

**Entwicklung und Analyse transgener Apfelpflanzen mit dem *vst1*-Gen aus  
*Vitis vinifera* L. und dem PGIP-Gen aus *Actinidia deliciosa***

Von dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

VON

**Dipl.-Biol. Iris Szankowski**

geboren am 15.03.1973 in Langenhagen

2002

Referent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Korreferent: Prof. Dr. J. Schönherr

3. Referent: Prof. Dr. G. Forkmann

Tag der Promotion: 23. Mai 2002

## Zusammenfassung

Szankowski, Iris

### **Entwicklung und Analyse transgener Apfelpflanzen mit dem *vst1*-Gen aus *Vitis vinifera* L. und dem PGIP-Gen aus *Actinidia deliciosa***

Der Apfel ist in den gemäßigten Breiten das bedeutendste Fruchtbst. Zentrales Zuchtziel ist die Erhöhung der Krankheitsresistenz, vornehmlich gegenüber fungalen Pathogenen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein gentechnischer Ansatz zur Resistenzerhöhung verfolgt.

Als Voraussetzung für die Durchführung von Transformationsexperimenten wurden für die vier wirtschaftlich bedeutenden Apfelsorten *Elstar*, *Holsteiner Cox*, *Gloster* und *Boskoop* Regenerationssysteme aus Blattmaterial über Organogenese etabliert. Mit der Zielsetzung, die Resistenz gegen pilzliche Pathogene zu erhöhen, wurden die Sorten *Elstar* und *Holsteiner Cox* unter Anwendung des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers transformiert. Eingesetzt wurden zwei unterschiedliche, breit wirkende antifungale Prinzipien wie die Erweiterung des Phytoalexinspektrums durch den Transfer des Gens für die Stilbensynthese (verantwortlich für die Synthese des Phytoalexins Resveratrol) sowie die Expression eines Polygalacturonase-inhibierenden Proteins aus Kiwi. Zur Selektion transgener Sprosse wurde das Herbizidresistenz-Gen *bar* aus *Streptomyces hygroscopicus* eingesetzt. Von der Sorte *Elstar* wurde eine transgene Linie etabliert, die das Stilbensynthasegen aus *Vitis vinifera* L. stabil integriert hat. Von der Sorte *Holsteiner Cox* wurden neun transgene Linien mit dem *vst1*-Genkonstrukt, sowie drei transgene Linien mit dem Gen für ein Polygalacturonase-inhibierendes Protein aus Kiwi (*Actinidia deliciosa*) regeneriert und erfolgreich ins Gewächshaus überführt. Die transgenen Linien wurden eingehend hinsichtlich der Integration der Transgene ins Apfelgenom mit PCR sowie Southern Blot Analysen charakterisiert. Unter dem Aspekt der gentechnischen Sicherheit wurden die Pflanzen ebenfalls auf die Integration von „backbone“ Sequenzen der eingesetzten Vektoren hin untersucht. Diese wurden in einigen Linien nachgewiesen.

Die Transkription der Transgene wurde mittels RT-PCR überprüft und mit einer Ausnahme für alle transgenen Linien nachgewiesen. Die Aktivität der Stilbensynthese wurde durch den Nachweis des Syntheseproduktes Resveratrol in den transgenen Pflanzen mittels HPLC überprüft. Die Untersuchungen ergaben, dass ein Resveratrolderivat, wohl eine glykosilierte Form, in den Pflanzen vorliegt. In den nicht-transgenen Kontrollpflanzen wurde weder Resveratrol noch ein Resveratrol-Derivat nachgewiesen. Begleitend wurden Untersuchungen über die Wirkung von Resveratrol auf die Keimung von Sporen des Apfelpathogens *Venturia inaequalis* durchgeführt. Eine Keimungshemmung wurde *in vitro* nachgewiesen.

Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage geschaffen, das antifungale Potenzial des Phytoalexins Resveratrol sowie des Polygalacturonase-inhibierenden Proteins aus Kiwi gegenüber Apfelpathogenen wie *Venturia inaequalis* in transgenen Apfelpflanzen bewerten zu können.

**Schlagwörter:** Apfel (*Malus x domestica* Borkh.), Transformation, Stilbensynthese, PGIP

## Abstract

Szankowski, Iris

### **Development and analysis of transgenic apple plants carrying the *vst1*-gene from *Vitis vinifera* L. and the PGIP-gene from *Actinidia deliciosa***

Apple is one of the most important fruit crops in the temperate zones. Resistance to fungal diseases is one of the main objectives of apple breeding. The aim of the present study was to improve disease resistance through genetic engineering.

Suitable protocols for the regeneration from leaf explants via organogenesis were developed for the economic important apple cultivars *Elstar*, *Holsteiner Cox*, *Gloster* and *Boskoop*. With the objective to increase the resistance against pathogenic fungi, the varieties *Elstar* and *Holsteiner Cox* were transformed via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Gene constructs with a broad antifungal effect, namely the stilbenesynthase gene from *Vitis vinifera* L. (*vst1*), responsible for the synthesis of the phytoalexin resveratrol, and the gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from Kiwi (*Actinidia deliciosa*) were used in transformation experiments. As a selectable marker, the *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus*, which effects resistance against the herbicide phosphinotricin (PPT), was additionally introduced. One transgenic *Elstar* clone carrying the *vst1*-gene as well as nine transgenic *Holsteiner Cox* lines carrying the stilbensynthase gene and three transgenic HC lines with the PGIP-gene from Kiwi were regenerated and successfully transferred to the greenhouse. Integration of the transgenes was confirmed by PCR and Southern blot analysis. With regards to biosafety aspects, the transfer of backbone sequences from the vectors to the plants genomes was also checked. In several lines backbone sequences could be detected.

The transcription of the introduced transgenes was examined via RT-PCR analysis. With one exception, the specific mRNAs were detected in all transgenic lines.

HPLC analysis revealed the accumulation of a resveratrol-derivate, likely a glucoside, in transgenic *vst1*-plants. Neither resveratrol nor this compound were present in non-transgenic control plants.

Accompanying examinations were carried out to determine the effect of resveratrol against *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. Agar-plate bioassays indicated that resveratrol severely inhibits the germination of *Venturia inaequalis* spores.

The present study enables further evaluation of the effect of the introduced genes and their products in transgenic apple plants against apple pathogenic fungi like *Venturia inaequalis*.

**Keywords:** apple (*Malus x domestica* Borkh.), transformation, stilbensynthase, PGIP

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Der Apfel</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Taxonomie und Ursprung.....	2
1.1.2 Krankheiten.....	2
1.1.3 Zuchtziele.....	3
<b>1.2 Anwendungspotenzial der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Nutzgene und ihr Anwendungspotenzial zur Resistenzvermittlung</b> .....	<b>4</b>
1.3.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen.....	5
1.3.1.1 Phytoalexine vom Stilbentyp.....	6
1.3.1.2 Polygalacturonase-inhibierende Proteine (PGIP).....	9
<b>1.4 Konzeption der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Geräte.....	13
2.1.2 Materialien.....	13
2.1.3 Reagenzien.....	14
2.1.4 Pflanzenmaterial.....	15
2.1.5 Bakterienstämme.....	16
2.1.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.1.5.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	16
2.1.6 Pflanzenpathogene.....	16
2.1.6.1 Mehltau ( <i>Podosphaera leucotricha</i> [Ell. et Ev.] Salm.....	16
2.1.6.2 Apfelschorf ( <i>Venturia inaequalis</i> ).....	16
2.1.7 Nukleinsäuren.....	17
2.1.7.1 Oligonukleotide.....	17
2.1.7.2 Zur Transformation eingesetzte Gene.....	17
2.1.7.3 Binäre Vektoren.....	18
2.1.7.4 DNA-Längenstandard.....	19
2.1.8 Medien.....	20
2.1.8.1 Bakterienmedien.....	20
2.1.8.2 Basismedium für die Pflanzenkultur.....	20

2.1.9 Selektives Agens.....	20
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Sterilisation.....	21
2.2.2 Etablierung steriler Sprosskulturen.....	21
2.2.3 Kulturführung und Mikropropagation.....	22
2.2.4 Regeneration aus Blattmaterial.....	23
2.2.4.1 Versuchsaufbau und –auswertung.....	23
2.2.4.2 Medien.....	24
2.2.5 Bewurzelung.....	25
2.2.6 Akklimatisierung/ Kultur im Gewächshaus.....	26
2.2.7 Pflanzentransformation.....	26
2.2.7.1 Kultur, Anzucht und Aufreinigung der Agrobakterien für die Pflanzentransformation.....	26
2.2.7.2 Transformationsmethode.....	27
2.2.8 Selektion und Regeneration transgener Pflanzen.....	27
2.2.9 Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.9.1 Isolation von Nukleinsäuren.....	28
2.2.9.1.1 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	28
2.2.9.1.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen.....	29
2.2.9.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen.....	29
2.2.9.2 cDNA-Synthese.....	29
2.2.9.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
2.2.9.3.1 Fluorimetrische Bestimmung.....	30
2.2.9.3.2 Photometrische Messung.....	30
2.2.9.4 Agarosegelelektrophorese.....	31
2.2.9.5 Methoden der PCR.....	31
2.2.9.5.1 PCR mit isolierter DNA.....	31
2.2.9.5.2 PCR mit denaturierten Agrobakterien.....	33
2.2.9.5.3 PCR mit Pflanzengewebe.....	33
2.2.9.5.4 PCR mit Extract-N-Amp <sup>TM</sup> Plant PCR Kit von Firma Sigma.....	34
2.2.9.5.5 Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	34
2.2.9.6 Southern Blot-Analysen.....	34
2.2.9.6.1 Herstellung DIG-markierter Sonden.....	37
2.2.10 Nachweis von Resveratrol in Pflanzen mit der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	38
2.2.10.1 Extraktion des Resveratrols aus <i>in vitro</i> Sprossmaterial.....	38
2.2.10.2 Chromatographische Trennung des Resveratrols.....	38

2.2.10.3 Saure Hydrolyse.....	39
2.2.11 Apfelpathogene.....	39
2.2.11.1 Mehltau ( <i>Podosphaera leucotricha</i> [Ell.et Ev.] Salm).....	39
2.2.11.2 Apfelschorf ( <i>Venturia inaequalis</i> ).....	41
2.2.11.2.1 Kultur des Apfelschorfes.....	41
2.2.11.2.2 Produktion von Konidien.....	41
2.2.11.2.3 Effekt von Resveratrol auf die Keimung von Apfelschorf-Sporen.....	42
2.2.12 Statistische Auswertung.....	42
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Etablierung steriler Sprosskulturen.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Regeneration aus Blattmaterial.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 Bewurzelung.....</b>	<b>50</b>
3.3.1 <i>Holsteiner Cox</i> .....	51
3.3.2 <i>Elstar</i> .....	52
3.3.3 <i>Gloster</i> .....	53
3.3.4 <i>Boskoop</i> .....	54
<b>3.4 Transformation.....</b>	<b>55</b>
3.4.1 Ermittlung geeigneter Selektionsbedingungen.....	55
3.4.2 Transformationsmethode.....	56
3.4.3 Transformationseffizienz.....	56
3.4.4 Selektion.....	58
3.4.5 Eliminierung der Agrobakterien nach der Transformation.....	60
3.4.6 Überführung der regenerierten Pflanzen ins Gewächshaus.....	61
<b>3.5 Molekulare Analysen.....</b>	<b>62</b>
3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	62
3.5.1.1 PCR zum Nachweis des Stilbensynthasegens.....	62
3.5.1.2 PCR zum Nachweis des K-PGIP-Gens.....	63
3.5.2 Southern Blot Analysen zum Nachweis der Integration der Transgene ins Apfelgenom.....	64
3.5.2.1 Stilbensynthase-transgene Pflanzen.....	65
3.5.2.2 K-PGIP transgene Pflanzen.....	66
3.5.3 Expressionsanalysen.....	67
3.5.3.1 Stilbensynthase-transgene Pflanzen.....	67
3.5.3.1.1 Nachweis der Expression des <i>vst1</i> -Gens.....	67
3.5.3.1.2 Nachweis der Expression des <i>bar</i> -Gens.....	69
3.5.3.2 PGIP-transgene Pflanzen.....	70

3.5.3.2.1	Nachweis der Expression des PGIP-Gens und des <i>bar</i> -Gens.....	70
3.5.4	Transfer von Plasmidsequenzen ausserhalb der T-DNA .....	71
<b>3.6</b>	<b>Nachweis von Resveratrol mit HPLC.....</b>	<b>75</b>
3.6.1	Induktion des <i>vst1</i> -Promotors.....	75
3.6.2	HPLC-Analysen.....	76
<b>3.7</b>	<b>Einfluss von Resveratrol auf die Sporenkeimung von <i>Venturia inaequalis</i></b>	<b>81</b>
<b>3.8</b>	<b>Infektion mit Apfelpathogenen.....</b>	<b>83</b>
3.8.1	Mehltau ( <i>Podosphaera leucotricha</i> [Ell. et Ev.] Salm).....	83
3.8.1.1	<i>vst1</i> -Promotor Induktion durch Pathogenbefall.....	83
3.8.1.2	Gezielte Mehltauinokulationen.....	84
3.8.1.2.1	Konidien pro Konidienträger.....	85
3.8.1.2.2	Prozentualer Befall pro Blatt.....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>88</b>
<b>4.1</b>	<b>Regeneration.....</b>	<b>89</b>
4.1.1	Physiologie des Ausgangsmaterials.....	90
4.1.2	Medienzusammensetzung.....	91
4.1.3	Kulturbedigungen.....	94
<b>4.2</b>	<b>Bewurzelung.....</b>	<b>95</b>
<b>4.3</b>	<b>Transformation.....</b>	<b>96</b>
4.3.1	Transformationsmethode.....	96
4.3.2	Cokultur.....	99
4.3.3	Selektion.....	99
4.3.4	Effekt von Antibiotika auf die Regenerationsfähigkeit kultivierter Blattexplantate.	101
<b>4.4</b>	<b>Molekulare Analysen.....</b>	<b>102</b>
4.4.1	Geninaktivierung.....	103
4.4.2	Transfer von Vektorsequenzen ausserhalb der T-DNA ins pflanzliche Genom.....	106
4.4.3	Proteinexpression.....	108
<b>4.5</b>	<b>Nutzeffekte der Aktivität der Transgene.....</b>	<b>109</b>
4.5.1	Resveratrol <i>in vitro</i> .....	109
4.5.2	Resveratrol <i>in planta</i> .....	110
<b>4.6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>113</b>
<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>116</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<b>Abbildung</b>
AS	<b>Aminosäure</b>
ASS	<b>Aminosäuresequenz</b>
B	<b>Boskoop</b>
BAP	<b>6-Benzylaminopurin</b>
BAZ	<b>Bundesanstalt für Züchtungsforschung</b>
Bdg.	<b>Bildung</b>
Bew.	<b>Bewurzelung</b>
bp	<b>Basenpaare</b>
bzw.	<b>beziehungsweise</b>
cDNA	<b>copy DNA</b>
CTAB	<b>Cetyltrimethylammoniumbromid</b>
DEA	<b>Diethanol-Amin</b>
DEPC	<b>Diethylpyrocarbammat</b>
DIG	<b>Digoxigenin</b>
DNA	<i>desoxyribo nucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<b>Desoxynucleosidtriphosphat</b>
E	<b>Elstar</b>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EtOH	<b>Ethanol</b>
evt.	<b>eventuell</b>
Expl.	<b>Explantate</b>
Fa.	<b>Firma</b>
FW	<b>Fresh weight/Frischgewicht</b>
g	<b>Erdbeschleunigung (9,81 m/s<sup>2</sup>)</b>
G	<b>Gloster</b>
g	<b>Gramm</b>
GA <sub>3</sub>	<b>Gibberellic Acid A3/Gibberellinsäure A3</b>
ggf.	<b>gegebenenfalls</b>
Gus	<b>β-Glucuronidase</b>
h	<b>hours/Stunden</b>
HC	<b>Holsteiner Cox</b>
HPLC	<b>High Performance Liquid Chromatographie</b>
2-iP	<b>6-γ-γ(Dimethylallylamino) Purin</b>
i.	<b>induziert</b>
IBA	<b>Indole-3-butyric acid/Indol-3-Buttersäure</b>
incl.	<b>inclusive</b>
K-PGIP	<b>Polygalacturonase-inhibierendes Protein aus Kiwi</b>
l	<b>Liter</b>
LB	<b>left border-Sequenz/ linke Bordersequenz</b>

