

## I Inhaltsverzeichnis

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

---

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

---

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