT1for/ RT2rev	PCR	Nachweis <i>Rvi6</i>	<i>Rvi6</i>	57	35	1'	D	856 (gDNA)
	PCR	Nachweis <i>gusA</i>	<i>gusA</i>	65	35	1'	D	444 (gDNA)
GUSRTF/ GUSRTR	RT-PCR	Expression <i>gusA</i>	<i>gusA</i>	65	35	1'	D	444 (cDNA)
	PCR	Nachweis Rekombination	-	65	10+25 ^b	5'	Long	4410 (vor Rek) 1176 (nach Rek)
1/ 3	PCR	Nachweis von <i>bblInt</i> (LB)	-	57	35	30"	P	632
7/ 3	PCR	Genau T-DNAInt (LB)	-	59	35	30"	P	535
2/ 3	PCR	Genau T-DNAInt (LB)	-	59	35	1'	D	328
4/ 5A	PCR	Genau T-DNAInt (RB)	-	61	35	1'	D	918
5/ 8	PCR	Genau T-DNAInt (RB)	-	61	35	1'	D	260

Primerpaar	Methode	Verwendung	Zielgen/-locus	Atemp [°C]	Zyklen [n]	Ezeit	DNA-Pol	Produktgröße [bp]
5/6	PCR	Nachweis von bbInt (RB)	-	59	35	1'	D	425
LG14_M879_LB/ Vf2Prom_rev	PCR	ROrtA (Linie iM879-68)	-	64	35	1'	P	524
LG9_M946_LB/ Vf2rev	PCR	ROrtA (Linie iM946-193)	-	58	35	3'	P	2597
Vr2A_GMAL_TAG-361_fw/ Vr2A_GMAL_TAG+30_rev	PCR	Nachweis Genotyp GMAL 2473 nahe Vr2-A Stoppcodon	Rvi15 Locus (GMAL 2473)	57	35	30"	D	384 (gDNA)
Vr2A_GMAL_TAG-111_fw/ Vr2A_GMAL_TAG+30_rev	PCR	Nachweis Genotyp GMAL 2473 nahe Vr2-A Stoppcodon	Rvi15 Locus (GMAL 2473)	58	35	30"	D	136 (gDNA)
Vr2A_GMAL_TAG-19_fw/ Vr2A_GMAL_TAG+803_rev	PCR	Nachweis Genotyp GMAL 2473 nahe Vr2-A Stoppcodon	Rvi15 Locus (GMAL 2473)	61	35	30"	D	656 (gDNA)
Vr2B_GMAL_TAG-323_fw/ Vr2B_GMAL_full_rev	PCR	Nachweis Genotyp GMAL 2473 nahe Vr2-B Stoppcodon	Rvi15 Locus (GMAL 2473)	70	35	30"	D	331 (gDNA)
Vr2C_GMAL_full_fw/ Vr2C_GMAL_full_rev	PCR	Nachweis des Vr2-C Gens aus GMAL 2473	Rvi15 Locus (GMAL 2473)	68	10+25 ^b	6'	Long	5598 (gDNA)
RE162_F/ MYB10_R_rev	PCR	MYB10 Promotor Analyse	-	60	35	1'	D	variabel
RE162_F_BMF/ MYB10_R_rev	FA (PCR)	MYB10 Promotor Analyse	-	60	28	30"	Type-it	variabel
MdActin-qForward/ MdActin-qReverse	qRT-PCR	Expression MdActin	MdActin	63,3	40	1'	Max SYBR	82 (cDNA)
RNAPOLII_MB1F/ RNAPOLII_MB2R	qRT-PCR	Expression RNAPoII	RNAPoII	61	40	1'	Max SYBR	286 (cDNA)
Rubisco_MB1F/ Rubisco_MB2R	qRT-PCR	Expression RuBisCO	RuBisCO	61	40	1'	Max SYBR	299 (cDNA)

^aKünstliches Intron; ^bElongationszeit wird mit jedem Zyklus verlängert; Atemp – Annealingtemperatur; bbInt – Plasmid backbone Integration; bp – Basenpaare; cDNA – copy-DNA; D – DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific); DIG Probe – PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics); DNA-Pol – DNA-Polymerase; Ezeit – Elongationszeit; FA – Fragmentgrößenanalyse; gDNA – genomische DNA; Genau T-DNAInt –

Genauigkeit der T-DNA-Integration; GMAL – GMAL 2473, Quelle der *Rvi15* (*Vr2*) Schorfresistenz; GW – *Genome Walking*; LB – *left border* Region; Long – Long PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific); Max SYBR – Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific); P – Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB); PCR – Polymerasekettenreaktion; qRT-PCR: Quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion; RB – *right border* Region; Rek – Rekombination; RekOrtA – Rekombinationsort Analyse; RT-PCR – Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion; Sonde – Sondenherstellung für Southern Blot; T-DNA – Transfer-DNA; Type-it – Type-it® Microsatellite PCR Kit (QIAGEN).

Tabelle A 6 Oligonukleotidsequenz und Informationen zu den verwendeten Primern.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Informationen
1	accaacatgcaagctccacc	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: backbone; dicht bei LB (17829-17848) ^a
2	tffcagctgtctacattcacg	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei LB (18111-18132) ^a
3	ttggaccactgtcggtaga	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei LB (290-271) ^a
35SF	cccactatccttcgcaagaccc	bindet im CaMV 35S Promotor
4	ggtatggttcgctcggacttac	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei RB (9394-9416) ^a
5A	cccctgtagaacacaaaatcttatccc	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei RB (10312-10337) ^a
5B	gggataagatttggttctacagggg	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei RB (10337-10312) ^a
6	cgaacggataaaccttttcacgcc	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: backbone; dicht bei RB (10736-10713) ^a
7	cgggaaatctacatgatcagc	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei LB (17904-17925) ^a
8	ccggccccgaaataatgtgaata	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei RB (10594-10571) ^a
AP1 (Clontech)	gtaatacgactcactatagggc	nested Primer, BP am GW Adaptor
AP2 (Clontech)	actatagggcacgcggtggt	nested Primer, BP am GW Adaptor
dao1F1	atgcactcagaagcgcgctcg	bindet im <i>dao1</i> Gen
dao1R1	ctacaacttcgactccccgcgcc	bindet im <i>dao1</i> Gen
EF1αF	attggtcattggycaagt	bindet im <i>EF1-α</i> Gen
EF1αR	ccaatctgtavacatcctg	bindet im <i>EF1-α</i> Gen
FlpF	catcggaagaagcagataaaggg	bindet im <i>flp</i> Gen
FlpR	tcaactccgttaggcccttcac	bindet im <i>flp</i> Gen
GUSR	cagcagcagtttcatcaatca	bindet im <i>gusA</i> Gen
GUSRTF	gttctgcagcctcacaccgataacc	bindet im <i>gusA</i> Gen
GUSRTR	tcaccgaagttcatgcccagtcag	bindet im <i>gusA</i> Gen
LG9_M946_LB	gcataactgaactacaaccataaaggg	BP im Apfelgenom auf LG 9, nahe des T-DNA IntOrt der Linie M946

