

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 Apfelzüchtung	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 Apfelzüchtung	31

1.6.3.1	Das Dexamethason induzierbare R/Rs Rekombinasesystem	32
1.6.3.2	Das hitzeinduzierbare Flp/FRT Rekombinasesystem	33
1.7	MYB10 (R6) 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-Dao1-FLPI-HcrVf2	46
2.1.4.3	p9-Dao1-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' × 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' × 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

Inhaltsverzeichnis

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	Genome Walking	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 Chimeritität	76
3.1.2.3 Zusammenfassung	78
3.2 ERZEUGUNG CISGENER SCHORFRESISTENTER APFELSORVENT 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 Rvi6 Genexpression (qRT-PCR)	104
3.2.4.5 Schorfresistenz	105
3.2.5 Zusammenfassung	107
3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUM Rv15 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

Inhaltsverzeichnis

3.3.5	Zusammenfassung	113
3.4	MYB10 (R6) 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</i> (<i>R1</i>) Allele.....	122
3.4.1.2.2	Sequenzanalyse der <i>MYB10</i> (<i>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</i> (<i>R6</i>) Allel, rot pigmentierter Fruchtfleischfarbe und dem geografischen Ursprung der betreffenden <i>Malus</i> Spezies..	126
3.4.2	<i>MYB10</i> (<i>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>Rv15</i> SCHORFRESISTENZLOCUS.....	152
4.4	<i>MYB10</i> (<i>R6</i>) ALS ALTERNATIVE ZUM REKOMBINASESYSTEM FÜR DEN CISGENETISCHEN ANSATZ BEIM APFEL	155
	LITERATURVERZEICHNIS	165
	DANKSAGUNG	176
	ANHANG	177
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	206
	TABELLENVERZEICHNIS	208