LRR	<i>Leucin-Rich-Repeats</i>
M	<b>Mol</b>
<i>M.</i>	<i>Malus</i>
max.	<b>maximal</b>
Med.	<b>Medium</b>
MeOH	Methanol
mg	<b>Milligramm</b>
min	<b>Minuten</b>
mM	<b>Millimol</b>
MS	<b>Murashige &amp; Skoog</b>
μM	Mikromol
n.i.	<b>nicht induziert</b>
NAA	<i>1-Naphtalene acetic acid</i> /1-Naphtylelessigsäure
NaF	<b>Natriumflourid</b>
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOrth.	<b>Natriumorthovanadate</b>
Neg.	<b>negativ</b>
o.g.	<b>oben genannt</b>
OD <sub>600</sub>	<b>Optische Dichte</b> bei 600nm
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> /Polymerase-Ketten Reaktion
PDA	<b>Potato Dextrose Agar</b>
PG	<b>Polygalacturonase</b>
PGIP	<b>Polygalacturonase-inhibierende Proteine</b>
PPM	<b>Plant Preservative Mixture</b>
ppt	<b>Phosphinotricin</b>
PVP	<b>Polyvinylpyrrolidon</b>
RB	<i>right border</i> -Sequenz/ rechte Bordersequenz
rpm	<i>rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RT	<b>Reverse Transkriptase</b>
Tab.	<b>Tabelle</b>
TE	<b>Transformationseffizienz</b>
tw.	<b>teilweise</b>
ÜN	<b>über Nacht</b>
ÜNK	<b>Übernachtskultur</b>
UV	<b>Ultra violett</b>
v/v	<i>volume per volume</i> / Volumenanteil pro Volumen
Vf	<b>Verdünnungsfaktor</b>
<i>vir</i> -Region	<b>Virulenz-Region</b>
<i>vst1</i>	<b>Stilbensynthase</b> aus <i>Vitis vinifera</i> L.
w/v	<i>weight per volume</i> /Gewichtsanteil pro Volumen
YEP	<b>Yeast extract Pepton</b>
z.B.	<b>zum Beispiel</b>
z.T.	<b>zum Teil</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Apfel

Der Apfel gehört mit einer Jahresproduktion von über 62 Millionen Tonnen im Jahre 2001 (apps.1.fao.org [08.01.02]) hinter den Citrusfrüchten und Bananen zu den wichtigsten Obstarten weltweit (<http://freeweb.dnet.it/laimer/allgemeines.html>[07.01.02]). Er ist wahrscheinlich die am weitesten verbreitete Frucht der Welt; so wird der Apfel auf allen Kontinenten in den gemäßigten Breiten der südlichen und nördlichen Hemisphäre kultiviert (KORBAN & CHEN 1992). Allein in Deutschland wurden im Jahre 2001 nahezu 1,5 Millionen Tonnen produziert. Der Großteil wird an der Niederelbe im Alten Land angebaut. Dieses Gebiet stellt mit seinen 1600 Hektar Anbaufläche das größte zusammenhängende Obstanbaugebiet Nordeuropas dar. Auf den Apfelanbau entfallen allein 660 ha, wobei die Lokalsorte *Holsteiner Cox* mit 35% Flächenanteil dominiert, gefolgt von den Hauptkulturen *Elstar* mit 20% und *Boskoop* mit 13%. Der Anteil der Sorte *Gloster* liegt zwischen 5 und 10% (www.[obstbau.org/regional/holstein.htm](http://obstbau.org/regional/holstein.htm) [09.01.02]).

**Tab. 1.1: Weltweite Apfelproduktion (Werte gerundet nach apps1.fao.org [FAO: *Food and Agriculture Organization*]).**

Kontinent	Produktion (Mill. Tonnen)
Asien	34
Europa	16
Amerika	10
Afrika	1,5
Ozeanien	0,8

### 1.1.1 Taxonomie und Ursprung

Der Apfel gehört innerhalb der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) zur Unterfamilie der *Maloideae*. Zu der Gattung *Malus* werden ca. 25-30 Spezies (JANICK et al. 1996) und einige Subspezies gezählt, wobei die Literaturangaben diesbezüglich stark variieren. Der Kulturapfel ist eine hochgradig heterozygote, oft polyploide interspezifische Hybride, für den heute die allgemein wissenschaftlich anerkannte Bezeichnung *Malus x domestica* gilt (KORBAN & SKIRVIN 1984). Die weltweit kommerziell bedeutenden Apfelsorten werden der Spezies *Malus x domestica* Borkh. zugeordnet (WAY et al. 1990).

Als Ahnen unserer heutigen Kultursorten werden die Arten *Malus orientalis* und *Malus sieversii* angesehen ([http://www.wzw.tu-muenchen.de/ob/deutsch/forschung/kap9\\_2.htm](http://www.wzw.tu-muenchen.de/ob/deutsch/forschung/kap9_2.htm) [14.02.02], JANICK et al. 1996). Aufgrund der besonderen Verdichtung im Formenreichtum in den Regionen vom Kaukasus bis zum Altai-Gebirge in Mittelasien wird dieses Gebiet als ursprüngliches Verbreitungsgebiet vermutet. Eine entscheidende Rolle bei der Evolution und Verbreitung des Apfels fällt der alten Handelsroute entlang der Seidenstrasse zu, die vom Schwarzen Meer über Taschkent, Samarkand und Alma Ata zum Westen Chinas führt.

### 1.1.2 Krankheiten

Im Obstanbau gehen Ernteauffälle überwiegend auf die Infektion phytopathogener Pilze zurück. Die größten Schäden beim Apfelanbau werden weltweit durch den Apfelschorferreger *Venturia inaequalis* verursacht. Er befällt nahezu alle oberirdischen Pflanzenteile wie Blätter und Früchte, seltener die Zweige (PAUL 1981). Die durch ihn hervorgerufene Qualitäts- und Ertragsminderung erfordert einen hohen Bekämpfungsaufwand (SCHNABEL & PARISI 1997); im integrierten Anbau können bis zur Ernte über 20 Spritzungen erforderlich sein (KOLLAR 1997). Kaum geringere Ertragsverluste werden durch den Apfelmehltauerreger *Podosphaera leucotricha* verzeichnet, der besonders in humiden Klimaten ein Problem darstellt (BÖMEKE 1978). Bei einem starken Befall muss mit Ertragsausfällen von 30-40% gerechnet werden (FRIEDRICH 1996).

### 1.1.3 Zuchtziele

In den letzten Jahrhunderten war die Züchtung der Äpfel hauptsächlich auf hohe Produktivität, Fruchtqualität, Geschmack, Erscheinungsbild und lange Lagerungsfähigkeit ausgerichtet (JANICK et al. 1996, FISCHER 1999). Merkmale wie Krankheitsresistenz, die noch in vielen Wildformen vorhanden sind, gingen im Laufe des Zuchtprozesses mehr und mehr verloren. Hohe Ertragsverluste durch Krankheiten und die Forderung aus wirtschaftlichen, ökologischen und toxikologischen Gründen den Einsatz von Agrochemikalien auf ein Minimum zu reduzieren, haben dazu geführt, dass die Resistenzzüchtung eine starke Aufwertung erfahren hat (KELLERHALS & FURRER 1994). Intensiv konzentriert man sich heutzutage darauf, spezifische Resistenzgene aus Wildformen wieder einzukreuzen (SCHMIDT et al. 1999, FISCHER & FISCHER 1999, ZIMMER 1999, MANTINGER 1999, FISCHER 1999), um die Resistenzeigenschaften anfälliger Sorten, vornehmlich gegen den Apfelschorferreger *Venturia inaequalis*, den Mehltauerreger (*Podosphaera leucotricha* [Ell. et Ev.] Salm) oder den bakteriell verursachten Feuerbrand (*Erwinia amylovora*), zu verbessern. Verschiedene Apfel-Wildarten aus den Serien *Malus*, *Baccatae* und *Sieboldianae* werden als Resistenzquellen gegen Schorf und Mehltau genutzt (BÜTTNER et al. 1999). Mehrere Resistenzgene, hauptsächlich gegen den Pilz *Venturia inaequalis*, wurden bereits in verschiedenen *Malus* Spezies identifiziert (Tab. 1.2) und in Züchtungsprogramme integriert (FISCHER & FISCHER, 1999, FISCHER 1999, SCHMIDT et al. 1999).

**Tab. 1.2: Spezifische Apfelschorf-Resistenzgene und deren Ursprung (Übersicht: KORBAN & CHEN 1992).**

Gen	Ursprung
<i>Vf</i>	<i>M. floribunda</i> # 821
<i>Vc</i>	<i>Cathay crab</i>
<i>Vm</i>	<i>M. micromalus</i>
<i>Vb</i>	<i>Hansen`s baccata</i> # 2
<i>Vbj</i>	<i>M. baccata jackii</i>
<i>Vr</i>	<i>M. pumila</i> R12740-7A
<i>Vj</i>	<i>Jonsib Crab</i>
<i>Va</i>	<i>Antonovka</i> PI 172612

## **1.2 Anwendungspotenzial der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung**

Die Leistungsverbesserung durch konventionelle Züchtung ist gerade beim Kulturapfel auf Grund der langen juvenilen Phase von 6 bis 8 Jahren (KORBAN & CHEN 1992), kombiniert mit einem hohem Grad an Selbstinkompatibilität und einem stark heterozygotem Charakter des Genoms, sehr langsam und langwierig. Der Prozess kann sich über mehrere Generationszyklen erstrecken, da nach dem Einkreuzen von Wildformen mit Resistenzgenen z.T. wiederholte Rückkreuzungen notwendig sind, um unerwünschte Eigenschaften der Wildformen wieder zu eliminieren. Jahrzehnte können vergehen, bis resistente Sorten zur Verfügung stehen, die dann auch noch den Ansprüchen der Konsumenten genügen und sich auf dem Markt behaupten müssen.

Um diese limitierenden Faktoren zu umgehen, richtet sich auch in der Obstzüchtung das Hauptaugenmerk auf die Entwicklung und Anwendung biotechnologischer Methoden einschließlich des molekularen Gentransfers.

Der Einsatz gentechnologischer Methoden ermöglicht den gezielten Transfer von Genen direkt in Elite-Genotypen. Trotz der Modifikation bestimmter Schlüsseleigenschaften bleibt so die Identität der Sorte gewahrt. Der Zuchtprozess wird dadurch immens beschleunigt, da langwierige Rückkreuzungen zur Rekonstitution des Ausgangsgenoms entfallen. Darüber hinaus eröffnet sich durch die Anwendung des molekularen Gentransfers der Weg, das verfügbare Genspektrum über die in der klassischen Züchtung vorgegebenen Art- und Gattungsgrenzen hinaus zu erweitern, da die sexuelle Barriere nicht mehr der limitierende Faktor ist.

## **1.3 Nutzgene und ihr Anwendungspotenzial zur Resistenzvermittlung**

Eine zentrale Stellung innerhalb der Zuchtziele beim Apfel nimmt die Resistenzzüchtung ein. Voraussetzung für einen Einsatz der Gentechnik zur Resistenzverbesserung von Pflanzen gegenüber Pathogenen ist die Aufklärung der molekularen Grundlagen von Resistenzreaktionen. Die Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung entsprechender Nutzgene bilden die Grundlage für eine sinnvolle Integration der Gentechnik in den Züchtungsprozess.

Die spezifischen Resistenzgene, die bei der Apfelmzüchtung von besonderer Bedeutung sind, wie z.B. die Schorfresistenzgene *Vf* usw., werden durch Marker (KOLLER et al. 1994, GIANFRANCESCHI et al. 1996) kartiert, sie wurden bisher aber noch nicht kloniert. Der Einsatz von Resistenzgenen mit einer solch hohen Spezifität birgt aber auch die Gefahr, dass die Resistenzen durch neu entstehende Rassen des Erregers durchbrochen werden. Dies ist bereits für die auf dem *Vf*-Gen basierende Resistenz eingetreten (PARISI et al. 1993, BÉNAOUF & PARISI 2000).

Allgemeine Prinzipien der pflanzlichen Pathogenabwehr stellen aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums eine gute Alternative zu den spezifischen Resistenzgenen zur Resistenzverbesserung dar. Zwei Strategien der pflanzlichen Abwehr sollen im folgenden vorgestellt und ihre Relevanz zur Erhöhung der Krankheitsresistenz in transgenen Pflanzen erörtert werden.

### 1.3.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Die pflanzlichen Abwehrmechanismen gegenüber Phytopathogenen sind breit gefächert; sie lassen sich jedoch grob in passive in aktive Abwehr unterteilen. So kann z.B. das Eindringen eines Pathogens durch passiv präformierte Strukturen wie die Zellwand oder die Kutikula oder durch chemische Abwehrstoffe verhindert werden. Gleichzeitig wird eine erfolgreiche Penetration eines Pathogens durch eine Vielzahl von Abwehrreaktionen aktiv beantwortet. Bereits präformierte, meist in der Vakuole vorliegende Substanzen, können nach einem Angriff des Schaderregers in das Cytoplasma entlassen werden (ELSTNER et al. 1996), oder aber es werden postinfektionell Abwehrmaßnahmen eingeleitet, die in vielen Fällen über eine spezifische Genaktivierung zur Neusynthese und Akkumulation bestimmter Substanzen führen (HRAZDINA et al. 1997, TIEMANN et al. 1993, Übersicht: DIXON 2001).

Zu den Abwehrstoffen, die erst als Antwort auf eine Infektion induziert werden, gehören die Phytoalexine. Der Begriff geht auf die Arbeiten von MÜLLER & BÖRGER (1940) über die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel zurück. Heute versteht man unter diesem Begriff niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Verbindungen, die von der Wirtspflanze synthetisiert werden und innerhalb bestimmter Wirtszellen akkumulieren, nach dem der Wirt mit Mikroorganismen in Kontakt gekommen ist (PAXTON 1981). In verschiedenen Pflanzenspezies wurden bereits Phytoalexine gefunden, darunter das Pisatin aus Erbse

(PERRIN & BOTTOMLEY 1961) und das Resveratrol aus der Weinrebe (LANGCAKE & PRYCE 1976), um nur einige zu nennen.