Primer	Sequenz 5' → 3'	Informationen
LG14_M879_LB	ttftgagcgagccccgtggaat	BP im Apfelgenom auf LG 14, nahe des T-DNA IntOrt der Linie M879
M13 uni (-21)	tgtaaacgacggccagt	Sequenzierprimer für pCR™2.1-TOPO® Plasmid
M13 rev (-29)	caggaacagctatgac	Sequenzierprimer für pCR™2.1-TOPO® Plasmid
MdActin-qForward	gtgaggctattccaaccatc	bindet im <i>MdActin</i> Gen
MdActin-qReverse	ggaacacaaattggccaagtat	bindet im <i>MdActin</i> Gen
MYB10_R_rev	tccacagaagcaaacactgac	bindet im <i>MYB10</i> Promotor
NptIIF1	ggttctcggccgcttgggtg	bindet im <i>nptII</i> Gen
NptIIR1	cggcaggagcaagtgagatgac	bindet im <i>nptII</i> Gen
NptIIF	acaagatgattgcacgcagg	bindet im <i>nptII</i> Gen
NptIIR	aactcgtcaagaaggcogatag	bindet im <i>nptII</i> Gen
RE162_F	atgttgcgtgcagaaatgtag	bindet im <i>MYB10</i> Promotor
RE162_F_BMN-5	atgttgcgtgcagaaatgtag (5': BMN-5)	bindet im <i>MYB10</i> Promotor
RNAPOLII_MB1F	atatgccaccccgctctact	bindet im <i>RNAPoIII</i> Gen
RNAPOLII_MB2R	cacgftccattgtccaaaact	bindet im <i>RNAPoIII</i> Gen
RT1for	caatgccttacgtggtgaaa	bindet im <i>Rvi6</i> Gen
RT2rev	cagggattccagccaatcta	bindet im <i>Rvi6</i> Gen
Rubisco_MB1F	gcttgccaagagcaagagaat	bindet im <i>RuBisCO</i> Gen
Rubisco_MB2R	ctccctcccccaattataacc	bindet im <i>RuBisCO</i> Gen
Vfa2-F	tctcaatctcagtagtttctatgga	bindet im <i>Rvi6</i> Gen
Vfa2-Rev	cccccgagattaagagttg	bindet im <i>Rvi6</i> Gen
Vf2_LB_GSP1_R	gtctgttgcccagtcatagcccgaatag	BP an p9-Dao-FLPI-HcrVf2: T-DNA; dicht bei LB (570-542) ^a
Vf2_LB_GSP2_R	acctgcgtgcaatccatcttcttcaatc	BP an p9-Dao-FLPI-HcrVf2: T-DNA; dicht bei LB (517-490) ^a
Vf2_LB_GSP3_R	aagttctcatctaaagcccccaattgga	BP an p9-Dao-FLPI-HcrVf2: T-DNA; dicht bei LB (18160-18133) ^a

Primer	Sequenz 5' → 3'	Informationen
Vf2_LB_Tail1_rev	gctttcgccataataacgacggatcg	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei LB (18077-18051) ^a
Vf2Prom_rev	catatcaaccgaggtgcaaaaacac	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA im <i>Rvi6</i> Promotor (5990-5967) ^a
Vf2rev	ggttctctacctcagattggatc	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA im <i>Rvi6</i> Gen (7657-7634) ^a
Vf2_RB_GSP1_F	tggggatgtgtgctctggacttacagag	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei RB (9391-9420) ^a
Vf2_RB_GSP2_F	gggataagattgtgtctctacagggtaagt	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei RB (10312-10337) ^a
Vf2_RB_GSP3_F	atcagattgtctgttcccccttcggttta	BP an p9-Dao-FLPi-HcrVf2: T-DNA; dicht bei RB (10601-10630) ^a
Vr2A_GMAL_TAG-111_fw	gtaatctaaatttctcatccacacatcg	SNP spezifischer Primer*, bindet nahe <i>Vr2-A</i> Terminator (TAG +635 bp)
Vr2A_GMAL_TAG+30_rev	cttctagtaaattgtacggtaagaat	SNP spezifischer Primer*, bindet nahe <i>Vr2-A</i> Terminator (TAG +771 bp)
Vr2A_GMAL_TAG-361_fw	caattccctgtttggattcataacc	SNP spezifischer Primer*, bindet nahe <i>Vr2-A</i> Terminator (TAG +387 bp)
Vr2A_GMAL_TAG-19_fw	gccctaacatgttagcagaatattgaac	SNP spezifischer Primer*, bindet nahe <i>Vr2-A</i> Terminator (TAG +727 bp)
Vr2A_GMAL_TAG+803_rev	ctgcaatggagttctactgtgact	SNP spezifischer Primer*, bindet nahe <i>Vr2-A</i> Terminator (TAG +1382bp)
Vr2B_GMAL_TGA-323_fw	ggatgtttagaattcatagaactgcagggatagt	SNP spezifischer Primer*, bindet im <i>Vr2-B</i> Gen nahe Stoppcodon (TAG -323bp)
Vr2B_full_rev	gggttaattcattgtaccctagaaccctccc	bindet im <i>Vr2-B</i> Gen des Genotyps GMAL 2473, Stoppcodon überspannend
Vr2C_full_fw	ctctcttcttgcaccttctcctgccccggtg	bindet im <i>Vr2-C</i> Promotor des Genotyps GMAL 2473, nahe Startcodon (ATG -150 bp)
Vr2C_full_rev	agatgccaaaaactgattctaccttagtgctg	bindet im <i>Vr2-C</i> Gen des Genotyps GMAL 2473, Stoppcodon überspannend

^aFür die Primerbindedeitionen siehe detaillierte Vektorkarte p9-Dao1-FLPi-HcrVf2 (Abbildung A 1); * – SNP Primer zum Nachweis des *Vr2-A* bzw. *Vr2-B* Locus des Genotyps GMAL 2473; bp – Basenpaare; BP – Bindeposition; BMN-5 – Farbstoff zur Primermarkierung; GW – *Genome Walking*; IntOrt – Integrationsort; LB – *left border* Region; LG – Kopplungsgruppe (*linkage group*); RB – *right border* Region; T-DNA – Transfer-DNA.

Tabelle A 7 Für das *Genome Walking* verwendete Primerpaare.

T-DNA Border	Primerpaar 1. PCR	Primerpaar 2. PCR	Verwendung
LB	Vf2_LB_GSP1_R/AP1	Vf2_LB_GSP2_R/AP2	T-DNA-Integration sortbestimmung
LB	Vf2_LB_GSP2_R/AP1	Vf2_LB_GSP3_R/AP2	T-DNA-Integration sortbestimmung
LB	Vf2_LB_GSP3_R/AP1	Vf2_LB_Tail1_rev/AP2	T-DNA-Integration sortbestimmung
RB	Vf2_RB_GSP1_F/AP1	Vf2_RB_GSP2_F/AP2	T-DNA-Integration sortbestimmung
RB	Vf2_RB_GSP2_F/AP1	Vf2_RB_GSP3_F/AP2	T-DNA-Integration sortbestimmung

LB – left border Region; RB – right border Region.

Tabelle A 8 Sporendichte und Keimungsrate der *V. inaequalis* Inokula, die für die Evaluierung der Schorfresistenz in den Jahren 2012, 2013 und 2014 verwendet wurden.

<i>V. inaequalis</i> Isolat	Rasse	Jahr der Evaluierung	Sporendichte [Konidien/ml]	Keimungsrate ^a [%]
104	1	2012	3.23×10^5	46
D42a	6	2012	3.70×10^5	19
104	1	2013	2.81×10^5	38
D42a	6	2013	2.60×10^5	15
104	1	2014	1.99×10^5	19

^aKeimungsrate der Konidien wurde nach 24 h Inkubation des Inokulums bei Raumtemperatur bestimmt.

