

# 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 resistenter Sorten .....	18
1.5	Gentechnologische Strategien .....	19
1.5.1	Der Gentransfer .....	19
1.5.2	Selektionsstrategien .....	21
1.6	Flp/ <i>FRT</i> -Rekombinationssystem zur <i>npIII</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 Resistenzerhöhung 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	Agrobakterienstämme 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/ <i>FRT</i> -Rekombinationsystem .....	45
3.1.1	Transformation und Selektion von putativ transgenen Pflanzen .....	45
3.1.2	Nachweis der T-DNA Integration mittels Southern Blot-Analyse und molekulare Charakterisierung der transgenen Linien .....	46
3.1.2.1	Bestimmung der T-DNA-Integrationen mittels Southern Blot Analyse .....	46
3.1.2.2	PCR zum Nachweis von <i>Agrobacterium</i> -Kontaminationen .....	46
3.1.2.3	Long-Range-PCR zur Amplifikation des <i>FRT</i> -flankierten Bereichs zwischen 35S-Promotor und Reportergen .....	47
3.1.2.4	Expressionsanalyse der Transgene in den T-Apfellinien .....	48
3.1.3	Etablierung eines Verfahrens zur induzierten Entfernung des <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 Resistenzerhöhung in transgenen Apfelpflanzen .....	69
3.2.1	Die Aufnahme von Fluoreszein-markierten siRNA aus pflanzlichen Geweben in pilzliche Strukturen .....	69
3.2.2	Inhibitionsversuche von Chitinsynthasen mittels Nikkomycin Z .....	72
3.2.3	Isolierung von Chitinsynthase Klasse V-Genen aus den pilzlichen Schaderegern <i>P. leucotricha</i> und <i>V. inaequalis</i> .....	74
3.2.3.1	Isolierung von Chitinsynthase Klasse V-Genfragmenten mit degenerierten Primern .....	74
3.2.3.2	Isolierung des vollständigen <i>Chitinsynthase</i> Klasse V-Gens aus <i>V. inaequalis</i> .....	76
3.2.3.3	Untersuchungen zur Isolierung eines <i>Chitinsynthase</i> Klasse V-Gens aus <i>P. leucotricha</i> ....	79

4	Diskussion-----	80
4.1	Flp/ <i>FRT</i> -vermittelte Entfernung des <i>nptII</i> -Gens-----	80
4.1.1	Voruntersuchungen transgener Apfelflinien -----	80
4.1.2	Untersuchungen zum Hitzestress-induzierbaren <i>Gmhsp17.5-E</i> -Promotor -----	81
4.1.3	Die Regeneration vollständig <i>nptII</i> -freier Sprossregenerate -----	85
4.1.4	Flp/ <i>FRT</i> -Rekombinationssystem für die effiziente Entfernung des <i>nptII</i> -Gens und die Möglichkeit zur gezielten Integration neuer Zielgene -----	88
4.1.5	Praxisorientierte Verbesserung des Flp/ <i>FRT</i> -Rekombinationssystems -----	89
4.2	HIGS- eine neue Strategie zur RNAi-basierten Verbesserung der Resistenz in transgenen Kulturpflanzen -----	92
4.2.1	Die Aufnahme pflanzlicher siRNA in die pilzlichen Hyphen-----	92
4.2.2	<i>Chitinsynthase</i> Klasse V-Gene als potentielle Targets zur RNAi-basierten Erhöhung der Resistenz in transgenen Apfelpflanzen-----	94
4.2.3	Isolierung des <i>Chitinsynthase</i> 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	<i>Chitinsynthase</i> -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