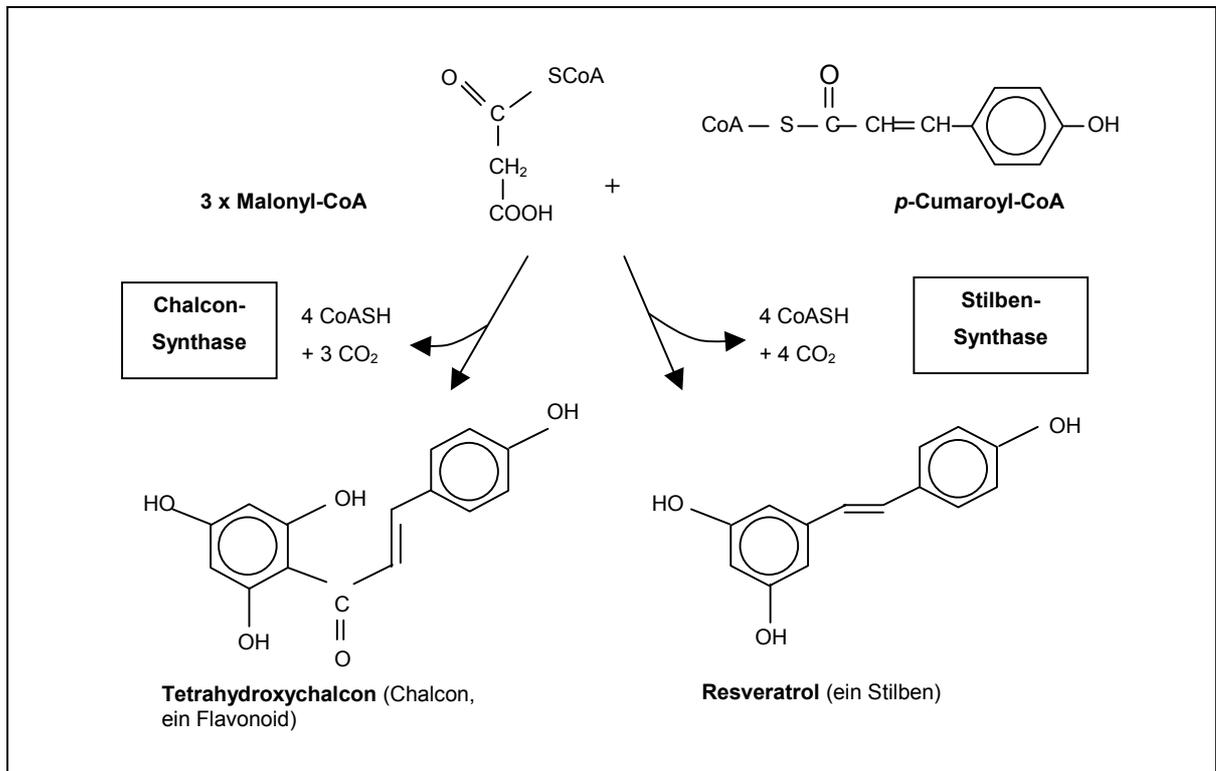
Ihre Rolle als Resistenzfaktoren wurde durch Charakterisierung verschiedener Pathogen-Pflanzen Interaktionen bewiesen, die zeigten, dass eine Korrelation zwischen der Phytoalexinproduktion bzw. deren Fehlen und einer Resistenz bzw. einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Pathogenen besteht (DERCKX & CREASY 1989, THOMMA et al. 1999).

Die Akkumulation der Phytoalexine vollzieht sich lokal nach der Pathogeninfektion (LISWIDOWATI et al. 1991, JEANDET et al. 1995) bzw. korreliert positiv mit der Stärke der Infektion. Sie lässt sich aber auch durch andere Stressfaktoren wie UV-Licht oder Verwundung induzieren (LANGCAKE & PRYCE 1976, ROMERO-PÉREZ et al. 2001, JEANDET et al. 1993, JEANDET et al. 1995, SCHÖPPNER & KINDL 1979).

Phytoalexine umfassen eine große Anzahl sehr unterschiedlicher Stoffklassen, die eine antibiotische Wirkung gegen ein breites Spektrum pathogener Pilze und Bakterien besitzen. Dazu gehören vor allem Isoprenoide, Flavonoide und Stilbene (HELDT 1996).

#### **1.3.1.1 Phytoalexine vom Stilbentyp**

Das wohl am häufigsten vorkommende Stilben ist das Resveratrol, das in einigen, nicht miteinander verwandten Pflanzenspezies wie der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), der Erdnuss (*Arachnis hypogaea*), im Klee (*Trifolium* L.) und im Knöterich (*Polygonum cuspidatum*) synthetisiert wird (LANGCAKE & PRYCE 1976; INGHAM 1976, ARACHI et al. 1982). Das für die Resveratrolsynthese verantwortliche Schlüsselenzym ist die Stilbensynthase. Sie katalysiert schrittweise die Kondensation eines Moleküls p-Cumaroyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA unter Decarboxylierung und Abspaltung von CoA (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1 : Vergleich der Enzymreaktionen, die durch die Chalcon- und Stilbensynthase katalysiert werden (nach HELDT 1996).** Die Ausgangssubstrate zur Synthese des Chalcons und des Stilbens sind p-Cumaroyl-CoA und drei Einheiten Malonyl-CoA.

Die beiden Ausgangssubstrate werden auch von der Chalconsynthase, die im Phenylpropanstoffwechsel an der Flavonoid-Biosynthese beteiligt ist, als Substrate genutzt, wodurch sie ubiquitär im Pflanzenreich vertreten sind. Durch diese Tatsache stellen die Stilbensynthasegene einen erfolgversprechenden Ansatz für die molekulare Pflanzenzüchtung dar. Allein der Transfer eines Stilbensynthase-Gens ist für die Biosynthese des neuen Phytoalexins Resveratrol in einem heterologen System ausreichend. HAIN et al. (1990) bewiesen dies erstmals, als sie nach dem Transfer eines Stilbensynthasegens aus Erdnuss (*Arachis hypogaea*) in Tabak die Resveratrol-Produktion nachwiesen. Dass durch die heterologe Expression von Resveratrol eine erhöhte Pilzresistenz erreicht werden kann, konnte ebenfalls erstmals durch HAIN et al. (1993) gezeigt werden. Transgene Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*), in die das Stilbensynthasegen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) übertragen wurde, zeigten durch die Resveratrolsynthese eine erhöhte Resistenz gegen *Botrytis cinerea*.

Seitdem rückte die Stilbensynthese mehr und mehr ins Blickfeld der molekularen Pflanzenzüchtung. Bereits mehrfach wurde unter Anwendung gentechnologischer Methoden die Stilbensynthese in heterologe Systeme transferiert, um die Abwehr zu intensivieren und das Resistenzniveau der transgenen Pflanzen gegenüber phytopathogenen Pilzen zu erhöhen.

STARK-LORENZEN et al. (1997) transferierten die Stilbensynthese in Reis (*Oryza sativa* L.) und konnten zeigen, dass der Stilbensynthese-Promotor auch in Monokotylen aktiv ist. Erste Ergebnisse wiesen auf eine erhöhte Resistenz der des transgenen Reises gegenüber *Pyricularia oryzae* hin. LECKBAND & LÖRZ (1998) exprimierten die Stilbensynthese in Gerste und Weizen, um eine gesteigerte Resistenz gegen fungale Krankheitserreger zu erzielen. LIANG et al. (2000) transferierten die Stilbensynthese ebenfalls in Weizen und konnten so teilweise die Resistenz der Pflanzen gegenüber Mehltau erhöhen.

In transgenen Luzerne Pflanzen (*Medicago sativa*), die konstitutiv das Gen für die Resveratrolsynthese aus der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) exprimierten, führte das nachgewiesene Resveratrol-Glycosid zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Pilz *Phoma medicaginis* (HIPSKIND & PAIVA 2000). Die Überexpression eines chimären Stilbensynthese-Gens in transgenem Wein reduzierte die Symptomausprägung nach einer *Botrytis cinerea* Infektion (COUTOS-THÉVENOT et al. 2001).

In diesem Zusammenhang darf ein wichtiger Aspekt nicht unerwähnt bleiben. Neben der antifungalen Wirkung in Pflanzen tritt mehr und mehr auch die positive Wirkung von Resveratrol auf die menschliche Gesundheit ins Blickfeld des Interesses. Vermehrt erschienen Berichte über die kardioprotektive Wirkung von Resveratrol. Dieses auch als „Französisches Paradoxon“ bekannte Phänomen führt das z.T. verhältnismäßig seltene Auftreten von Herzerkrankungen bei bestimmten Bevölkerungen auf den hohen Rotweinkonsum der jeweiligen Gruppen zurück. Hierbei werden hemmende Effekte auf die Thrombozytenaggregation (BERTELLI et al. 1995) und die Peroxidation des *Low Density Lipoproteins* postuliert. Eine krebsvorbeugende Wirkung von Resveratrol wird ebenfalls angenommen (NAKAGAWA et al. 2001). So inhibiert Resveratrol u.a die Expression von Genen und die Aktivität von Proteinen, denen eine Rolle bei der Tumorgenese zugeschrieben wird (SUBBARAMAIAH et al. 1998, MANNA et al. 2000).

Diese gesundheitsfördernde Wirkung von Resveratrol veranlasste CANTOS et al. (2001) die Induktion der endogenen Stilbensynthese in Weintrauben durch UV-Bestrahlung zu optimieren, um einen möglichst hohen Resveratrolgehalt in diesem Nahrungsmittel

verfügbar zu machen. In diesem Kontext gewinnt die Übertragung von Stilbensynthasegenen in Pflanzen neben dem Aspekt der Resistenzverbesserung eine ganz neue Bedeutung in Hinblick auf die Ernährung und die menschliche Gesundheit.

### 1.3.1.2 Polygalacturonase-inhibierende Proteine (PGIP)

Entscheidend bei der Pathogen-Pflanze-Interaktion ist die Invasion des pflanzlichen Gewebes durch das Pathogen. Pilzliche Pathogene wie z.B. *Botrytis cinerea* degradieren bei der Penetration pflanzlichen Gewebes Zellwände und Mittellamellen u.a. durch Endo- oder Exopolygalacturonasen (JOHNSTON & WILLIAMSON 1992) und mazerieren so das Gewebe.

Im Pflanzenreich weit verbreitet, wenn nicht sogar ubiquitär, ist die Bildung zellwandassoziiertes (JOHNSTON et al. 1994; YAO et al. 1995a, POWELL et al. 2000) Polygalacturonase-inhibierender Proteine (PGIP). Ihnen wird auf Grund ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit pilzlichen Polygalacturonasen (PG) eine bedeutende Rolle in der Pflanzenabwehr gegen phytopathogene Pilze zugeschrieben.

Die limitierende Wirkung der PGIPs auf die pilzliche Kolonisierung basiert zu einem auf ihrer Aktivität als Inhibitoren und Regulatoren der PGs, zum anderen auf ihrer Fähigkeit, die Akkumulation elicitor-aktiver Oligogalacturonide, die von den PGs aus der Zellwand freigesetzt werden, zu begünstigen und so weitere Abwehrreaktionen in der Pflanze zu induzieren (DE LORENZO et al. 2001). Die PGIPs weisen in ihrer Struktur starke Ähnlichkeiten zu bisher charakterisierten Produkten von Resistenzgenen auf. So findet sich z.B. das Strukturmotiv leucin-reicher Wiederholungen. Dieses für die Protein-Protein-Interaktion verantwortliche Strukturmotiv spielt durch seine Fähigkeit der spezifischen Erkennung eine relevante Rolle sowohl in der Entwicklung als auch in der Abwehr der Pflanzen.

Ein inhibierender Effekt verschiedener PGIPs auf fungale Polygalacturonasen wurde bereits durch *in vitro* Tests festgestellt (YAO et al. 1995a, MÜLLER & GESSLER 1993, JAMES & DUBERY 2001) und korrelierte auch mit Ergebnissen aus *in vivo* Systemen.

NUSS et al. 1996 stellten eine deutliche Korrelation zwischen der Resistenz von *Phaseolus vulgaris* gegenüber *Colletotrichum lindemuthianum* und einer erhöhten Produktion von PGIP im Vergleich zu einer anfälligen Sorte fest. Eine 20-fach erhöhte Akkumulation von PGIP korrelierte mit dem Auftreten einer hypersensitiven Reaktion bei der inkompatiblen Interaktion, während eine verzögerte und lediglich 8-fach ansteigende PGIP-Synthese zur

Ausprägung von Läsionen in der kompatiblen Interaktion führte. Die erhöhte Resistenz unreifer Früchte der Himbeere (*Rubus idaeus* L.) gegenüber *Botrytis cinerea* ging einher mit einer verstärkten PGIP-Expression.

Polygalacturonase-inhibierende Proteine verschiedener Spezies wie z.B. Apfel (YAO et al. 1995a und YAO et al. 1999), Tomate (STOTZ et al. 1994), Himbeere (WILLIAMSON et al. 1993, RAMANATHAN et al. 1997), Bohne (BERGMANN et al. 1994, DEVOTO et al. 1997, DEVOTO et al. 1998, DESIDERIO et al. 1997, TOUBART et al. 1992, CERVONE et al. 1990), Soja (FAVARON et al. 1994), Kiwi (SIMPSON et al. 1995) und Birne (STOTZ et al. 1993) wurden bisher charakterisiert und z.T. kloniert. Sie teilen auf molekularer Ebene mehrere Charakteristika, wie ein Signalpeptid zur Translokation in das Endoplasmatische Reticulum. Das reife Polypeptid hat eine Größe zwischen 300-315 Aminosäuren mit mehreren Glykosilierungssequenzen (DE LORENZO et al. 2001) und ist charakterisiert durch ein sich wiederholendes Sequenz-Motiv aus Modifikationen eines 24-Aminosäuren großen, leucinreichem Peptids. Die meisten der bisher untersuchten PGIP-Gene sind Teil einer Genfamilie innerhalb der Spezies und sind, bis auf wenige Ausnahmen wie z.B. ein PGIP-Gen aus Himbeere, nicht durch ein Intron unterbrochen.

Die PGIP-Expression kann temporär, gewebe- und entwicklungspezifisch erfolgen. In Birne (ABU-GOUKH & LABAVITCH 1983), Apfel (YAO et al. 1999) und Himbeere (JOHNSTON et al. 1993) ist der PGIP-Gehalt in unreifen Früchten im Vergleich zu reifen Früchten erhöht.

Die PGIP Expression wird oftmals auch durch Stress-Stimuli induziert. Die Behandlung einer *P. vulgaris* Zellsuspension mit Elicitoren pflanzlichen oder pilzlichen Ursprungs führten zur Akkumulation von PGIP (BERGMANN et al. 1994), ebenso eine Verwundung sowie eine Behandlung mit Salicylsäure. Die Akkumulation vollzieht sich vornehmlich angrenzend von Verwundungsstellen bzw. Inokulumstellen (BERGMANN et al. 1994); so wurden auch beim Apfel hohe PGIP-Transkriptionslevels angrenzend an Verletzungen und Inokulationsstellen von *Penicillium expansum* und *Botrytis cinerea* detektiert (YAO et al. 1999).

PGIPs unterschiedlicher Pflanzen-Spezies und ebenso verschiedene PGIPs einer Pflanzenspezies weisen unterschiedliche Spezifitäten auf. Sie differieren in ihrer inhibierenden Aktivität gegenüber PGs verschiedener Pilze (DESIDERIO et al. 1997; LECKIE et al. 1999), aber auch gegenüber unterschiedlicher PGs eines Pilzes (YAO et al. 1995a). So konnten YAO et al. (1995) zeigen, dass ein Frucht-spezifisches PGIP aus Apfel vier

verschiedene PGs von *Botrytis cinerea* unterschiedlich stark inhibierte. Ein aus *Phaseolus vulgaris* isoliertes PGIP war nicht in der Lage mit einem PG aus *Fusarium moniliforme* zu interagieren, jedoch mit PGs aus *Aspergillus niger* (DESIDERIO et al. 1997; LECKIE et al. 1999), während ein anderes, ebenfalls aus *Phaseolus vulgaris* stammendes PGIP, mit beiden interagiert. PGIPs einer Pflanzenspezies inhibieren auch PGs von Pilzen, denen sie in der Evolution nicht ausgesetzt waren (BERGER et al. 2000). Das Erkennungsvermögen der PGIPs ist jedoch sehr spezifisch gegen PGs fungaler Herkunft gerichtet, sie sind ineffektiv gegenüber bakteriellen oder pflanzlichen pektolytischen Enzymen (CERVONE et al. 1990).