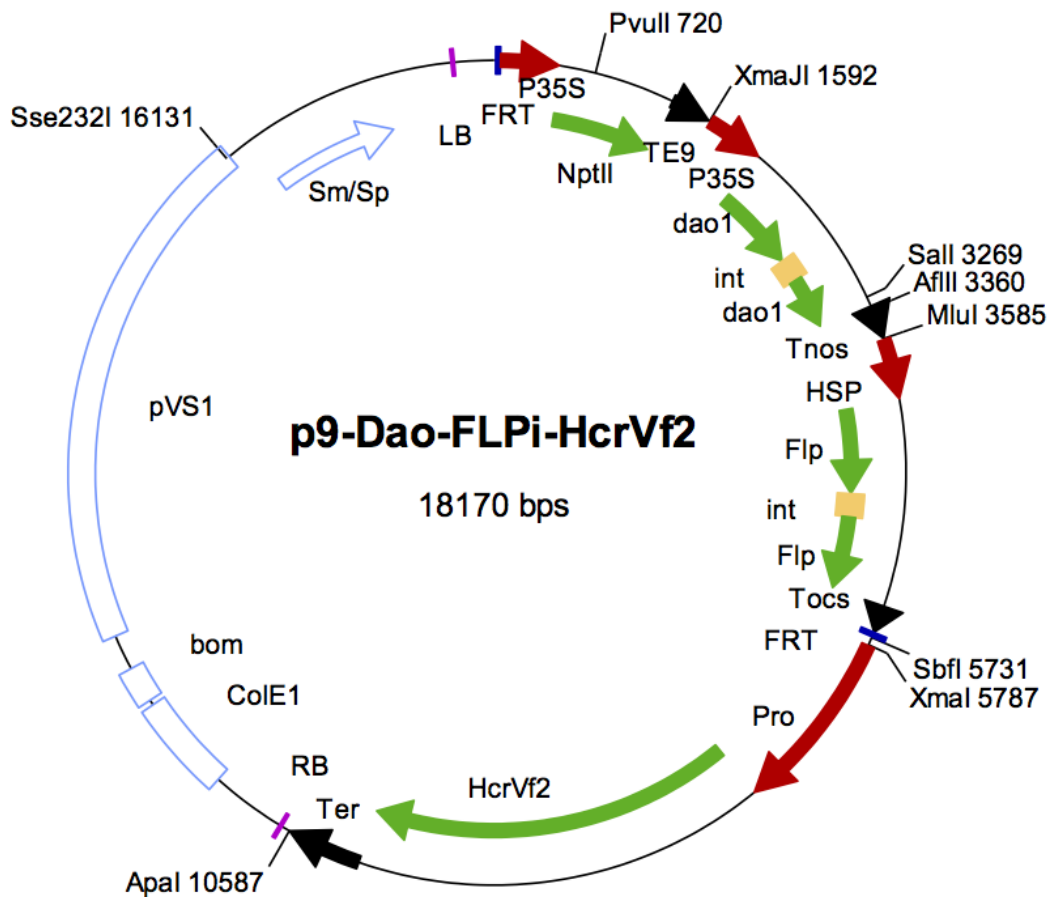


Abbildung A 1 Detaillierte Karte des Vektors p9-Dao-FLPi-HcrVf2. Zirkuläre DNA, 18170 bp.

Start	Ende	Name / Beschreibung	vermerkt als
46	13	FRT	Region
47	462	P35S /35S Promotor	Region
479	1282	NptII / Kanamycin-Resistenz	Gen
1297	1587	TE9 / Terminator Rbcs-E9	Region
1598	2015	P35S / 35S Promotor	Region
2027	2711	dao1 / D-Aminosäureoxidase Exon1	Gen
2712	2900	int / StLS1	Gen
2901	3322	dao1 / D-Aminosäureoxidase Exon2	Gen
3339	3584	Tnos / NOS Terminator	Region
3591	4021	HSP / Promotor	Region
4029	4711	Flp	Gen
4712	4900	int / Stls1	Gen
4901	5487	Flp	Gen
5496	5691	Tocs / Terminator	Region
5725	5692	FRT	Region
5793	7107	Pro	Region
7108	10050	HcrVf2	Gen
10051	10586	Ter	Region
10645	10668	RB / right border	Region
11203	11900	ColE1 / ColE1 ORI	Region
11937	12196	bom	Region
12449	16154	pVS1 / origin	Region
16338	17348	Sm/Sp / Strep/Spec-Resistenz	Gen
17869	17892	LB / left border	Region


```

1  tctagcgagc tcgaagtcc tattctctag aaagtatagg aacttcacat ggtggagcac
    <<.....FRT.....<<
    >>...P35S.....>
61  gacactctcg tctactccaa gaatatcaaa gatacagtct cagaagacca gagggctatt
    >.....P35S.....>
121 gagacttttc aacaaagggc aatatcggga aacctcctcg gattccattg ccagctatc
    >.....P35S.....>
181 tgtcacttca tcgaaaggac agtagaaaag gaagatggct tctacaaatg ccatcattgc
    >.....P35S.....>
241 gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctaccgaca gtggtcccaa agatggacc
    >.....P35S.....>
301 ccaccacga ggaacatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccactcttc aaagcaagt
    >.....P35S.....>
361 gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa
    >.....P35S.....>
421 gacccttct ctatataagg aagttcattt catttggaga ggacctcgag tggccaccat
    >.....P35S.....>>
    NptII >>
481 gggagcttgg attgaacaag atggattgca cgcaggttct cggccgctt ggtggagag
    >.....NptII.....>
541 gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgcc cgtgttccg
    >.....NptII.....>
601 gctgtcagcg cagggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa
    >.....NptII.....>
661 tgaactgcag gacgaggcag cgcgctatc gtggctggcc acgacggcg ttccttgcc
    >.....NptII.....>
721 agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aaggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc
    >.....NptII.....>
781 ggggcaggat ctctgtcat ctaccttgc tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga
    >.....NptII.....>
841 tgcaatgccc cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa
    >.....NptII.....>
901 acatcgcac gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct
    >.....NptII.....>
961 ggacgaagag catcaggggc tcgcccagc cgaactgttc gccaggtca aggcgcgat
    >.....NptII.....>
1021 gcccgaaggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgcca atatcatggt
    >.....NptII.....>
1081 ggaaaatggc cgctttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta
    >.....NptII.....>
1141 tcaggacata gcgttgcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga
    >.....NptII.....>
1201 ccgcttctc gtgctttacg gatacgcgc tcccattcg cagcgcacg ccttctatcg
    >.....NptII.....>
1261 ccttcttgac gagttctct gactccggac gttcagat tatggcattg ggaaaactgt
    >.....NptII.....>>
    >>.....TE9.....>
1321 ttttcttgta ccattgttg tgcttgaat ttactgtgt tttattcgg ttttcgctat
    >.....TE9.....>

```

1381 cgaactgtga aatggaaatg gatggagaag agttaatgaa tgatatggtc cttttgttca
 >.....TE9.....>

1441 ttctcaaatt aatattattt gttttttctc ttatttggtg tgtgttgaat ttgaaattat
 >.....TE9.....>

1501 aagagatatg caaacatttt gttttgagta aaaatgtgtc aaatcgtggc ctetaatgac
 >.....TE9.....>

1561 cgaagttaat atgaggagta aaacactgaa gcctaggta acatgggtgga gcacgacact
 >.....TE9.....>>
 >>.....P35S.....>

1621 ctctgtact ccaagaatat caaagataca gtctcagaag accagagggc tattgagact
 >.....P35S.....>

1681 tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc ctctgattcc attgcccagc tatctgtcac
 >.....P35S.....>

1741 ttcatcgaaa ggacagtaga aaaggaagat ggcttctaca aatgccatca ttgcgataaa
 >.....P35S.....>

1801 ggaaaggcta tcgttcaaga tgctctacc gacagtggtc ccaaagatgg acccccacc
 >.....P35S.....>

1861 acgaggaaca tcgtgaaaaa agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga
 >.....P35S.....>

1921 tgtgatatct cactgacgt aaggatgac gcacaatccc actatccttc gcaagacct
 >.....P35S.....>

1981 tcctctatat aaggaagttc atttcatttg gagaggacac tagtccatgc actctcagaa
 >.....P35S.....>>
 >>...daol....>

2041 gcgcgtcgtt gtctctcgat caggcgttat cggctcgagc agcgcctca tcctcgtcg
 >.....daol.....>

2101 gaagggtac agcgtgcata ttctcgcgcg cgacttgccg gaggacgtct cgagccagac
 >.....daol.....>

2161 tttcgttca ccatgggctg gcgcgaattg gacgccttc atgacgtta cagacggtc
 >.....daol.....>

2221 tcgacaagca aatgggaag aatcgacttt caagaagtgg gtcgagttgg tcccacggg
 >.....daol.....>

2281 ccatgccatg tggctcaagg ggacgaggcg gttcgcgag aacgaagacg gcttgctcg
 >.....daol.....>

2341 gcactgttac aaggacatca cgccaatta cgcctcctc ccatcttccg aatgtccacc
 >.....daol.....>

2401 tggcgtatc ggcgtaacct acgacacct ctccgtccac gcaccaaagt actgccagta
 >.....daol.....>

2461 ccttgcaaga gagctgcaga agctcggcgc gacgtttgag agacggaccg ttacgtcgt
 >.....daol.....>

2521 tgagcaggcg ttcgacggtg cggatttggg ggtcaacgct acgggacttg gcgccaagtc
 >.....daol.....>

2581 gattgcgggc atcgacgacc aagcccgga gccaatccgc ggccaaaccg tcctcgtcaa
 >.....daol.....>

2641 gtcccatgc aagcgatgca cgatggactc gtccgacccc gcttctccc cctacatcat
 >.....daol.....>

```

2701 tccccgacca ggtaagtttc tgcttctacc ttgatatat atataataat tatcattaat
>...daol...>
>>.....int.....>
2761 tagtagtaat ataataatttc aaatattttt ttcaaaataa aagaatgtag tatatagcaa
>.....int.....>
2821 ttgcttttct gtagtttata agtgtgtata ttttaattta taacttttct aatatatgac
>.....int.....>
2881 caaaatttgc tgatgtgcag gtggcgaagt catctgcggc gggacgtacg gcgtgggaga
>.....int.....>
>>.....daol.....>
2941 ctgggacttg tctgtcaacc cagagacggc ccagcggatc ctcaagcact gcttgcgct
>.....daol.....>
3001 cgaccggacc atctcgagcg acggaacgat cgaagcctc gaggtcctcc gccacaacgt
>.....daol.....>
3061 cggttgcga cctgcacgac gaggcggacc ccgctcgag gcagaacgga tctcctgcc
>.....daol.....>
3121 tctcgaccgg acaaagtcgc ccctctcgt cggcaggggc agcgcacgag cggcgaagga
>.....daol.....>
3181 gaaggaggtc acgcttgc atgcgtatgg cttctcgagt gcgggatacc agcagagttg
>.....daol.....>
3241 gggcgcggcg gaggatgctg cgcagctcgt cgacgagcg ttccagcgg accacggcgc
>.....daol.....>
3301 ggcgcgggag tcgaagttgt agagtcgta gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc
>.....daol.....>
>>.....Tnos.....>
3361 ttaagattga atcctgttgc cggcttgcg atgattatca tataatttct gttgaattac
>.....Tnos.....>
3421 gttaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggttttatg
>.....Tnos.....>
3481 attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac
>.....Tnos.....>
3541 taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag atcgacgcgt agtcagcctt
>.....Tnos.....>
>>.HSP...>
3601 ttaagagata gaatttaaaa tataatttgc gtaaaacatt attaaaaata caaatttata
>.....HSP.....>
3661 aattaagttc aactcatcct atctcactct ttaaatacga tgtttactta ttagactcat
>.....HSP.....>
3721 taataaaaaa aaaaaaatc atttgtacaa agcccacat aaaggcaatt tggcctggt
>.....HSP.....>
3781 agaccaatcc taaccaatgt ctggttaaga tggccaatc ccgaaacttc tagttgcggc
>.....HSP.....>
3841 tcgaagaagt ccagaatggt tctgaaagt tcagaaaatt ctagtittga gattttcaga
>.....HSP.....>
3901 agtacggcat gatgatgcat acaaggact ttctcgaag tactatattg ctctctaca
>.....HSP.....>
3961 tcattttaa taccatgt gtccttgaa gacacatcac agaaagaagt gaaggcatcg
>.....HSP.....>

```

```

4021  tggttgccat gccacaattt gatataattat gtaaaacacc acctaagggtg cttgttcgtc
> HSP
    >>.....Flp.....>
4081  agtttggtgga aaggtttgaa agaccttcag gtgagaaaat agcattatgt gctgctgaac
>.....Flp.....>
4141  taacctatatt atgttggatg attacacata acggaacagc aatcaagaga gccacattta
>.....Flp.....>
4201  tgagctataa tactatcata agcaattcgc tgagtttoga tattgtcaat aatcactcc
>.....Flp.....>
4261  agtttaaata caagacgcaa aaagcaacaa ttctggaagc ctcattaaag aaattgattc
>.....Flp.....>
4321  ctgcttggga atttacaatt attccttact atggacaaaa acatcaatct gatatacactg
>.....Flp.....>
4381  atattgtaag tagtttgcaa ttacagttcg aatcatcggg agaagcagat aagggaaata
>.....Flp.....>
4441  gccacagtaa aaaaatgctt aaagcacttc taagtgaggg tgaaagcatc tgggagatca
>.....Flp.....>
4501  ctgagaaaat actaaattcg ttgagtata cttcgagatt tacaaaaaca aaaactttat
>.....Flp.....>
4561  accaattcct cttcctagct actttcatca attgtggaag attcagcgat attaagaacg
>.....Flp.....>
4621  ttgatccgaa atcatttaaa ttagtccaaa ataagtatct gggagtaata atccagtgtt
>.....Flp.....>
4681  tagtgacaga gacaaagaca agcgttagca ggtaagtttc tgcttctacc ttgatatat
>.....Flp.....>>
    >>.....int.....>
4741  atataataat tadcattaat tagtagtaat ataataattc aatatatttt tcaaaaataa
>.....int.....>
4801  aagaatgtag tatatagcaa ttgcttttct gtagtttata agtgtgtata ttttaattta
>.....int.....>
4861  taacttttct aatatatgac caaaatttgt tgatgtgcag gcacatatac ttctttagcg
>.....int.....>>
    >>.....Flp.....>
4921  caaggggtag gatcgatcca cttgtatatt tggatgaatt tttgagaaat tctgaaccag
>.....Flp.....>
4981  tcctaaaacg agtaaatagg accggcaatt cttcaagcaa taacaggaa taccaattat
>.....Flp.....>
5041  taaaagataa cttagtcaga tcgtacaata aggctttgaa gaaaaatgcg ccttattcaa
>.....Flp.....>
5101  tctttgctat aaaaaatggc ccaaaatctc acattggaag acatttgatg acctcatttc
>.....Flp.....>
5161  tttcaatgaa gggcctaacg gagttgacta atgttgtggg aaattggagc gataagcgtg
>.....Flp.....>
5221  cttctgccgt ggccaggaca acgtatactc atcagataac agcaatacct gatcactact
>.....Flp.....>
5281  tcgctctagt ttctcggtac tatgcatatg atccaatatc aaaggaaatg atagcattga
>.....Flp.....>