Die Spezifität der PGIPs ist in leichten Variationen der Aminosäure-Sequenz (ASS) begründet (LECKIE et al. 1999, STOTZ et al. 2000). So differierten zwei Bohnen PGIPs in ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit PG aus *Fusarium moniliforme* und *Aspergillus niger*, weil sich die ASS in 8 Aminosäuren in der  $\beta$ -strand/ $\beta$ -turn Region der *leucin-rich repeats* (LRR) unterschied. Beim gegenseitigen Austausch der ASS wurde eine Umkehr der Spezifität erreicht (LECKI et al. 2000).

Die Bedeutung der Polygalacturonase-inhibierenden Proteine für die angewandte Gentechnik liegt in ihrem Potenzial zur Resistenzverbesserung der Pflanzen gegenüber fungalen Schaderregern. Auf Grund der unterschiedlichen Spezifitäten verschiedener PGIPs lässt sich durch Überexpression eventuell das Resistenzniveau verbessern. POWELL et al. (2000) konnten bereits durch die heterologe Expression eines Birnen PGIP in der Tomate die Anfälligkeit gegenüber *Botrytis cinerea* verringern. Die Ausprägung der Läsionen und die damit verbundene Mazerierung des Gewebes wurde durch die PGIP-Expression um 25% reduziert.

## 1.4 Konzeption der vorliegenden Arbeit

Die Erhöhung der Resistenz ist eines der Hauptziele in der klassischen Apfelzüchtung. In der Anwendung gentechnischer Methoden liegt das Potenzial, durch den Transfer monogen kontrollierter Faktoren das Repertoire der Abwehrmechanismen des Rezipienten gezielt zu erweitern. Die Erweiterung des Phytoalexinspektrums durch die Expression der Stilbensynthase und der damit verbundenen Synthese von Resveratrol oder die Überexpression eines heterologen PGIPs in Apfel stellen aufgrund des allgemeinen Wirkungsprinzips eine gute Alternative zu den spezifischen Resistenzgenen dar.

Der zugänglichen internationalen Literatur und den Datenbanken konnte nichts über die Existenz einer Stilbensynthese in *Malus* entnommen werden. Die Expression einer Stilbensynthese in Apfel (*Malus x domestica*) und die damit verbundene Synthese eines neuen Phytoalexins wird durch die Tatsache interessant, dass viele Pathogene ihre Virulenz speziellen Phytoalexin-detoxifizierenden Mechanismen verdanken (GOETZ et al. 1999). Die Konfrontation eines Pathogens mit einem neuen, unbekanntem Phytoalexin könnte somit in der Resistenz einer Wirtspflanze resultieren. Polyphenole, zu denen auch das Resveratrol zählt, spielen im Allgemeinen bei der Resistenz von Apfel gegenüber *Venturia inaequalis* eine entscheidende Rolle (MAYR et al. 1997, PICINELLI et al. 1995).

Gene für PGIPs finden sich zwar auch im Apfelgenom, dennoch erscheint die heterologe Expression eines neuartigen PGIP-Gens auf Grund der unterschiedlichen Spezifitäten als interessant, um die Pathogenabwehr positiv zu beeinflussen.

Das Ziel der Arbeit bestand daher darin, die Grundlagen zu schaffen, um das Potenzial solcher breit wirkender antifungaler Prinzipien zur Verbesserung der Pilzresistenz von Apfel evaluieren zu können. Dazu sollten transgene Prototypen agronomisch bedeutender Apfelsorten entwickelt werden, die die Stilbensynthese aus *Vitis vinifera* L. sowie das PGIP-Gen aus Kiwi (*Actinidia deliciosa*) exprimieren. Als Objekte für die vorliegende Arbeit wurden die Apfelsorten *Elstar*, *Gloster*, *Holsteiner Cox* und *Boskoop* ausgewählt, die besonders für Norddeutschland von großer wirtschaftlicher Bedeutung sind.

Es sollten zunächst sterile *in vitro* Kulturen etabliert werden, um genetisch identisches Ausgangsmaterial in uneingeschränktem Maße zur Verfügung zu haben. Voraussetzung für die Anwendung des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers war zunächst die Anpassung der sehr genotypspezifischen Regenerationssysteme (HANKE & FISCHER 1994) an die verwendeten Sorten. Im Anschluss sollten von mindestens einer der Sorten jeweils eine Linie mit dem Stilbensynthesegen und eine Linie dem PGIP Gen aus Kiwi entwickelt werden. Diese sollten eingehend bezüglich der Integration und Expression der Gene molekular charakterisiert werden.

Auf Grund des interdisziplinären Charakters der Aufgabenstellung war die Arbeit eine enge Kooperation zwischen dem Lehrgebiet Molekulargenetik und dem Institut für Obst- und Gemüsebau der Universität Hannover.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Autoklav	Tuttnauer, Systec 5075 ELV
Brutschränke	Memmert, Modell 400; Sanyo, Incubator MIR-153
Digitalkameras	Zeiss, AxioCam und Canon PowerShot Pro70
Fluorometer	BioRad
Gelapparatur	BioRad
Geldokumentation	Intas
Hybridisierungsöfen	H. Saur Laborbedarf
Kamera	Pentax
Makroskop	Wild M420
Mikroskop	Zeiss, Axioplan und Axioplan 2
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000
Schüttler	B. Braun, Certomat M
Sterilwerkbank	Kojair
Thermocycler	Biometra, T3
Transilluminator	Vilber Lourmat
Waagen	Sartorius, Handy und 3705
Zentrifugen	Eppendorf 5415C; Kendro Megafuge 1.0R; Sigma 302

#### 2.1.2 Materialien

Filter	Millipore
Plankton Zählkammer	Hydro-Bios, Kiel
Perligran G	Deutsche Perlite GmbH, Dortmund
Cellophanfolie	Cellophan 325P; Pütz GmbH+Co Folien KG
Röntgenfilme	Kodak
Nylonmembran	Boehringer Mannheim
Plastikverbrauchsmaterial	Roth, Greiner, Kitzel

### 2.1.3 Reagenzien

2iP	Duchefa
6-Benzylaminopurin	Duchefa
Acetosyringon	Roth
Agar	Sigma
Benzimidazol	Fluka
Bitek Agar	Difco
Chloroform	Roth
Combactam	Pfizer
CTAB	Roth
D(+)-Saccharose	Roth
DIG Easy Hyb	Roche
DIG Mix	Roche
EDTA	Roth
Ethanol (98%)	CG-Chemikalien und Roth
GA <sub>3</sub>	Duchefa
Gelrite	Roth
Glucose	Duchefa
Glufosinat-ammonium PESTANAL <sup>®</sup>	Riedel-de Haën
Gluthation	Duchefa
Glycerin	Duchefa
Hefeextrakt	Roth
8-Hydroxyquinoline	Duchefa
IBA	Duchefa
Isolamylalkohol	Roth
Kanamycinsulfat	Duchefa
Maleinsäure	Sigma
Methanol	Roth
Methylenblau	Sigma
Murashige & Skoog Medium (Makro- und Mikrosalze incl. Vitamine) (mod. van der Salm)	Duchefa
Myo-inositol	Duchefa
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma
NAA	Sigma
NaF	Sigma
NaOAc	Roth
NaOCl	Roth
NaOH	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Pepton aus Casein	Roth

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Roth
Plant Agar	Duchefa
Potato Dextrose Agar	Difco
PVP 40	Sigma
Resveratrol	Sigma
RNase	Quiagen
Saccharose	Roth
SDS	Roth
Sorbitol	Duchefa
Thidiazuron	Duchefa
Ticarcillin	Duchefa
Tris-HCl	Roth
Tween 20	Sigma

Spezielle Chemikalien, Enzyme, kits:

Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	Roche
<i>Bam</i> H1	MBI Fermentas
<i>Eco</i> R1	Fermentas
<i>Sac</i> 1	MBI Fermentas
Red Taq	Sigma
Taq Polymerase	Genecraft
CDPstar	Roche
MMLV-RT	Promega
RNasin	Promega
Extract-N-Amp <sup>TM</sup> Plant PCR	Sigma
Rneasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit	Quiagen
Fluorescent DNA Quantitation Kit	BioRad
Anti DIG-AP-Konjugat	Roche

Sonstiges:

Pflanzen-Substrat: TKS I und TKS II	Floragard, Vertriebs GmbH f. Gartenbau
Wuxal <sup>®</sup>	Aglukon, Spezialdüber GmbH

## 2.1.4 Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden Reiser, sterile *in vitro* Kulturen sowie *ex vitro* Kulturen der Apfelsorten *Elstar*, *Holsteiner Cox* (Typ *Esselborn*), *Gloster* und *Boskoop* (Typ *Schmitz Hübsch* und Typ *Herr*) verwendet. *In vitro* Kulturen der Sorte *Elstar* wurden freundlicherweise von Frau Dipl.-Ing. A. Urbanietz, Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Ahrensburg, zur Verfügung gestellt, die der anderen Sorten wurden aus Freilandmaterial wie unter 2.2.2 beschrieben, etabliert.

## 2.1.5 Bakterienstämme

### 2.1.5.1 *Escherichia coli*

NM522: *supE44 thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM) 5 (rK<sup>-</sup>mK<sup>+</sup>) F<sup>'</sup>[*proAB lacI<sup>q</sup>* ZΔM15]*.

Dieser Stamm wurde zur Vermehrung des Plasmides pHK<sub>vst</sub> verwendet.

### 2.1.5.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Für den *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transfer des Stilbensynthasegens und des PGIP-Gens wurde der Stamm EHA105 (HOOD ET AL. 1993) verwendet. EHA105 ist ein entwaffnetes Derivat des super-virulenten *Agrobacterium tumefaciens*-Stamms A281 und enthält das Helferplasmid pEHA105 (abgeleitet vom Wildtyp Ti-Plasmid pTiBo542) in einem C58 chromosomalen Hintergrund.

## 2.1.6 Pflanzenpathogene

### 2.1.6.1 Mehltau (*Podosphaera leucotricha* [Ell. et Ev.] Salm)

Die Einsporisolate B11 und FGDT6 von *Podosphaera leucotricha* wurden von Frau Dipl. Ing. A. Urbanietz, BAZ Ahrensburg zur Verfügung gestellt. Der Pilz gehört zu den Schlauchpilzen (Ascomyzeten) und ist ein obligater Parasit, der ausschließlich auf lebendes Gewebe angewiesen ist.

### 2.1.6.2 Apfelschorf (*Venturia inaequalis*)

Versuche mit dem Apfelschorferreger *Venturia inaequalis* wurden mit dem Isolat 15 durchgeführt. Das Isolat wurde von Frau Dipl. Ing. K. Schulze (Institut für Gemüse- und Obstbau, Abteilung Obstbau der Universität Hannover) aus Läsionen von *Elstar* isoliert (SCHULZE 2000) und zur Verfügung gestellt. Der Pilz gehört zu den Ascomyzeten.

## 2.1.7 Nukleinsäuren

### 2.1.7.1 Oligonukleotide

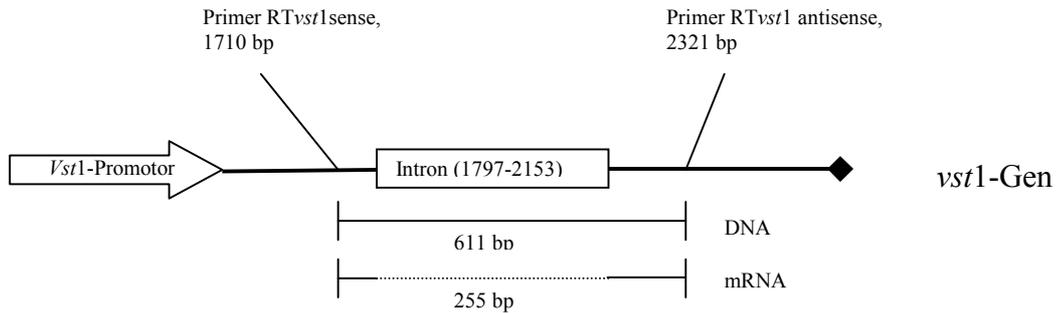
Als Primer für die PCR-Analysen wurden Oligonukleotide der Firma Roth verwendet. Folgende Primersequenzen wurden für den Nachweis verschiedener Gensequenzen verwendet:

**Tab. 2.1: Sequenzen der Primerpaare zum Nachweis verschiedener Gensequenzen.**

Zielgen	Name	Primersequenz	Produkt-Größe
Stilbensynthasegen aus <i>Vitis vinifera</i> L.	RTvst sense	5'-TCTACCAGTCTGATTATGCTGA-3'	611 bp (DNA)
	RTvst antisense	5'-TCTTTAAGAGCCTTCAATGC-3'	255 bp (mRNA)
PGIP-Gen aus <i>Actinidia deliciosa</i>	PGIP 31	5'-GAGTACTACTGCCATTTCCC-3'	655 bp
	PGIP 686	5'-GCGAGACATCAATCACTGTG-3'	
Agrobakteriengenom	PicA1	5'-ATGCGCATGAGGCTCGTCTTCGAG-3'	550 bp
	PicA2	5'-GACGCAACGCATCCTCGATCAGCT-3'	
<i>bar</i> -Gen aus <i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>	<i>bar</i> sense	5'-GCAGGAACCGCAGGAGTGGA-3'	264 bp
	<i>bar</i> antisense	5'-AGCCCGATGACAGCGACCAC-3'	
Kanamycinresistenzgen <i>aphIII</i>	Kan/bin 999	5'-AAGATTATACCGAGGTATG-3'	267 bp
	Kan/bin 1266	5'-CATTAGTCCATGCAAGTTT-3'	

### 2.1.7.2 Zur Transformation eingesetzte Gene

*Vst1*-Gen aus *Vitis vinifera* L.: Das Genkonstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. Hain, Bayer AG, zur Verfügung gestellt. Das *vst1*-Gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) codiert für die Stilbensynthase. Das Enzym ist verantwortlich für die Synthese von Resveratrol aus den Substraten p-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA. Das zur Transformation eingesetzte Gen steht unter der Kontrolle des eigenen wund-, UV- und elicitorinduzierbaren *vst1*-Promotors. Der kodierende Bereich des Gens ist durch ein Intron (1797-2153 bp) unterbrochen (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Genarchitektur des *vst1*-Gens mit Primerbindestellen.

PGIP-Gen aus Kiwi: Das PGIP-Gen aus Kiwi (*Actinidia deliciosa*) codiert für ein Polygalacturonase-inhibierendes Protein (SIMPSON et al. 1995). Das Genkonstrukt wurde freundlicherweise vom *Scottish Crop Research Institute* (SCRI) zur Verfügung gestellt.

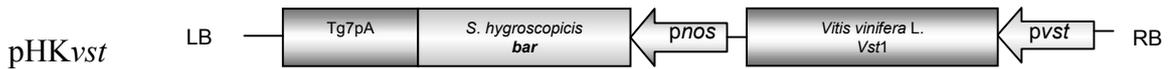
bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*: Das *bar*-Gen (THOMPSON et al. 1987) wurde als selektives Markergen eingesetzt. Das Selektionssystem basiert auf der Wirkung von Phosphinotricin (auch bekannt als „Glufosinat“), dem aktiven Agens des Totalherbizids Liberty®. Das Herbizid ist ein Strukturanalogon der Aminosäure Glutaminsäure und wird zunächst kompetitiv und dann irreversibel am Substratbindeort der Glutaminsynthetase gebunden (HOCK et al. 1995, S. 170). Bei dem Ausfall des Enzyms häuft sich giftiges Ammoniak in der Pflanzenzelle an und führt zum Absterben der Zelle. Das *bar*-Gen codiert für die Phosphinotricinacetyltransferase. Dieses Enzym führt durch Acetylierung zur chemischen Inaktivierung von PPT, welches dann nicht mehr die Glutaminsäure von der Glutaminsynthetase verdrängen kann.