```

5341 aggatgagac taatccaatt gaggagtggc agcatataga acagctaaag ggtagtgctg
 >.....Flp.....>

5401 aaggaagcat acgatacccc gcatggaatg ggataatata acaggaggta ctgactacc
 >.....Flp.....>

5461 tttcatccta cataaataga cgcatatgag tcagaccctg ctttaatgag atatgcgaga
 >.....Flp.....>>
 >>.....Tocs.....>

5521 cgcctatgat cgcatgatat ttgetttcaa ttctgttgty cacgttgtaa aaaacctgag
 >.....Tocs.....>

5581 catgtgtagc tcagatcctt accgcccgtt tcggttcatt ctaatgaata taccaccgt
 >.....Tocs.....>

5641 tactatcgta tttttatgaa taatattctc cgttcaattt actgattgtc cgaagttcct
 >.....Tocs.....>>
 <<.FRT..<<

5701 attctctaga aagtatagga acttccctag cctgcaggca tgcaagctga tccactagag
 <.....FRT.....<<

5761 gccatggcgg ccgcactagt ggatccccg ggctaacttt ttcacttccc ttgagttaag
 >>.....Pro.....>

5821 atctaacttt ttcactctaa cggaatgttc tgtgcagact gggggttatt acatagcatt
 >.....Pro.....>

5881 tttactcact tcaaaagatc tgtttactt tcggatcagt ttgagtgaat aaattccttg
 >.....Pro.....>

5941 tgaacttgga aatctctcaa gtctaagtgt tttgcacctc ggttgatatg aattttgtag
 >.....Pro.....>

6001 atactagaag agcaaatgat tgtaagagt agtggattaa atcatttacg tgtttgatat
 >.....Pro.....>

6061 gcctagctag ctacgagggt cttcagtctt agctacgact tgtacgaagg accgttccca
 >.....Pro.....>

6121 gttcctggtg ggggttgtaa tatgactggt cttaaagtcc ttattatctt tgagcaagaa
 >.....Pro.....>

6181 aatcaaagc ttttaattatt ctgcatgact tttcatgcat tcaccatcgg atggaatata
 >.....Pro.....>

6241 tcacagtttt tggccaaatt ttccacataa aatttaatcc tctcaacttc ctaacattat
 >.....Pro.....>

6301 caaacattca atgacagtgc gactgtctca ttcaatgaca gtctgatctg gagataaagt
 >.....Pro.....>

6361 tgacaagtat tattatacgg caacttgata atggtgctgg tgatgtatct ggattggccg
 >.....Pro.....>

6421 tgaaatggta tggaaattgt aggttgattc acattctggg atgtaatata gttggcgtgt
 >.....Pro.....>

6481 tggggctgat tgtggagatt ctgtttacac tgtaattgct tttgtaaaga gtcctatat
 >.....Pro.....>

6541 gctgcttaaa ggctggtatc gactgattca tgatctgatt actcgagaag gtccatttct
 >.....Pro.....>

6601 tgaaatagct tgcacctta ttgctggttt gacaatcatt ctgtggctaa ttgtggtgt
 >.....Pro.....>

6661 ttcaagtatc gtgttggcag ttttcgtgaa cattttaatt ggattgtatg catcagttgt
 >.....Pro.....>

```

6721 agtatatcag gtttgctaac accagactat aatcattgta atctccttgg cctttcagga
>.....Pro.....>
6781 cacattatat gtgtgaacta catgtttcctt ttgtcaaaga ttccaagtgg ggtcttaaat
>.....Pro.....>
6841 taacttgtgt ctctatagat gtggactagc tagtcctaaa tagccgctta gtttagtcca
>.....Pro.....>
6901 tcttatcatc tatgaaactt tttttccaag attccaagag tccgtccgac gactgttact
>.....Pro.....>
6961 ctcatgatg tgcaccgatt ttgaaaatgc ggtctcatgc cgtagaggat ggtttagaaa
>.....Pro.....>
7021 aggtgaggct ccctagtata tataggtagc actcctctgg attgttcatt gctcatacac
>.....Pro.....>
7081 atcacctgct tcatacactt gaactttatg gagagaacca tgagagttgt tatactacta
>.....Pro.....>>
>>.....HcrVf2.....>
7141 accaggtttc tagccattgc aaccattact ttcagtattg gtttatgcaa tggaaatccc
>.....HcrVf2.....>
7201 ggttggcctc cactttgcaa agtaagcgaa agacgagcac ttctgatggt caagcaagat
>.....HcrVf2.....>
7261 ctcaaggatc ctgtcaatcg gcttgcacg tgggttgcag aagaagattc agactgttgc
>.....HcrVf2.....>
7321 agttggacag gagttgtttg tgatcatgta accggccaca tccacgagct gcaccttaat
>.....HcrVf2.....>
7381 agttcctact ctgattggga attcaactct ttcttcggtg gtaagataaa tccttctttg
>.....HcrVf2.....>
7441 ctcaagttta agcatctcaa ctacttggac ttgagtaaca atgatttcaa tggtaacaaa
>.....HcrVf2.....>
7501 attcctagtt tctttggttc tatgacaagt ttaacacacc ttaatcttgc atactcagag
>.....HcrVf2.....>
7561 ctttatggaa taattcctca taaactagga aatctttcca gtctacgcta tctcaatctc
>.....HcrVf2.....>
7621 agtagtttct atggatccaa tctgaaggta gagaaccttc agtggatttc tggcttttct
>.....HcrVf2.....>
7681 ctgctgaaac acttggactt gagttctgta aatcttagca aagcatctga ctggttgcaa
>.....HcrVf2.....>
7741 gttacaaaaca tgctcccttc tttggtagag ttagatatgt ccgattgtga acttgatcaa
>.....HcrVf2.....>
7801 atccccccgc taccacccc aaattttact tccttggctg tccttgatct ttctagaaac
>.....HcrVf2.....>
7861 agttttaatt gttgatgcc gaggtgggtt ttcagtctta aaaatctagt ttctcttcat
>.....HcrVf2.....>
7921 ctcaagtttt gtggtttcca aagtccaatt cctagcattt cacagaatat cacatctttg
>.....HcrVf2.....>
7981 agggaaattg atttgcatt caattctatt agtcttgatc cgattcccaa attgttgttt
>.....HcrVf2.....>
8041 acccaaaaaa tccttgaatt gactctagaa tccaatcaac ttacaggaca acttccaaga
>.....HcrVf2.....>

```

8101 agtattcaga atatgactgg tcttacaact cttaatctcg gggggaacga attcaattct
>.....HcrVf2.....>

8161 accatacctg aatggttgta tagcttgaac aatctcgagt ccttacttct ttttgccaat
>.....HcrVf2.....>

8221 gccttacgtg gtgaaatatac gagttccatt gaaaccta aaagttaag gcactttgat
>.....HcrVf2.....>

8281 cttcaagta attcaatatac aggtcccatt ccaatgtcac taggaaatct atcaagctta
>.....HcrVf2.....>

8341 gaaaaattgt acatatctga aatcatttt aatggaactt tcacagaagt tattggtcaa
>.....HcrVf2.....>

8401 ctcaaaatgc taacggattt ggatatact tataattcgt tagaagggtg ggtgtcggaa
>.....HcrVf2.....>

8461 atttctttta gcaaccttat aaagtgaag catttcggtg caaaaggaaa ctggtttact
>.....HcrVf2.....>

8521 ctgaaaacta gtcgagattg ggctcctct tttcaacttg aaattttgaa gctggattcc
>.....HcrVf2.....>

8581 tggcatttgg ggctgaatg gccaatgtgg ttgcggacac aaacgcaatt aaaagaacta
>.....HcrVf2.....>

8641 agcttgtctg gtacaggaat ttcaagtact attccaactt ggttttgaa cttactttc
>.....HcrVf2.....>

8701 catgtacagt atctgaatct ctctcacaat caattgtatg ggcagattca aaatatagtt
>.....HcrVf2.....>

8761 gctggtcctt cttcagcggg tgatcttagt tctaaccaat tcaactggtg attgcctatt
>.....HcrVf2.....>

8821 gttcccact cattaatgtg gctagatctt tccaattcat cattttctgg atctgttttc
>.....HcrVf2.....>

8881 cacttcttct gtgataggcc ggatgaacca aagcaacttg gaattcttcg tctcgggaac
>.....HcrVf2.....>

8941 aattttctca ctggaaaagt acccgattgt tggatgagtt ggccatcatt ggcattocta
>.....HcrVf2.....>

9001 aatttagaaa acaacaacct aactgggaat gtcccaatgt ccatgggata cttagattgg
>.....HcrVf2.....>

9061 ctggaatccc tgcacttgcg gaataatcac ctgtacggag aattgccaca ttcctgcag
>.....HcrVf2.....>

9121 aactgtacct cgttgtcagt tgttgacctt agtgaaaatg ggtttccgg aagcatacca
>.....HcrVf2.....>

9181 atatggatag ggaaaagcct ttcagggttg aatgttctta accttcgttc aaataagttt
>.....HcrVf2.....>

9241 gaaggagata ttctaatga agtttgttat ttgaaaagtc tccagatatt ggacctgca
>.....HcrVf2.....>

9301 cataacaac tctcaggaat gataccgaga tgcttcaca atttgagcgc catggcta
>.....HcrVf2.....>

9361 ttttcacaat cattttctcc aactagtttt tggggtatgg ttgcgtctgg acttacagag
>.....HcrVf2.....>

9421 aatgcaatct tgtaacgaa agggatggaa atggaatata ccaagattct gggattcgta
>.....HcrVf2.....>

9481 aaaggcatgg atctttcatg caactttatg tatggagaga tcctgaaga acttacggc
>.....HcrVf2.....>

```

9541  ctccctcgcat tgcagtatct caatttatcg aataatcgct tcaccggaag aattccttca
>.....HcrVf2.....>
9601  aagattggta gtatggcaca gttagaatct ctcgattttt ccatgaacca acttgatggt
>.....HcrVf2.....>
9661  gaaattcctc caagcatgac gattttgaca tttctgagtc acttaaactt gtcctacaac
>.....HcrVf2.....>
9721  aatttgacgg gacgaattcc ggaaagcact caactgcaga gccttgatca gtcgagcttc
>.....HcrVf2.....>
9781  gtcggcaacg aactatgagg agctcctctc aacaagaatt gcagcgagaa tggggtgata
>.....HcrVf2.....>
9841  ccgccaccaa cagttgagca cgacggagga ggaggataca gtttagtoga agatgagtg
>.....HcrVf2.....>
9901  ttctacgtga gcttgggagt tggattcttc acggggtttt ggattgtgct tggttctttg
>.....HcrVf2.....>
9961  ctggtaaaca tgccatggag cattcttctt tcacagttgc tgaataggat agtgctaaaa
>.....HcrVf2.....>
10021 atgtatcatg taattgttga atatgtctag ctttgttttg tactttgcgt aagtttggtg
>.....HcrVf2.....>>
>>.....Ter.....>
10081  gcattttcct tgctgtgacg aatatgccag tatggttggt ttgtatgatt ttgtcaaatt
>.....Ter.....>
10141  tcgtcctctt gttttattgt attttcttt caggtttggc ttagagggg ttaggtttca
>.....Ter.....>
10201  tgtccccct cccttgatc atttttgtt ttgttttgt ttctacagg gtaaggttta
>.....Ter.....>
10261  tgtctccct tcttactcaa tgttgtttt ctcttttct tggcattatg aggataaga
>.....Ter.....>
10321  tttgtgttct acaggggtaa gttactcaat gttgtaactt attttttcg ttatcaataa
>.....Ter.....>
10381  aatatccctc gtaccatcaa ggttttctta aaaataaaaa atagaaaaaa ttatctcata
>.....Ter.....>
10441  taaaattaa agacttgttt tctaaacaag tagctcttaa ttcatcaaaa gtcaattgaa
>.....Ter.....>
10501  tgacaagaga aatgtgtgaa aatggttag gaattagttg cctattaatt aattatcagc
>.....Ter.....>
10561  aaactcacat tattcacatt atttcggggc cgggtaccg atcagattgt cgtttcccgc
>.....Ter.....>>
10621  cttcggttta aactatcagt gtttgacagg atatatggc gggtaaacct aagagaaaag
>>.....RB.....>>
10681  agcgtttatt agaataatcg gatatttaa agggcgtgaa aaggtttatc cgttcgtcca
10741  tttgtatgtg catgccaacc acagggttcc cctcgggagt gcttggcatt ccgtgcgata
10801  atgacttctg ttcaaccacc caaacgtcgg aaagcctgac gacggagcag cattccaaaa
10861  agatcccttg gctcgtctgg gtcggctaga aggtcgagt ggctgctgtg gcttgatccc
10921  tcaacgcggt cgcggacgta gcgacgcgc gaaaaatcct cgatcgcaaa tccgacgctg
10981  tcgaaaagcg tgatctgctt gtcgctctt cggccgacgt cctggccagt catcacgcgc

```


12541 agaataacttg cgactagaac cggagacatt acgccatgaa caagagcgcc gccgctggcc
>.....pVS1.....>

12601 tgctgggcta tgcccgcgtc agcaccgacg accaggactt gaccaaccaa cgggccgaac
>.....pVS1.....>

12661 tgcacgcggc cggctgcacc aagctgtttt ccgagaagat caccggcacc aggcgcgacc
>.....pVS1.....>

12721 gcccggagct ggccaggatg cttgaccacc tacgccctgg cgacgttgTG acagtgacca
>.....pVS1.....>

12781 ggctagaccg cctggcccgc agcaccgcg acctactgga cattgccgag cgcattccagg
>.....pVS1.....>

12841 aggccggcgc gggcctgcgt agcctggcag agccgtggc cgacaccacc acgccggccc
>.....pVS1.....>

12901 gccgcatggt gttgaccgtg ttcgccgca tgccgagtt cgagcgttc ctaatcatcg
>.....pVS1.....>

12961 accgcaccgc gagcggggc gaggcccca aggcgcgagg cgtgaagttt ggccccgcc
>.....pVS1.....>

13021 ctaccctcac ccggcagag atcgcgacg ccgcgagct gatcgaccag gaaggccga
>.....pVS1.....>

13081 ccgtgaaaga ggcggctgca ctgcttggcg tgcatcgtc gaccctgtac cgcgcaactg
>.....pVS1.....>