### 2.1.7.3 Binäre Vektoren

pHK*vst* (Abb. 2.2): Das Plasmid wurde von Dr. H. Kiesecker hergestellt (KIESECKER 1999). Es basiert auf dem Vektor pGPTV (BECKER ET AL. 1992), ein Derivat des pBIN19. pHK*vst* enthält zwischen der linken und rechten Bordersequenz der T-DNA das Stilbensynthasegen1 (*vst1*) aus *Vitis vinifera* L. unter der Kontrolle des eigenen *vst1*-Promotors sowie das *bar* Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*, reguliert durch den *nos*-Promotor.

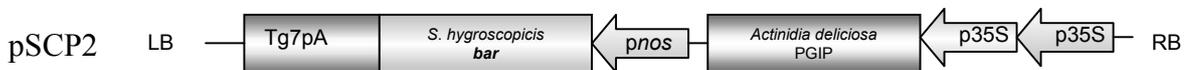
Ausserhalb der T-DNA ist das *aphAIII* (=nptIII) Gen lokalisiert. Es stammt aus *Enterococcus faecalis* und codiert für eine Amino-glycosid-3`-Phosphotransferase des Typs III, die eine Resistenz gegen Kanamycin, Neomycin, Amikacin und weiteren Substanzen dieser Klasse verleiht.

Die Größe des Plasmids beträgt 15 353 bp.



**Abb. 2.2:** Für die Apfeltransformation verwendete Plasmide: T-DNA von pHKvst.

pSCP2 (Abb. 2.3): pSCP2 wurde freundlicherweise vom *Scottish Crop Research Institute* (SCRI) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid basiert ebenfalls auf dem Vektor pGPTV (s.o.). Die T-DNA (Abb. 2.3) enthält das PGIP-Gen (Polygalacturonase-inhibierende Proteine) aus Kiwi (*Actinidia deliciosa*) unter der Kontrolle des konstitutiven doppelten 35S Promotors, und das selektierbare Markergen *bar*, ebenfalls reguliert durch einen konstitutiven Promotor (*nos*). Das Plasmid hat eine Größe von 12 747 bp.



**Abb. 2.3:** T-DNA des Vektors pSCP2.

#### 2.1.7.4 DNA-Längenstandard

Im molekularbiologischen Teil der vorliegenden Arbeit wurden folgende DNA-Längenstandards eingesetzt:

- 100bp+ Leiter von Fa. MBI Fermentas mit DNA-Fragmenten der Größe:  
3000 bp/2000 bp/1500 bp/1200 bp/1031 bp/900 bp/ 800 bp/700 bp/600 bp/500 bp/400 bp/ 300 bp/  
200 bp/100 bp.
- DNA *Molecular Weight Marker II, DIG Labeled* der Fa. Roche mit DNA-Fragmenten der Größe:  
23 130 bp/9416 bp/6557 bp/4361 bp/2322 bp/2027 bp/564 bp und 125 bp.

Vor der Verwendung wurden 6 µl des Markers mit 14 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 5 µl 6 x Probenpuffer (2.2.9.4) versetzt.

## 2.1.8 Medien

### 2.1.8.1 Bakterienmedien

YEP-Medium wurde für die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* bei 28°C eingesetzt:

Hefeextrakt	1,0% (w/v)
Pepton oder Trypton	1,0% (w/v)
NaCl	0,5% (w/v)

Zur Selektion erfolgte eine Zugabe von 50 mg/l Kanamycin.

LB-Medium wurde für die Anzucht von *E.coli*-Bakterien bei 37°C verwendet:

Hefeextrakt	0,5% (w/v)
Pepton oder Trypton	1,0% (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)

### 2.1.8.2 Basismedium für die Pflanzenkultur

Als Basismedium für die pflanzliche *in vitro* Gewebekultur wurde, wenn nicht anders angegeben, das Medium nach MURASHIGE & SKOOG (1962) verwendet, auch wenn dies nicht den Originalmedien einiger Publikationen entsprach. Es wurde als Fertigmischung von der Firma Duchefa bezogen.

In der „Van der Salm Modifikation“ des Murashige & Skoog Mediums (Duchefa) wurde FeNaEDTA durch FeEDDHA (96 mg/l) als Eisenquelle ersetzt.

Die spezielle Zusammensetzung der Medien für die verschiedenen Anwendungen ist den entsprechenden Kapiteln der Methoden zu entnehmen.

## 2.1.9 Selektives Agens

Zur Selektion transgener Zellen wurde das Totalherbizid Glufosinat-Ammonium (Liberty<sup>®</sup>) der Fa. Riedel-de Haën eingesetzt. Der herbizide Wirkstoff ist das L-Isomer Phosphinotricin (PPT) (HOCK et al. 1995, S.170). In der vorliegenden Arbeit werden beide Begriffe synonym verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Sterilisation

Sämtliche Arbeiten an *in vitro* Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank (*Laminar Air Flow*) durchgeführt. Alle Arbeitsmaterialien, Kulturmedien und Reagenzien wurden je nach Beschaffenheit vor ihrer Verwendung autoklaviert, sterilfiltriert oder abgeflammt. Thermolabile Substanzen wie Antibiotika und einige Hormone (Herstellerangaben) wurden sterilfiltriert (Millipore-Filter; Porengröße 0,22 µm) und nach dem Autoklavieren den handwarmen Medien zugefügt.

### 2.2.2 Etablierung steriler Sprosskulturen

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung steriler *in vitro* Kulturen wurden Reiser der Apfelsorten *Holsteiner Cox* Typ *Esselborn*, *Boskoop* Typ *Schmitz Hübsch* bzw. Typ *Herr* und *Gloster* verwendet, die vom Pflanzenschutzamt in Hannover und vom Institut für Gemüse- und Obstbau der Universität Hannover aus dem Versuchsgebiet in Ruthe zur Verfügung gestellt wurden. In Abhängigkeit von der Jahreszeit wurden entweder noch geschlossene Winterknospen oder junge Frühjahrsaustriebe als Ausgangsmaterial verwendet.

Die Winterreiser wurden zunächst in Nodalsegmente zerteilt und der unten genannten Sterilisation unterzogen. Die noch geschlossenen Winterknospen hatten eine Größe von 1-2 mm und bestanden aus einem Meristem, das von einigen Blattprimordien umhüllt war. Diese wurden weitestgehend entfernt und das freigelegte Meristem wurde auf das Medium aufgelegt.

Bei den Frühjahrsreisern wurden nur die jungen, unverholzten Austriebe verwendet. Nach Entfernung der Blätter wurden auch diese zerkleinert, pro Stück eine Achselknospe.

Die Sterilisation erfolgte wie folgt: ca. 1 h unter fließendem Wasser, 1 min in 70% Ethanol, 15 min in 3% bzw. 10% NaOCl. Das Ethanol sowie das NaOCl enthielten einige Tropfen Tween 20 um eine vollständige Oberflächenbenetzung zu erreichen. Das NaOCl wurde durch 3-maliges Waschen mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> entfernt.

Bei den Achselknospen der Frühjahrsaustriebe wurden die durch das NaOCl geschädigten Schnittkanten nochmals entfernt. Die Reiserstücke wurden wie ein Y in das Medium

gesteckt. Die Kultur erfolgte in den ersten Tagen in 24-Well-Platten, die eine separate Kultur ermöglichen. Kontaminationen und Verbräunungen blieben so auf die jeweils betroffenen Explantate beschränkt. Die spätere Kultur erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben; zur Inkulturnahme wurde entweder das Medium mod. nach PERALES ET AL. (1993), dessen Bestandteile aus Tab. 2.3 hervorgehen, oder das Präparationsmedium nach SRISKANDARAJAH et al. (1990), Tab. 2.2, verwendet.

**Tab. 2.2: Medium für die Inkulturnahme der Apfelpflanzen.**

Medienbestandteile	Präparationsmedium mod. nach Sriskandarajah et al. (1990)
MS Salze incl. Vitamine [g/l]	4,4
Sorbitol [%]	3
Myoinositol [g/l]	0,1
BAP [ $\mu$ M]	4,4
2iP [ $\mu$ M]	14,7
NAA [ $\mu$ M]	0,5
Bitek Agar [%]	0,8
pH	5,6-5,8

#### Methoden zur Verminderung der Verbräunung:

Zur Verminderung der durch Oxidation von Polyphenolen verursachten Verbräunung wurden verschiedene Methoden angewendet:

- Überschichtung der Explantate mit 8-Hydroxy-quinolinol-sulfate (LAIMER DA CÂMARO MACHADO et al. 1991)
- Dippen der Explantate in Gluthation (NOMURA et al. 1998)
- Zusatz von 2% PVP zum Kulturmedium (CHRISTIANSEN & FONNESBECH 1975)
- Häufiges Umsetzen der Explantate auf frisches Medium bei beginnender Verbräunung (mündliche Mitteilung von A. Urbanietz).

### **2.2.3 Kulturführung und Mikropropagation**

Die Kultur der etablierten Sprosse erfolgte bei einer Temperatur von  $25\pm 1^\circ\text{C}$  und einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8h. Sämtliche Sprosskulturen wurden im 4-Wochen-

Rhythmus subkultiviert, indem die Sprosse vereinzelt und auf frisches Medium überführt wurden. Die verwendeten Medien zur Mikropropagation sind Tabelle 2.3 zu entnehmen.

**Tab. 2.3: Vermehrungsmedien für die *in vitro* Kulturen.**

	C1	Perales- Vermehrungsmedium	Puite & Shaart Vermehrungsmedium (1996)
MS Salze incl. Vitamine [g/l]	4,4	4,4	-
MS Salze incl. Vitamine [g/l] Mod. Van der Salm	-	-	4,4
Saccharose [%]	3	3	3
Myoinositol [g/l]	0,1	0,1	0,1
BAP [ $\mu$ M]	4,4	3,1	3,1
IBA [ $\mu$ M]	0,5	-	-
NAA [ $\mu$ M]	-	0,5	-
GA <sub>3</sub> [ $\mu$ M]	-	2,8	-
Plant Agar [%]	0,8	0,8	0,8
pH	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8
<i>Elstar</i>		X	X
<i>Holsteiner Cox</i>	X		
<i>Gloster</i>		X	
<i>Boskoop</i>	X		

## 2.2.4 Regeneration aus Blattmaterial

### 2.2.4.1 Versuchsaufbau und -auswertung

Zur Entwicklung, Etablierung und Optimierung der Regeneration aus Blattmaterial der Sorten *Elstar*, *Holsteiner Cox*, *Gloster* und *Boskoop* wurden verschiedene Medien hinsichtlich ihrer Effektivität zur Sprossinduktion getestet. Die Explantate wurden von den vier jüngsten, völlig entfalteteten Blättern 4-Wochen alter unbewurzelter *in vitro* Sprosse gewonnen. Die Petiole und der Apex der Blätter wurden entfernt, sodass ein Blattstück mit zwei Schnittkanten übrig blieb. Die Blätter wurden mit der Oberseite auf das Medium aufgelegt und zunächst zwei Wochen in völliger Dunkelheit bei 25°C, im Anschluss bei der gleichen Temperatur im Licht-Dunkel-Rhythmus von 16/8h kultiviert. Nach einer 6-wöchigen Phase auf Induktionsmedium (Tab. 2.4) wurden die Explantate für weitere 2-3 Wochen auf Elongationsmedium (Tab. 2.5) überführt. Im Laufe des gesamten Versuches wurde das Medium im 2-Wochen-Rhythmus gewechselt, um eine optimale Versorgung des

Gewebes zu gewährleisten. Die Auswertung erfolgte zwischen der achten und neunten Woche nach Kulturbeginn. Folgende Kriterien wurden zur Beurteilung der Regenerationseffektivität herangezogen:

- Regenerationsrate, d.h. die Anzahl der Explantate, die Sprossregeneration zeigten. Die Angaben erfolgten in Prozent.
- Anzahl der Sprosse pro Explantat. Es wurde die durchschnittliche Anzahl ermittelt, wobei in der Berechnung nur die Explantate berücksichtigt wurden, die Sprossregeneration zeigten. Es wurden also keine Nullwerte einbezogen.

### 2.2.4.2 Medien

**Tab. 2.4: Regenerationsmedien zur Sprossinduktion an Blattexplantaten.**

Medienbestandteile	TDZ-Reihe mit NAA	TDZ-Reihe mit IBA	Grafe & Wricke (1998) mod. Mit NaOrth.	Grafe & Wricke (1998) mod. mit NaF	Puite & Shaart (1996)	DeBondt et al. (1994)
MS Salze incl. Vitamine	4,4 g/l	4,4 g/l	4,4 g/l	4,4 g/l	4,4 g/l	4,4 g/l
Sorbitol	3% (w/v)	3% (w/v)	-	-	3% (w/v)	-
Saccharose	-	-	3% (w/v)	3% (w/v)	-	2% (w/v)
Myoinositol	0,1 g/l	0,1 g/l	-	-	-	0,1 g/l
TDZ	3, 5, 7, 10, 15, 20 und 25 µM	1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 und 25 µM	0,9 µM	0,9 µM	24,9 µM	22,7 µM
2iP	-	-	-	-	-	9,8 µM
NAA	0,5 µM	-	-	-	0,5 µM	-
IBA	-	1 µM	0,5 µM	0,5 µM	-	1,2 µM
GA <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	0,28 µM
Natriumfluorid	-	-	-	100 µM	-	-
Natriumorthovanadate	-	-	75 µM	-	-	-
Plant Agar	-	-	1,1% (w/v)	1,1% (w/v)	-	-
Gelrite	0,3% (w/v)	0,3% (w/v)	-	-	-	0,25% (w/v)
pH-Wert	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8
<i>Elstar</i>	X		X	X	x	x
<i>Holsteiner Cox</i>		X				
<i>Gloster</i>		X				
<i>Boskoop</i>		X				

**Tab. 2.5: Zusammensetzung des Elongationsmediums.**

Medienbestandteile	Elongationsmedium mod. nach Puite & Shaart (1996)
MS Salze incl. Vitamine [g/l]	4,4
Saccharose [%]	3
BAP [ $\mu$ M]	4,4
GA <sub>3</sub> [ $\mu$ M]	0,28
Plant Agar [%]	0,8
pH	5,6-5,8

### 2.2.5 Bewurzelung

Zur Ermittlung eines optimalen Bewurzelungsmediums wurden verschiedene Medien mit unterschiedlichen Auxinen (NAA und IBA) und Auxinkonzentrationen getestet (Tab. 2.6 und 2.7). Vier-Wochen alte *in vitro* Sprosse wurden vereinzelt, auf die Bewurzelungsmedien überführt und nach vierwöchiger Kultur auf dem jeweiligen Medium bonitiert. Die Effektivität der Medien zur Wurzelinduktion wurde unter Berücksichtigung folgender Kriterien beurteilt: Anzahl der Wurzeln und durchschnittliche Länge der gebildeten Wurzeln. Diese Parameter wurden als Boniturklassen zusammen gefasst, in die jeder Spross eingeordnet wurde.

Die Zusammensetzungen der verschiedenen Bewurzelungsmedien sind den Tabellen 2.6 und 2.7 zu entnehmen.

**Tab. 2.6: Basismedium für die Bewurzelung.**

Medienbestandteile	Basismedium für die Bewurzelung
MS Salze incl. Vitamine [g/l]	4,4
Myoinositol [g/l]	0,1
Saccharose [%]	3
Plant Agar [%]	0,7
pH-Wert	5,8

**Tab. 2.7: Verwendete Auxine und deren Konzentrationen zur Wurzelinduktion.**

Auxin	B0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
NAA [ $\mu$ M]	-	0,75	1,5	3	6	9	12	-	-	-	-	-	-
IBA [ $\mu$ M]	-	-	-	-	-	-	-	0,75	1,5	3	6	9	12

In die Bewurzelungsversuche der Sorte *Elstar* wurde ein nach PUITE & SHAART (1996) modifiziertes Medium zusätzlich in die Untersuchungen einbezogen. Es enthielt MS-Salze incl. Vitamine, 3% Saccharose, 7,3  $\mu\text{M}$  IBA und 0,6% Plant Agar.

## **2.2.6 Akklimatisierung/ Kultur im Gewächshaus**

Die Akklimatisierung der Pflanzen an *ex vitro* Bedingungen erfolgte nach der Bewurzelungsphase. Die Sprosse wurden nach Säuberung der Wurzeln mit Wasser in TKSII-Substrat überführt. Das Substrat wurde ca. 3:1 mit Perligran G<sup>®</sup> gemischt, einem Hilfsstoff aus Perlit, der durch das Luftporenverhältnis den Luft- und Wasserhaushalt des Substrates reguliert. Durch eine vorläufige Abdeckung der Pflanzen mit einer Plastiktüte oder Plastikabdeckungen wurde zunächst eine hohe Luftfeuchtigkeit gewährleistet, die nach und nach durch Steigerung der Luftzufuhr reduziert wurde, bis die Pflanzen vollkommen akklimatisiert waren. Im späteren Verlauf der Gewächshauskultur wurden die Pflanzen in TKSII-Substrat (3:1 gemischt mit Perligran G<sup>®</sup>) überführt. Die Kultur der akklimatisierten Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei einem 16/8h Licht-Dunkelrhythmus. Eine ausreichende Nährstoffversorgung der Pflanzen wurde durch regelmäßiges Düngen mit 2‰ Wuxal<sup>®</sup> gewährleistet.

## **2.2.7 Pflanzentransformation**

### **2.2.7.1 Kultur, Anzucht und Aufreinigung der Agrobakterien für die Pflanzentransformation**

Eine langfristige Lagerung der Agrobakterien erfolgte in Form von Glycerinstocks (850  $\mu\text{l}$  Bakterien + 150  $\mu\text{l}$  Glycerin) bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Für die Transformationen wurden ÜNK verwendet. 25 ml YEP-Medium wurden mit 250  $\mu\text{l}$  Bakterien inokuliert. Die Bakterien des Stammes EHA105 tragen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin auf den binären Plasmiden, sodass dieses Antibiotikum in einer Konzentration von 50 mg/l zur Selektion bei der Anzucht verwendet wurde. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln (240 rpm), bei einer Temperatur von  $28^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Zur Aufreinigung der Bakterien wurde eine Zentrifugation (12 min, 3600 x g) durchgeführt. Das Pellet wurde anschließend in MS-Medium resuspendiert und auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,8 eingestellt. Diese Suspension wurde für die Transformation eingesetzt. Zur Aktivierung der *vir*-Region der Agrobakterien wurde 100  $\mu\text{M}$  Acetosyringon eingesetzt.

### 2.2.7.2 Transformationsmethode

Die Transformation der Apfelpflanzen erfolgte nach der „Blattstreifen Methode“ durch Kokultivierung mit *Agrobacterium tumefaciens*. Es wurden jeweils die 4 jüngsten, völlig entfalteten Blätter vier-Wochen alter *in vitro* Sprosse verwendet. Die Blätter wurden in Streifen geschnitten; Apex und Petiole wurden verworfen. Die Explantate wurden zunächst in MS-Medium gesammelt, anschließend wurde dieses durch die Agrobakterien-Suspension ersetzt (2.2.7.1). Die Explantate wurden unter leichtem Schütteln für 10 min in der Bakteriensuspension inkubiert.

Nach kurzem Abtrocknen auf sterilem Filterpapier wurden die Explantate mit der adaxialen Seite auf das Regenerationsmedium aufgelegt und für 3 Tage im Dunkeln bei 25°C mit den Agrobakterien kokultiviert. Zur Eliminierung der Agrobakterien nach der Cokultur wurden die Explantate zunächst 2 x 15 min in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, anschließend für weitere 15 min in hormonfreiem flüssigen MS-Medium mit 150 mg/l Ticarcillin unter Schütteln gewaschen.

### 2.2.8 Selektion und Regeneration transgener Pflanzen

Die Regeneration der transformierten Explantate erfolgte wie unter 2.2.4. angegeben. Ein erneutes Auswachsen der Agrobakterien während der Kulturphase wurde durch den Zusatz von Antibiotika verhindert. Zu Beginn der Arbeit wurde 300 mg/l Cefotaxim eingesetzt, im späteren Verlauf wurden Ticarcillin (direkt nach Cokultur 150 mg/l, im Laufe der weiteren Kultur Erniedrigung auf 100 mg/l) und Combactam (50 mg/l) verwendet. Diese Kombination wurde gewählt, da es sich bei dem Antibiotikum Ticarcillin um ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum handelt, dessen Wirkungsweise durch Inhibierung der bakteriellen Zellwandsynthese gekennzeichnet ist. Um eine Inaktivierung des Antibiotikums durch  $\beta$ -Lactamasen zu vermeiden, wurde zusätzlich der  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor Combactam, dessen aktive Substanz die Clavulansäure ist, eingesetzt.

Desweiteren wurde zur Unterdrückung des Agrobakterienwachstums eine Kombination aus 50 mg/l Ticarcillin und 0,2% PPM<sup>TM</sup> (Plant Preservative Mixture) getestet.

Bei einigen transgenen Kulturen wurden im späteren Verlauf der *in vitro* Kultur komplett auf den Einsatz von Antibiotika verzichtet.

Bei der Selektion der transgenen Zellen nach der Transformation wurden zwei unterschiedliche Strategien der Selektion verfolgt: Zum Einen wurde das selektive Agens

direkt nach der Cokultur appliziert, wobei die Konzentration von PPT kontinuierlich auf eine Konzentration von 10 mg/l gesteigert wurde; andererseits wurden zunächst Sprosse ohne Selektionsdruck regeneriert und im Anschluss der Selektion unterworfen. Auch hier wurden steigenden Konzentrationen bis zu einer Höchstmenge von 10 mg/l PPT, oder aber direkt 10 mg/l verwendet. Die Mikropropagation und Bewurzelung der transgenen Pflanzen erfolgte unter kontinuierlichem Selektionsdruck mit 10 mg/l PPT.

## 2.2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.9.1 Isolation von Nukleinsäuren

#### 2.2.9.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Plasmide als Positiv-Kontrolle für die PCR und die Southern Blot Analysen wurden mit der Minipräparationsmethode aus *E.coli* isoliert.

2 ml einer Bakterien ÜNK (37°C, 200 rpm) wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 8050 x g pelletiert und in 200 µl Lösung A resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit wurde der Ansatz mit 400 µl Lösung B und 300 µl Lösung C gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Durch zweimaliges Zentrifugieren (10 min, 8050 x g) wurden Zellreste sedimentiert. 800 µl des Überstandes wurden zur Präzipitation der DNA mit 600 µl Isopropanol versetzt. Die DNA wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt pelletiert und in 200 µl Lösung D resuspendiert. Die durch Zugabe von 400 µl EtOH<sub>abs.</sub> erneut gefällte DNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation (8050 x g) sedimentiert, anschließend getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (+1 mg/ml RNase) oder 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### Lösung A

Tris HCl pH 8,0	15 mM
EDTA	10 mM
Glucose	50 mM

#### Lösung B

NaOH	0,2 M
SDS	1%

#### Lösung C

NaOAc 4,8	3 M
-----------	-----

#### Lösung D

NaOAc pH 7	0,1 M
TrisHCl pH 8,0	0,05 M

### 2.2.9.1.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen

Zur Isolation der Gesamt-DNA aus Pflanzen wurde das DNA-Isolationsverfahren nach DOYLE & DOYLE (1990) angewendet. Ungefähr 1 g Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das so entstandene Pulver wurde in 10 ml CTAB-Puffer, welcher zuvor im Wasserbad auf ca. 65°C erwärmt wurde, aufgenommen und anschließend für 30 min bei 65°C inkubiert. Zur Extraktion wurde gleiches Volumen an CI-Mix hinzugefügt, kurz kräftig geschüttelt und anschließend für 10 min bei (3500 x g) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Falcon Tube überführt und ggf. erneut mit CI-Mix aufgereinigt. Die DNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 2/3 Volumenanteil eiskaltem Isopropanol. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 3500 x g wurde das Pellet mit Waschpuffer gewaschen. Zur Entfernung verbliebener RNA wurde das Pellet in 3 ml TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac erfolgte die zweite Fällung durch Zugabe von 7,5 ml EtOH. Nach Pelletierung der DNA wurde sie getrocknet und in TE oder Tris Puffer aufgenommen und kurzfristig bei -20°C bzw. langfristig bei -80°C gelagert.

#### Lösungen und Puffer für die DNA-Isolation:

<u>CTAB-Puffer</u>		<u>Wasch-Puffer</u>	
CTAB	3%	EtOH-abs.	76% (v/v)
NaCl	1,4 M	Ammoniumacetat	10 mM
β-MercaptoEtOH	0,2%		
EDTA	20 mM		
Tris-HCl pH 8,0	100 mM	<u>TE-Puffer (+RNase)</u>	
PVP (soluble)	0,5%	Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
		EDTA	1 mM
		(RNase)	50µg/ml)
CTAB und Mercaptoethanol wurden nach dem Autoklavieren hinzugefügt			

#### 24:1 CI-Mix

Chloroform	23 ml
Iso-amylalkohol	1 ml

### 2.2.9.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Die Isolation von Gesamt-RNA aus den Apfelpflanzen erfolgte mit dem RNeasy® Plant-Mini Kit der Firma Quiagen laut Angaben des Herstellers.

### 2.2.9.2 cDNA-Synthese

Um die RNA mit Hilfe der PCR untersuchen zu können, wurden aus den mRNAs der Probe der Gesamt-RNA cDNAs generiert. Dazu wurden 5 µg der isolierten RNA mit 100

pmol Oligo dT-Primern versetzt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 13 µl gebracht. Nach einer 10-minütigen Erwärmung bei 70°C wurden die Proben mit jeweils 4 µl des 5-fachen RT-Puffers (Promega), 1 µl RNAsin ([Promega] zur Inhibierung von RNAsen) und 10 mM dNTPs versetzt und für 1 min bei 37°C erwärmt. Die reverse Transkription erfolgte durch Zugabe von 1 µl der RNA-abhängigen DNA Polymerase MMLV-RT (Promega) innerhalb 1 h bei 37°C.

### 2.2.9.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 2.2.9.3.1 Fluorimetrische Bestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit dem *Fluorescent DNA Quantitation Kit* der Firma BioRad. Die Methode beruht auf der spezifischen Bindung des Farbstoffes Hoechst 33258 (Bisbenzimid) an AT-reiche Regionen und einer damit verbundenen Veränderung der Fluoreszenz.

Die Messung der DNA-Konzentration wurde wie folgt durchgeführt:

- 1000 ng Kalbsthymus-DNA wurden zur Kalibrierung des Fluorometers verwendet.
- Eine Messküvette wurde mit 2 ml der Farbstofflösung und 1 oder 2 µl der zu analysierenden DNA gefüllt. Die Lösungen wurden gemischt und am Fluorometer gemessen.

#### 2.2.9.3.2 Photometrische Messung

Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm. Es besteht folgende Korrelation zwischen optischer Dichte (OD) und RNA-Konzentration:

$$\text{RNA-Konzentration} = (\text{OD}_{260} \cdot V_f \cdot 40) \text{ ng/ml}$$

Zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Lösung wurde gleichzeitig die OD bei  $\lambda = 280$  nm gemessen. Für reine RNA gilt:  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \approx 1,9-2,0$ .

#### **2.2.9.4 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung der DNA erfolgte durch eine Horizontal-Elektrophorese in einem 1-2%igen Agarosegel (w/v in 1 x TAE-Puffer). Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen in einem Mikrowellengerät gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 50°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger ausgegossen. In die noch flüssige Agarose wurde ein Probenaschenkamm eingesteckt. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit 1/6 6xProbenpuffer versetzt, anschließend unter TAE-Puffer in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 4,5-6 V pro cm Elektrodenabstand durchgeführt.

Zur Ermittlung der Fragmentgrößen wurden 4-6 µl des 100bp+ DNA-Längenmarkers verwendet. Die DNA wurde durch UV-Anregung und der dadurch entstehenden Fluoreszenz des in die DNA interkalierten EtBr sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Videoprinters dokumentiert.

##### TAE-Puffer (50x):

40 mM Tris-Ac pH 7,5  
20 mM Eisessig  
1 mM EDTA

##### 6x Probenpuffer

25% (w/v) Ficoll 40  
50 mM EDTA  
0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylen-Cyanol FF

#### **2.2.9.5 Methoden der PCR**

##### **2.2.9.5.1 PCR mit isolierter DNA**

Jeweils 1 µl isolierte DNA wurden in einem 25 µl PCR-Ansatz verwendet. Die Menge der eingesetzten Substanzen sowie die Amplifikationsbedingungen für die verschiedenen Targetsequenzen sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

**Tab. 2.8: Eingesetzte Substanzen für die PCR.**

Konzentration	Volumen pro Ansatz [ $\mu$ l]	
	<i>Taq</i>	<i>Red Taq</i>
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	17,37	17,5
Puffer 10x	2,5	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1	-
5 mM dNTP	1	1
15 pM Primer A	1	1
15 pM Primer B	1	1
Taq	0,13	1

**Tab. 2.9: Bedingungen für die Amplifikation spezifischer Fragmente des *vstI*-Gens, des *bar*-Gens und des *aphIII*-Gens.**

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	60	
Denaturierung	94	45	30x
Annealing	60	45	
Elongation	72	45	
Elongation nach dem letzten Zyklus	72	300	
Endtemperatur	4	-	

**Tab. 2.10: Amplifikationsbedingungen der PGIP-PCR.**

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	300	
Denaturierung	94	90	30 x
Annealing	56	90	
Elongation	72	90	
Elongation nach dem letzten Zyklus	72	300	
Endtemperatur	4	-	

### 2.2.9.5.2 PCR mit denaturierten Agrobakterien

Als Positiv-Kontrolle zum Nachweis Agrobakterien-spezifischer DNA wurde 1 ml des Glycerinstocks oder einer ÜNK von *Agrobacterium tumefaciens* für 5 min auf 95°C erhitzt. Davon wurde 1µl als *Template* in der PCR eingesetzt. Die Amplifikation eines spezifischen Fragments der Agrobakterien-DNA mit Hilfe der Primer picA1 und picA2 wurde unter den in Tab. 2.11 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

**Tab 2.11: PCR-Bedingungen zur Amplifikation eines spezifischen Fragments der Agrobakterien DNA.**

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	120	
Denaturierung	94	90	30x
Annealing	63	90	
Elongation	72	90	
Elongation nach dem letzten Zyklus	72	300	
Endtemperatur	4	-	

### 2.2.9.5.3 PCR mit Pflanzengewebe

Bei der in Anlehnung an BERTHOMIEU & MEYER (1991) durchgeführten Methode wurde als DNA-*Template* für die PCR ein Gewebestück der zu untersuchenden Pflanze eingesetzt. Mit einer gelben Pipettenspitze wurde ein Blattstück herausgestanzt und direkt dem PCR-Ansatz zugefügt. Die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen entsprachen den Angaben in Tabelle 2.8. Die Reaktionsbedingungen sind Tabelle 2.12 zu entnehmen.