13141 agcgcagcga ggaagtgacg cccaccgagg ccaggcggcg cggtgcttc cgtgaggacg
>.....pVS1.....>

13201 cattgaccga ggccgacgcc ctggcggccg ccgagaatga acgccaagag gaacaagcat
>.....pVS1.....>

13261 gaaaccgcac caggacggcc aggacgaacc gtttttatt accgaagaga tggagggga
>.....pVS1.....>

13321 gatgatcgcg gccggttacg tgttcgagcc gcccgccac gtctcaaccg tgcggctgca
>.....pVS1.....>

13381 tgaatcctg gccggttgt ctgatccaa gctcggcggcc tggccggcga gcttggccgc
>.....pVS1.....>

13441 tgaagaaacc gagcggcgc gtctaaaag gtgatgtgta tttgagtaa acagcttgcg
>.....pVS1.....>

13501 tcatcgggc gctgctata tgatcgatg agtaaataaa caatacgcg aggggaaccg
>.....pVS1.....>

13561 atgaaggta tcgctgtact taaccagaaa ggcgggtcag gcaagacgac catcgcac
>.....pVS1.....>

13621 catctagccc gcgccctgca actcgccggg gccgatgttc tghtagtcga ttccgatccc
>.....pVS1.....>

13681 cagggcagtg ccgcgattg ggcggcctg cgggaagatc aaccgctaac cgttgctggc
>.....pVS1.....>

13741 atcgaccgcc cgacgattga ccgcgacgtg aaggccatcg gccggcgca cttcgtagtg
>.....pVS1.....>

13801 atcgacggag cggccaggc ggcggacttg gctgtgtccg cgatcaaggc agccgacttc
>.....pVS1.....>

13861 gtgctgattc cggcgcagcc aagcccttac gacatatggg ccaccgcca cctggtggag
>.....pVS1.....>

13921 ctggttaagc agcgcattga ggtcacggat ggaaggctac aagcgccctt tgcgtgtgc
>.....pVS1.....>

13981 cggcgatca aaggcacgcg catcggcggg gaggttgccg aggcgctggc cgggtacgag
>.....pVS1.....>

14041 ctgccattc ttgagtcccg tatcacgcag cgcgtgagct acccaggcac tgccgcccgc
>.....pVS1.....>

14101 ggcacaaccg ttcttgaatc agaaccgcag ggcgacgctg cccgcgaggt ccaggcgctg
>.....pVS1.....>

14161 gccgctgaaa ttaaatcaaa actcatttga gttaatgagg taaagagaaa atgagcaaaa
>.....pVS1.....>

14221 gcacaaacac gctaagtgcc ggccgtccga gcgcacgcag cagcaaggct gcaacgttgg
>.....pVS1.....>

14281 ccagcctggc agacacgcca gccatgaagc gggtaactt tcagttgccg gcggaggatc
>.....pVS1.....>

14341 acaccaagct gaagatgtac gcgtacgcc aaggcaagac cattaccgag ctgctatctg
>.....pVS1.....>

14401 aatacatcgc gcagctacca gagtaaatga gcaaatgaat aatgagtag atgaatttta
>.....pVS1.....>

14461 gcggctaaag gaggcggcat ggaaaatcaa gaacaaccag gcaccgacgc cgtggaatgc
>.....pVS1.....>

14521 cccatgtgtg gaggaacggg cggttggcca ggcgtaagcg gctgggttgt ctgccggccc
>.....pVS1.....>

14581 tgcaatggca ctggaacccc caagcccagc gaatcggcgt gagcggtcgc aaaccatccg
>.....pVS1.....>

14641 gcccggtaca aatcggcgcg gcgctgggtg atgacctggt ggagaagttg aaggcggcgc
>.....pVS1.....>

14701 aggccgcca gcggcaacgc atcagggcag aagcacgccc cggtgaatcg tggcaagcgg
>.....pVS1.....>

14761 ccgctgatcg aatccgcaaa gaatcccggc aaccgcccgc agccggtgcg ccgtcgatta
>.....pVS1.....>

14821 ggaagcccgc caagggcgac gagcaaccag atttttcgt tccgatgctc tatgacgtgg
>.....pVS1.....>

14881 gcaccgcgga tagtcgcagc atcatggacg tggccgtttt ccgtctgctg aagcgtgacc
>.....pVS1.....>

14941 gacgagctgg cgaggtgatc cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttccgcag
>.....pVS1.....>

15001 ggccggccgg catggcgagt gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttccatc
>.....pVS1.....>

15061 taaccgaatc catgaaccga taccgggaag ggaagggaga caagcccggc cgcgtgttcc
>.....pVS1.....>

15121 gtccacacgt tgcggacgta ctcaagtctt gccggcgagc cgatggcgga aagcagaaag
>.....pVS1.....>

15181 acgacctggt agaaacctgc attcggtaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga
>.....pVS1.....>

15241 agaaggccaa gaacggccgc ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct
>.....pVS1.....>

15301 acaagatcgt aaagagcgaa accgggcggc cgagtacat cgagatcgag ctagctgatt
>.....pVS1.....>

15361 ggatgtaccg cgagatcaca gaaggcaaga acccggacgt gctgacggtt caccocgatt
 >.....pVS1.....>

15421 actttttgat cgatcccggc atcggccgtt ttctctaccg cctggcacgc cgcgcgcag
 >.....pVS1.....>

15481 gcaaggcaga agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgcggag
 >.....pVS1.....>

15541 agttcaagaa gttctgtttc accgtgcgca agctgatcgg gtcaaatgac ctgccggagt
 >.....pVS1.....>

15601 acgatttgaa ggaggaggcg gggcaggctg gcccgatcct agtcatgccc taccgcaacc
 >.....pVS1.....>

15661 tgatcgaggg cgaagcatcc gccggttctt aatgtacgga gcagatgcta gggcaaattg
 >.....pVS1.....>

15721 ccctagcagg ggaaaaaggt cgaaaaggtc tctttcctgt ggatagcacg tacattggga
 >.....pVS1.....>

15781 acccaaagcc gtacattggg aaccggaacc cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg
 >.....pVS1.....>

15841 ggaaccggtc acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat tttccgct
 >.....pVS1.....>

15901 aaaactcttt aaaacttatt aaaactctta aaaccgcctt ggctgtgca taactgtctg
 >.....pVS1.....>

15961 gccagcgcac agccgaagag ctgcaaaaag cgctaccctt tcggtcgctg cgtccctac
 >.....pVS1.....>

16021 gccccgcgc ttcgcgtcgg cctatcgcgg ccgctggccg ctcaaaaatg gctggcctac
 >.....pVS1.....>

16081 ggccaggcaa tctaccaggg cgcggacaag ccgcgccgtc gccactcgac cgcggcgcc
 >.....pVS1.....>

16141 cacatcaagg caccggtggg tatgcctgac gatgcgtgga gaccgaaacc ttgcgctcgt
 >....pVS1....>>

16201 tcgccagcca ggacagaaat gcctcgactt cgctgctgcc caaggttgcc gggtgacgca
 16261 caccgtggaa acggatgaag gcacgaacc agtggacata agcctgttcg gttcgtaagc
 16321 tgtaatgcaa gtagcgtatg cgctcacgca actggtccag aaccttgacc gaacgcagcg
 >>.....Sm/Sp.....>

16381 gtggtaacgg cgcagtggcg gttttcatgg cttgttatga ctgtttttt ggggtacagt
 >.....Sm/Sp.....>

16441 ctatgcctcg ggcatccaag cagcaagcgc gttacgccgt gggtcgatgt ttgatgttat
 >.....Sm/Sp.....>

16501 ggagcagcaa cgatgttacg cagcagggca gtcgccctaa aacaaagtta aacatcatga
 >.....Sm/Sp.....>

16561 gggaaagcgg gatcgcgaa gtatcgactc aactatcaga ggtagttggc gtcacgagc
 >.....Sm/Sp.....>

16621 gccatctcga accgacgttg ctggccgtac attgtacgg ctccgcagtg gatggcgcc
 >.....Sm/Sp.....>

16681 tgaagccaca cagtgatatt gatttctgg ttacggtgac cgtaaggctt gatgaacaa
 >.....Sm/Sp.....>

16741 cgcggcgagc tttgatcaac gacctttgg aaacttcggc ttcccctgga gagagcgaga
 >.....Sm/Sp.....>

16801 ttctccgcgc tgtagaagtc accattggtg tgcacgacga catcattccg tggcgttatc
 >.....Sm/Sp.....>
 16861 cagctaagcg cgaactgcaa tttggagaat ggcagcgcaa tgacattctt gcaggtatct
 >.....Sm/Sp.....>
 16921 tcgagccagc cacgatcgac attgatctgg ctatcttgct gacaaaagca agagaacata
 >.....Sm/Sp.....>
 16981 gcgttgcctt ggtaggtcca gcggcggagg aactcttga tccggttctt gaacaggatc
 >.....Sm/Sp.....>
 17041 tatttgaggc gctaaatgaa accttaacgc tatggaactc gccgcccagc tgggctggcg
 >.....Sm/Sp.....>
 17101 atgagcgaaa tgtagtgctt acgttgctcc gcatttggtg cagcgcagta accggcaaaa
 >.....Sm/Sp.....>
 17161 tcgcccga ggatgctgct gccgactggg caatggagcg cctgccggcc cagtatcagc
 >.....Sm/Sp.....>
 17221 ccgtcatact tgaagctaga caggcttacc ttggacaaga agaagatcgc ttggcctcgc
 >.....Sm/Sp.....>
 17281 gcgcagatca gttggaagaa tttgtccact acgtgaaagg cgagatcacc aaggtagtcg
 >.....Sm/Sp.....>
 17341 gcaaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt cgcggcggcg cttaaactcaa
 >.....>> Sm/Sp
 17401 gcgtagatg cactaagcac ataattgctc acagccaaac tatcaggcca agtctgcttt
 17461 tattattttt aagcgtgcat aataagccct acacaaattg ggagatatat catgaaaggc
 17521 tggctttttc ttgttatcgc aatagttggc gaagtaatcg caacatagct tgcttggtcg
 17581 ttccgcgtga acgtcggctc gattgtacct gcgttcaaat actttgcgat cgtgttgctg
 17641 gcctgcccgg tgcgtcggct gatctcacgg atcgcactgct tctctcgcaa cgccatccga
 17701 cggatgatgt ttaaaagtcc catgtggatc actccggtgc cccgtcgtc accgtgttgg
 17761 ggggaagggtg cacatggctc agttctcaat ggaaattatc tgcctaaccg gctcagttct
 17821 gcgtagaac caacatgcaa gctccaccgg gtgcaaagcg gcagcggcgg caggatatat
 >>...LB.....>
 17881 tcaattgtaa atggcttcat gtccgggaaa tctacatgga tcagcaatga gtatgatggt
 >...LB....>
 17941 caatatggag aaaaagaaag agtaattacc aatttttttt caattcaaaa atgtagatgt
 18001 ccgcagcgtt attataaaat gaaagtacat tttgataaaa cgacaaatta cgatccgtcg
 18061 tatttatagg cgaaagcaat aaacaaatta ttctaattcg gaaatcttta tttcgacgtg
 18121 tctacattca cgtccaaatg ggggcttaga tgagaaactt cacgatcggc

Abbildung 19 Größeninformation zu den einzelnen T-DNA Abschnitten des Transformationsvektor p9-Dao-FLPi-HcrVf2 vor und nach Hitzeinduktion (vereinfacht dargestellt, ausführliche in Abbildung 1 C) (A) sowie schematische Darstellung der T-DNA Struktur für die cisgenen Apfellinien iM879-68 (B) und iM946-193 (C)	103
Abbildung 20 qRT-PCR-Analyse der <i>Rvi6</i> Genexpression in den cisgenen Apfellinien iM879-68 und iM946-193 relativ zur Sorte 'Santana'.....	104
Abbildung 21 Blätter cisgener Apfellinien (iM879-68, iM946-193) und von dazugehörigen transgenen Ursprungslinien (M879, M946) sowie untransformierten Apfelsorten ('Pinova', 'Brookfield Baigent') inokuliert mit <i>V. inaequalis</i> Isolat 104, 28 Tage nach der Inokulation.	106
Abbildung 22 Schematische Darstellung des <i>Rvi15</i> (alte Bezeichnung: <i>Vr2</i>) Resistenzlocus mit den Schorfresistenzkandidatengenen <i>Vr2-A</i> , <i>Vr2-B</i> und <i>Vr2-C</i>	109
Abbildung 23 PCR-basierter Nachweis GMAL 2473 spezifischer SNPs stromabwärts von <i>Vr2-A</i> Kandidatengen (A) und PCR-basierter Nachweis der Kandidatengene <i>Vr2-B</i> (B) und <i>Vr2-C</i> (C) aus GMAL 2473 in ausgewählten Nachkommen der Kartierungspopulation 'Golden Delicious' x GMAL 2473	112
Abbildung 24 Schematische Darstellung der Hybridisierungsorte der Primer RE162_F und MYB10_R_rev (schwarze Pfeile) am <i>MYB10</i> Promotor des <i>MYB10</i> (<i>R1</i>) und <i>MYB10</i> (<i>R6</i>) Allels.	116
Abbildung 25 Amplifizierte <i>MYB10</i> Allele für 16 Akzessionen der <i>Malus</i> Sammlung (Präfix MAL) unter Verwendung der Primer RE162_F und MYB10_R_rev.....	117
Abbildung 26 Exakte Fragmentgrößenbestimmung der amplifizierten <i>MYB10</i> Allele für 351 Akzessionen der <i>Malus</i> Sammlung.	118
Abbildung 27 Generelle Struktur des <i>MYB10</i> Promotors auf Basis der 21 sequenzierten <i>MYB10</i> Allele.	119
Abbildung 28 Phylogenetischer Stammbaum auf Basis von 24 <i>MYB10</i> Allelsequenzen.	124
Abbildung 29 Boniturklassen für Deskriptor Nr. 53 „Farbe des Fruchtfleisches“ gemäß den UPOV Richtlinien für Apfel (UPOV, 2005).	125
Abbildung 30 Halbierte Früchte ausgewählter Akzessionen der <i>Malus</i> Sammlung.....	126
Abbildung 31 Phänotyp der transgenen <i>MYB10</i> Linien 35S:: <i>MYB10</i> _(cDNA) und Endog <i>MYB10</i> _(<i>R6</i>) in <i>in vitro</i> Kultur unter normalen Anzuchtbedingungen (16 h Licht (0,65 klx) bei 23 °C/8 h Dunkelheit bei 17 °C).....	130
Abbildung 32 Regenerationsversuch mit zwei verschiedenen transgenen <i>MYB10</i> Linienarten.	132
Abbildung A 1 Detaillierte Karte des Vektors p9-Dao-FLPi-HcrVf2. Zirkuläre DNA, 18170 bp. .	192