**Tab. 2.12: Reaktionsbedingungen der „Leaf disc“ PCR.**

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	30	
Denaturierung	94	90	40x
Annealing	60	90	
Elongation	72	90	
Elongation nach dem letzten Zyklus	72	300	
Endtemperatur	4	-	

#### **2.2.9.5.4 PCR mit Extract-N-Amp™ Plant PCR Kit von Firma Sigma**

Die Probenentnahme und -aufbereitung erfolgte laut Angaben des Herstellers. Zum Nachweis spezifischer Genfragmente wurden die jeweiligen Programme (s.o.) angewendet.

#### **2.2.9.5.5 Reverse Transkriptase (RT)-PCR**

Die Transkription der Transgene wurde mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Hierzu wurde zunächst Gesamt-RNA isoliert (2.2.9.1.3). Die mRNAs wurden anschließend einer cDNA-Synthese unterzogen (2.2.9.2). 1 µl der generierten cDNA wurde als *Template* in der PCR mit den entsprechenden Primern für den Nachweis der mRNA der Transgene eingesetzt.

Die PCR mit der cDNA erfolgte analog zur PCR isolierter DNA (2.2.9.5.1) unter den in Tab. 2.9 und 2.10 angegebenen Reaktionsbedingungen.

#### **2.2.9.6 Southern Blot-Analysen**

Zum Nachweis der Integration der Transgene in das Pflanzengenom, deren Kopienzahl und zur Differenzierung unterschiedlicher transgener Linien wurde der *Southern Blot* angewendet.

##### Enzymatischer Verdau und Fällung der Pflanzen-DNA

20 µg Gesamt-DNA wurden mit 20 units eines Enzyms, welches im zu untersuchenden Gen eine Schnittstelle besitzt, über Nacht bei 37°C verdaut. Zur Vervollständigung des Verdau wurden am nächsten Morgen erneut 20 units hinzugefügt. Nach einer Gesamtinkubationszeit von ca. 20 h bei 37°C wurden die Proben zunächst mit 100 µl 7,5M NH<sub>4</sub>-acetat versetzt; anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 750 µl EtOH ausgefällt und durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13600 x g pelletiert. Das Pellet wurde getrocknet und in TE-Puffer über Nacht gelöst.

##### Southern Transfer

Nach der Auftrennung der DNA im Agarosegel (2.2.9.4) wurde das Gel für 10 min in 0,25M HCl geschwenkt, anschließend jeweils 2 x 15 min in Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer auf einem Taumelwipptisch inkubiert. Der Transfer der DNA auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte wie nachfolgend beschrieben:

- über eine mit 20 x SSC gefüllte Schale wird eine Glasscheibe und ein umgedrehter großer Gelträger (oder ähnliches) gelegt. Eine Filterpapierbrücke wird über den Träger gespannt; beide Enden liegen im Puffer

- 2 Lagen Whatman-Papier, zuvor in 20 x SSC getränkt
- Agarosegel
- Nitrocellulosemembran, zuvor in  $H_2O_{\text{reinst}}$  und 20 x SSC equilibriert
- 2 Lagen Whatman-Papier in 20 x SSC equilibriert
- Unzählige Lagen Papierhandtücher
- Gewicht zum Beschweren.

0,25M HCl

HCl (1M)	250 ml
$H_2O_{\text{reinst}}$	750 ml

Denaturierungspuffer

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

Neutralisierungspuffer

Tris-HCl	0,5 M
NaCl	3 M

20 x SSC (pH 7,5)

NaCl	3 M
Na-citrat	0,3 M

Fixierung der DNA auf der Membran

Die DNA wurde durch 20-minütiges Backen bei 120°C auf der Membran fixiert. Anschließend wurde die Membran zur Hybridisierung und Detektion verwendet.

Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst mit *DIG-Easy-Hyb* der Firma Roche für 2h bei 42°C prähybridisiert. Die Sondenlösung (2.2.9.6.1) wurde bei ca. 65°C denaturiert und zur Hybridisierung zur Membran hinzugefügt und ÜN bei 42°C inkubiert. Die Membran wurde wie folgt gewaschen:

- 2 x 5 min mit 2 x SSC bei 42°C
- 1 x 15 min mit 0,5 x SSC bei 68°C
- 1 x 15 min mit 0,1 x SSC bei 68°C

2 x SSC, 0,5 x SSC und 0,1 x SSC wurden durch entsprechende Verdünnungen aus 20 x SSC hergestellt und mit 10% SDS versetzt.

Detektion

Die DNA auf der Membran wurde wie folgt detektiert:

- kurze Inkubation der Membran in Maleinsäurepuffer
- 30-minütige bis einstündige Inkubation in Blocking-Reagenz auf einem Taumelwipptisch
- Inkubation der Membran in Antikörper-Konjugat-Lösung (1:20000 Verdünnung des Anti-DIG-AP-Konjugates in Blocking-Reagenz) unter Schütteln
- Spülung der Membran mit Waschpuffer, anschließend 2 x 15 min waschen mit Waschpuffer zur Entfernung überschüssigen Antikörpers
- Kurzzeitige Inkubation der Membran in Detektionspuffer
- 5 µl CDP<sub>star</sub> in 500 µl DEA lösen
- Austropfen der CDP<sub>star</sub>-Lösung auf Plastikfolie; Überführung der Membran auf die Tropfen
- Verteilung der Flüssigkeit auf der Membran, anschließend Entfernung überschüssiger Lösung
- Exposition der in der Plastikfolie befindlichen Membran auf einen Film für 10-30 min.

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M

Blocking-Lösung

1% Blocking-Lösung der Firma Roche  
(verdünnt mit Maleinsäurepuffer)

Waschpuffer

Maleinsäurepuffer	
Tween 20	3 ml/l

Detektionspuffer

Tris-base	0,1 M
NaCl	0,1 M

DEA

DEA	0,1 M
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Stripping der Membran

Wenn die Membran erneut zur Hybridisierung verwendet werden sollte, wurde die Sonde durch folgende Waschschrte entfernt:

- 3 x waschen mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub>
- 2 x 10 min waschen mit Stripping Puffer bei 37°C
- 1 x spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub>
- Aufbewahrung in 2 x SSC (s.o.) ohne SDS bei 4°C bis zur nächsten Hybridisierung.

#### Stripping Puffer

NaOH	0,2 M
SDS	0,1%

### 2.2.9.6.1 Herstellung DIG-markierter Sonden

Die Herstellung der DIG-markierten *vst1*- und PGIP-Sonde erfolgte mit den in Tab. 2.13 aufgelisteten Substanzen unter Einsatz der Primerpaare, die auch für die PCR-Analysen eingesetzt wurden (Tab. 2.1).

**Tab. 2.13: Reaktionsgemisch zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde.**

	Sonde	Kontrolle
H <sub>2</sub> O	38,24 µl	17,37 µl
10x Puffer Klentherm	5 µl	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 µl	1 µl
dNTPs 5 mM	0,25 µl	1 µl
Primer A	2 µl	1 µl
Primer B	2 µl	1 µl
Plasmid pHK <sub>vst</sub>	1 µl	1 µl
DIG-Mix	1,25 µl	-
Taq (Klentherm)	0,26 µl	0,13 µl

Die Markierung erfolgte mit Hilfe einer PCR bei folgenden Reaktionsbedingungen:

**Tab. 2.14: PCR-Bedingungen für die Herstellung einer DIG-markierten Sonde.**

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94	120	
Denaturierung	94	60	30x
Annealing	58	60	
Elongation	72	60	
Elongation nach dem letzten Zyklus	72	300	
Endtemperatur	4	-	

Um den Erfolg der Markierung zu testen, wurden jeweils 5 µl der Reaktionsansätze nach Zugabe von 2 µl Loadingbuffer auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Die Sonde ist im Vergleich zur Kontrolle durch die DIG-Markierung größer und läßt sich daher im Gel von der Kontrolle differenzieren. Der restliche Ansatz wurde in ca. 35 ml *DIG Easy Hyb* gelöst.

## **2.2.10 Nachweis von Resveratrol in Pflanzen mit der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)**

### **2.2.10.1 Extraktion des Resveratrols aus *in vitro* Sprossmaterial**

Die Induktion des *vst1*-Promotors erfolgte durch 5 minütige UV-Bestrahlung der zu untersuchenden Pflanzen. Kulturgefäße mit den Sprossen wurden dazu geöffnet kopfüber auf einem UV-Tisch plaziert. Nach ca. 24 h wurde das Pflanzenmaterial durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Nach Zugabe von MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20) wurden die Homogenate für 2 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die festen Teile zunächst durch einen Zentrifugationsschritt (20 min bei 6200 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde zur restlosen Entfernung von Festteilen filtriert (0,22 µm). Sämtliche Schritte wurden unter höchst möglichem Lichtschutz durchgeführt, da *trans*-Resveratrol bei Belichtung in seine *cis*-Form übergeht.

Die Proben wurden wie oben dargelegt in Hannover aufbereitet und anschließend auf Trockeneis zur weiteren Analyse zu Priv. Doz. Dr. K. Briviba nach Karlsruhe gesandt.

### **2.2.10.2 Chromatographische Trennung des Resveratrols**

Die HPLC-Analysen wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. K. Briviba, Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe wie folgt durchgeführt:

Die polyphenolischen Verbindungen wurden an einer Nova-Pak-C18 Säule (4 µm, 4,6 x 250 mm; Waters) getrennt. Die Analyse erfolgte mit einem Photodioden-Detektor (Shimadzu) bei 320 nm und einem binären Gradienten. Dazu wurden die Proben 1:1 mit der mobilen Phase der HPLC (Lösung A [4/4/92 CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>CN/1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O (v/v/v)]) verdünnt und für 10 min bei 14000 x g zentrifugiert. Zur HPLC Analyse wurden 100 µl eingespritzt. Der Gradienten Zyklus bestand aus einer 15-minütigen isokratischen Anfangsphase (100% Lösung A), gefolgt von einem kontinuierlichen Gradienten der

Lösung B (100% CH<sub>3</sub>CN) auf 11% nach 25 min und 14% nach 32 min. Zwischen 32 min und 40 min wurden die Konzentrationen bei 86% Lösung A und 14% Lösung B gehalten. Anschließend wurde Lösung B progressiv auf 20% erhöht bis 50 min und schließlich wieder auf 0% reduziert. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten sowie der UV-Spektren mit den Standardlösungen.

### 2.2.10.3 Saure Hydrolyse

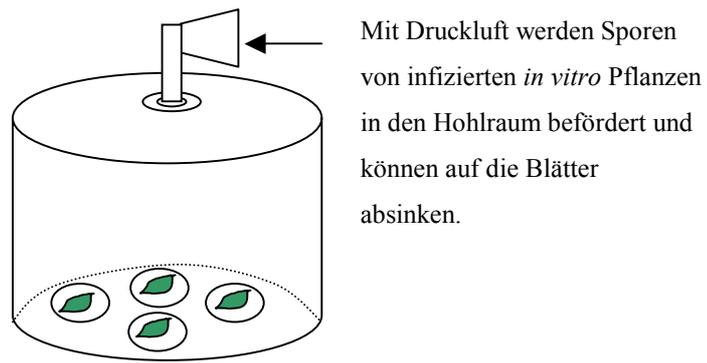
Zur Durchführung einer sauren Hydrolyse wurden 100 µl der bereits aufgearbeiteten Proben mit 800 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl HCl (32%) gemischt. Nach 2h Inkubation bei 70°C wurden 100 µl entnommen und mit 400 µl Fließmittel versetzt. Zur HPLC Analyse wurden 100 µl eingespritzt.

Die entstandenen Chromatogramme wurden von Priv. Doz. Dr. K. Briviba freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

## 2.2.11 Apfelpathogene

### 2.2.11.1 Mehltau (*Podosphaera leucotricha* [Ell. et Ev.] Salm)

Um das Resistenzniveau der transgenen Apfelpflanzen gegenüber Apfelpathogenen im Vergleich zu nicht transformierten Kontrollpflanzen zu überprüfen, wurden gezielte Infektionen mit Mehltau durchgeführt. Die Infektionen mit *Podosphaera leucotricha* wurden in Kooperation mit der BAZ in Ahrensburg durchgeführt. Für die Inokulation der transgenen *Holsteiner Cox* und *Elstar* Pflanzen sowie der Kontrollpflanzen wurden die Einsporisolate B11 und FGDT7 verwendet. Der den Apfelmehltau verursachende Pilz ist als obligater Parasit ausschließlich auf lebendes Gewebe angewiesen. Die Konidien wurden daher durch Druckluft von infizierten *in vitro* Pflanzen auf die zu infizierenden Blätter übertragen. Die Blätter befanden sich dabei auf einem fungizidhaltigem Agar in offenen Petrischalen. Diese wurden mit einer Inokulationshaube bedeckt, sodass die Konidien, die mit Druckluft durch eine ausgesparte Öffnung in dem Hohlraum des Behälters verteilt wurden, in dem begrenzten Raum auf die Blätter niedersinken konnten (Abb. 2.4).



**Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Mehltauinfektion.**

Zur Auszählung der Sporendichte wurde außerdem ein Objektträger neben die Petrischalen gelegt. Die Ermittlung der Sporendichte erfolgte durch Auszählung unter dem Mikroskop. Bei jeder Infektion wurden von drei Objektträgern jeweils zwölf Gesichtsfelder ausgezählt. Der höchste und der niedrigste Wert wurden bei der Errechnung des Mittelwertes nicht berücksichtigt. Durch das Verhältnis der Größe des Gesichtsfeldes und der Vergrößerung konnte auf die Konidiendichte pro mm<sup>2</sup> geschlossen werden.

Die Kultur erfolgte bei 20°C im 16/8 Hell/Dunkel-Rhythmus. Der Befallsgrad wurde durch die Untersuchung zweier Parameter bonitiert:

- Anzahl der Konidien pro Konidienträger fünf Tage nach der Infektion
- Prozentualer Anteil des Befalls pro Blatt nach neun Tagen anhand des folgenden Boniturschemas:

0	= keine Infektion
I	= bis zu 1 % der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt
II	= bis zu 10% der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt
III	= bis zu 30% der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt
IV	= 30-50% der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt
V	= über 50% der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt

Fungizid-Agar für Mehltauinfektion:

Sorbitol	3%
Benzimidazol	35 mg/l
Agar	0,8%

### 2.2.11.2 Apfelschorf (*Venturia inaequalis*)

#### 2.2.11.2.1 Kultur des Apfelschorfes

Die Kultur des Pilzes erfolgte als Mycelkultur entsprechend der Angaben von PARKER et al. (1995) auf PDA (Potato-dextrose Agar) bei einer Temperatur von 18°C im Dunkeln. Zur Erhaltung einer kontinuierlichen Kultur wurden in regelmäßigen Abständen Stücke des mit Mycel überwachsenen Agars auf frisches Medium überführt. Bei dieser Kulturform erfolgte lediglich Mycelwachstum.

#### PDA (Potato-Dextrose) Agar

PDA	39g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1000 ml

#### 2.2.11.2.2 Produktion von Konidien

Die Produktion der Konidien wurde gemäß der Methode von PARKER et al. (1995) durch Überführen eines Inokulums auf eine mit einer Cellophanfolie beschichtete PDA-Petrischale durchgeführt. Das Inokulum bestand aus Mycel von *Venturia inaequalis* (s.o.), das zerkleinert und in einem Volumen von 0,75 ml durch leichtes Schwenken der Petrischale gleichmäßig auf der Cellophanfolie verteilt wurde. Konidienwachstum wurde durch Inkubation bei 18°C im Dunkeln gewährleistet. Zur Gewinnung einer Sporensuspension wurde die nach ca. 1-3 Wochen dicht bewachsene Cellophanfolie abgezogen, in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> überführt und die Sporen durch kräftiges Schütteln von der Folie gelöst. Durch eine Filtration über dreilagiges miracloth<sup>®</sup> wurden die restlichen Cellophan- und Agarbestandteile sowie Mycelreste entfernt.

#### Ermittlung des Sporentiters

Für die Ermittlung des Sporentiters wurde eine Planktonzählkammer verwendet. Die dafür vorgesehene Vertiefung der Kammer wurde mit 500 µl der Sporensuspension gefüllt und mit einem Deckglas mit integriertem Zählgitter bedeckt. Nach 10 min waren die Sporen abgesunken und konnten unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Die Konzentration wurde nach einer Formel von A. Keller berechnet, wonach der Mittelwert pro Zählfeld multipliziert mit 769,2 die Anzahl der Sporen/ml ergibt.

### 2.2.11.2.3 Effekt von Resveratrol auf die Keimung von Apfelschorf-Sporen

Zur Untersuchung des Effektes des Phytoalexins Resveratrol auf die Keimung von Apfelschorfsporen wurden diese auf resveratrolhaltigem Wasseragar für einen Tag kultiviert und zur Auskeimung gebracht. Die Bewertung des Effektes von Resveratrol erfolgte durch Evaluierung der Keimrate (Anzahl der gekeimten Sporen).

Das Resveratrol wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Ethanol gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden Verdünnungen in einem EtOH/H<sub>2</sub>O Gemisch (50:50) hergestellt, so dass zur Erlangung der gewünschten finalen Konzentration die jeweiligen Resveratrolstammlösungen 1:10 in handwarmen, zuvor aufgekochten Wasseragar verdünnt werden konnten. Dem Kontrollmedium wurde die entsprechende Menge H<sub>2</sub>O bzw. die entsprechende Menge des Lösungsmittels zugesetzt, um den Einfluss des Lösungsmittels für Resveratrol (EtOH 50:50) in die Beurteilung der Wirkung des Resveratrols auf die Keimung miteinbeziehen zu können. Der Wasseragar hatte eine finale Konzentration von 2% und wurde im noch flüssigen Zustand in einem Volumen von 750 µl auf einen Objektträger geschichtet. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, wurde der Objektträger und ein ca. 2 cm<sup>2</sup> großes wassergetränktes Filterpapier in eine Petrischale überführt. Die *Venturia inaequalis*-Sporensuspension wurde mit 5% Methyleneblau versetzt, in 5 µl Tropfen auf den Agar getropft und im Dunkeln bei einer Temperatur von 20°C für einen Tag inkubiert. Zur Ermittlung der Keimrate wurden mit Hilfe des Mikroskops jeweils drei Tropfen ausgezählt und die gekeimten Sporen zu den nicht-gekeimten prozentual in Beziehung gesetzt.

#### Wasseragar

Agar (Sigma)	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1000 ml

## 2.2.12 Statistische Auswertung

Statische Untersuchungen wurden mit Hilfe einer 1-faktoriellen- bzw. 2-faktoriellen-Varianzanalyse unter Berücksichtigung der Normalverteilung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  durchgeführt. Zur Analyse der Mittelwertsunterschiede wurde der Tuckey-Test verwendet.

Bei nicht-signifikanten Unterschieden erfolgte die graphische Darstellung unter Angabe der Absolutwerte sowie der Standardabweichung. Bei Vorliegen einer Signifikanz wurden die Absolutwerte mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung steriler Sprosskulturen

Für die Durchführung der Regenerations- und Transformationsexperimente war homogenes, genetisch identisches und steriles Ausgangsmaterial erforderlich, um reproduzierbare und vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden daher zunächst *in vitro* Sprosse aus Achselknospen von Freilandmaterial etabliert und klonal propagiert.

Die Etablierungsversuche von *in vitro* Sprossen wurden zu jahreszeitlich unterschiedlichen Terminen durchgeführt. In der ersten Etablierungsphase standen Winterreiser der Sorten *Holsteiner Cox*, *Gloster*, *Elstar* und *Boskoop* zur Verfügung, bei denen zu diesem Zeitpunkt noch kein Knospenausbruch stattgefunden hatte. Die Verwendung dieses Materials zur Etablierung von *in vitro* Sprossen blieb weitestgehend erfolglos. So war es lediglich möglich, die Sorte *Holsteiner Cox* als *in vitro* Kultur zu etablieren und zu mikropropagieren. Die Überlebensrate, d.h. der prozentuale Anteil der eingesetzten Explantate aus denen Sprosse hervorgingen, betrug 4,3%. Die präparierten Knospen der Sorte *Elstar* und *Gloster* fielen aufgrund starker Verbräunung, mikrobieller Kontaminationen oder mangelnden Wachstums aus. Von der Sorte *Boskoop* Typ *Herr* überlebte lediglich ein Spross (0,6%), der allerdings nicht weiter zur Mikropropagation eingesetzt wurde.

Deutlich erfolgreicher gestaltete sich die Inkulturnahme von Nodalsegmenten junger, unverholzter Frühjahrsaustriebe. Zwar wurden auch hier hohe Ausfälle durch Verbräunung und mikrobielle Kontaminationen verzeichnet, dennoch wurden deutlich höhere Überlebensraten bei der Verwendung dieses Ausgangsmaterials erreicht. Von der Sorte *Boskoop* Typ *Schmitz Hübsch*\* zeigten 39,5% der eingesetzte Nodalsegmente Sprossentwicklung, von der Sorte *Gloster* 27%.

---

\* Die Ergebnisse der Etablierung der Sorte *Boskoop* repräsentieren die Ergebnisse der Sorte *Schmitz Hübsch*. Da diese im Verlauf der Arbeit aufgrund anderer Umstände vernichtet wurden, sind die folgenden Experimente (Regeneration) mit der danach etablierten Sorte *Boskoop* Typ *Herr* durchgeführt worden.

Der Einfluss der zwei verwendeten Medien zur Inkulturnahme sowie die Maßnahmen zur Verminderung der Verbräunung wie Überschichtung mit Chinolin, Dippen in Gluthation, Zusatz von PVP zum Medium und ständiges Umsetzen der Explantate lassen sich nicht abschließend beurteilen. Aufgrund hoher Ausfallraten durch Kontaminationen war der Stichprobenumfang zu gering, um diesbezüglich eine verlässliche Aussage zu treffen.



Abb. 3.1: Etablierte und mikropropagierte *in vitro* Sprosse der Apfelsorten *Holsteiner Cox*, *Elstar*, *Boskoop* und *Gloster*.

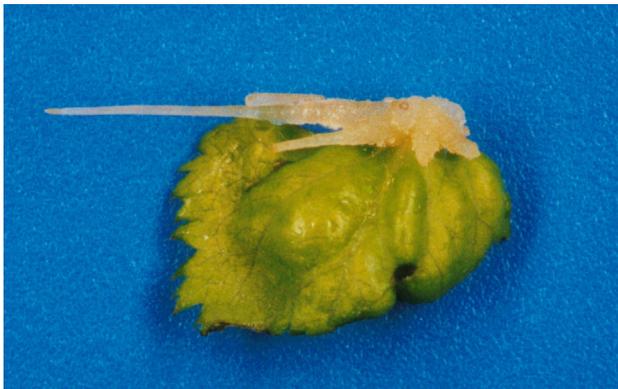
### 3.2 Regeneration aus Blattmaterial

Voraussetzung für Etablierung eines Transformationssystemes ist ein stabiles, effektives und reproduzierbares Regenerationssystem. Dieses wiederum erfordert homogenes Ausgangsmaterial, ein effektives Medium zur Sprossinduktion und optimale Kulturbedingungen, um eine möglichst hohe Regenerationsrate in einem angemessenen Zeitraum zu erzielen. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden verschiedene Medien hinsichtlich ihrer Eignung zur Sprossinduktion an somatischem Gewebe untersucht. Aufgrund des hohen morphogenetischen Potenzials wurden Blattexplantate der vier jüngsten Blätter vier-Wochen alter *in vitro* Sprosse als Ausgangsmaterial eingesetzt.

Der Einfluß von TDZ auf die Organogenese aus Blattmaterial der vier verwendeten Apfelsorten wurde durch eine Reihe mit steigenden TDZ-Konzentrationen quantifiziert; bei der Sorte *Elstar* im Vergleich zu bereits für diese Sorte publizierten Medien (GRAFE & WRICKE 1998, DE BONDT et al. 1994 und PUITE & SHAART 1996). Für die Sorte *Elstar* wurde als Basismedium der TDZ-Reihe das Medium nach PUITE & SHAART (1996) verwendet. Das Basismedium für die TDZ-Induktionsreihe der Sorten *Holsteiner Cox*, *Gloster* und *Boskoop* unterschied sich lediglich im Auxin und dessen Konzentration (Tab. 2.4).

Als Bewertungskriterien für die Effektivität eines Mediums wurden die Regenerationsrate sowie die Anzahl der Sprosse pro Explantat zugrunde gelegt. Auch die Qualität der regenerierten Sprosse wurde in die Bewertung mit einbezogen, jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht quantifiziert dargestellt.

Der völlige Verzicht von TDZ führte lediglich zur Wurzelbildung (Abb. 3.2), vornehmlich an der basalen Schnittkante. TDZ-freies Medium wurde daher nicht in die Optimierung der Sprossinduktion aus Blattmaterial einbezogen.



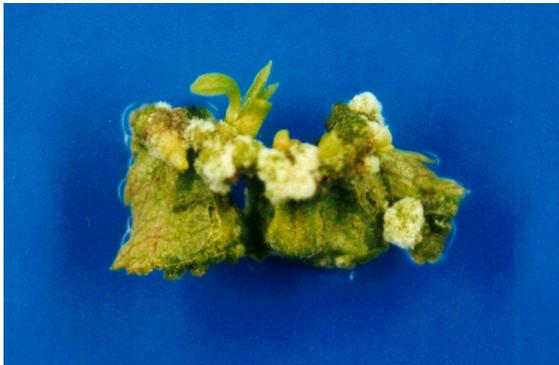
**Abb. 3.2: Wurzelbildung an einem *Holsteiner Cox* Blattsegment nach Kultur auf einem TDZ-freiem Medium.**

Bei der Anwendung von TDZ zur Sprossinduktion war der Regenerationsprozess wie folgt charakterisiert: Nach zweiwöchiger Kultur in völliger Dunkelheit war vornehmlich an der basalen Schnittkante Entwicklung von Kallus zu beobachten (Abb. 3.3 a), aus dem im Verlauf der weiteren Kultur nach 4-6 Wochen bereits Knospen bzw. Sprosse regenerierten (Abb. 3.3 b-c). Die Kultur auf Elongationsmedium führte zum Streckungswachstum der Sprosse (Abb. 3.3 d) sowie zur Multiplikation. Diese Prozedur ermöglicht die Regeneration von Sprossen aus Blattexplantaten innerhalb von 8-9 Wochen.

Die Abb. 3.3 a-d veranschaulichen die morphogenetischen Prozesse, die durch Supplementation von TDZ induziert wurden.



a) Erste regenerative Prozesse in Form von Kallusentwicklung an einem *Holsteiner Cox* Blattsegment nach zweiwöchiger Kultur im Dunkeln auf TDZ-haltigem Medium. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Kultur bei einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8h.



b) Knospen- und Sprossentwicklung nach vierwöchiger Induktionsphase auf TDZ-haltigem Medium.



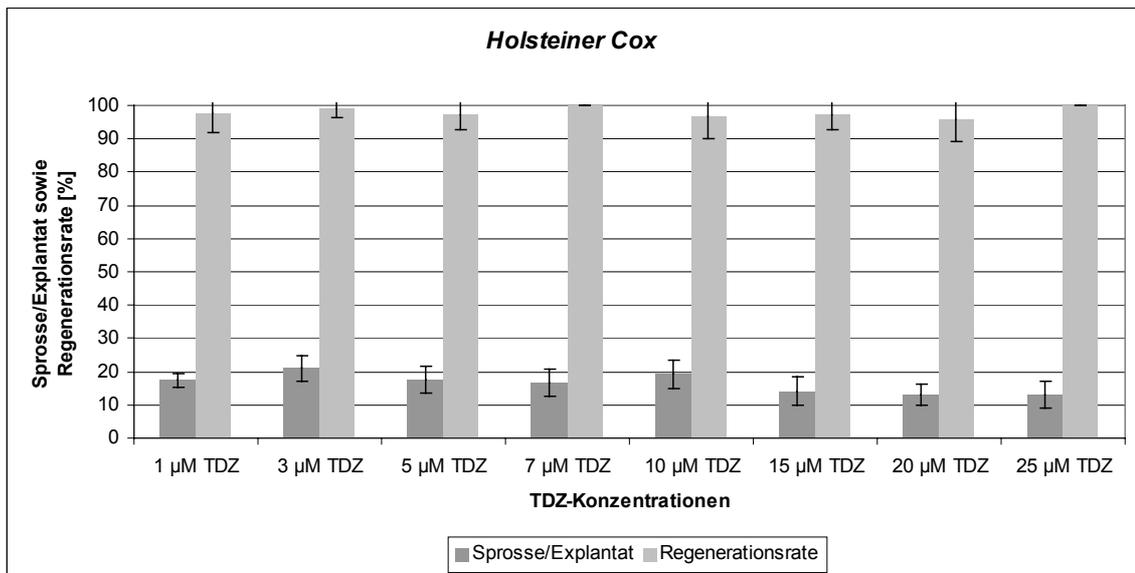
c) Ausgeprägte Knospen- und Sprossbildung an dem Explantat nach sechswöchiger Kultur auf dem Induktionsmedium. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die weitere Kultur auf Elongationsmedium (Tab. 2.5).



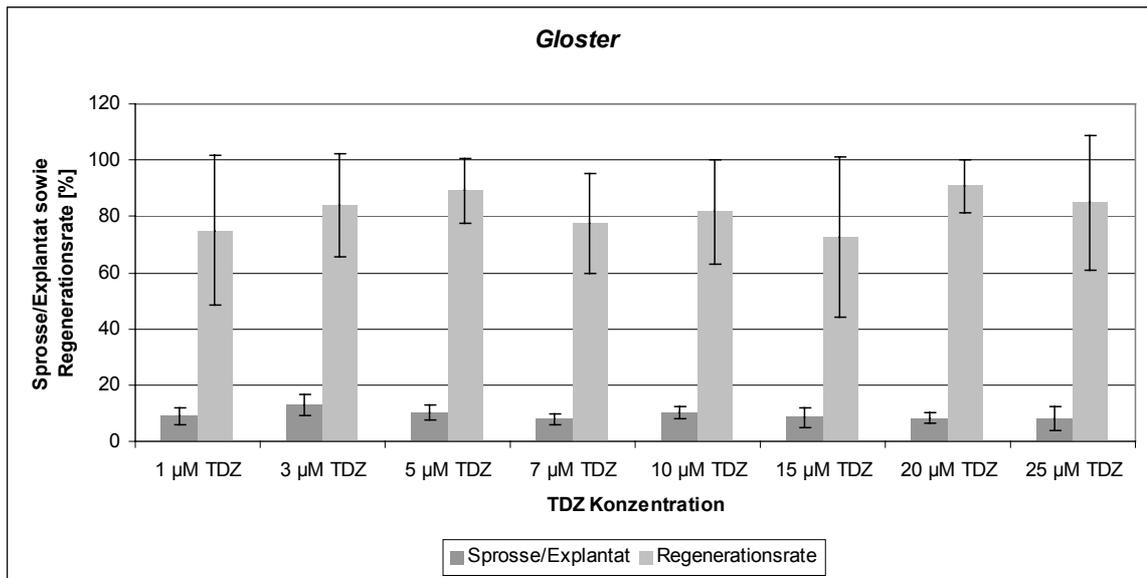
d) Elongierte Sprosse nach sechswöchiger Kultur auf Induktionsmedium mit anschließender zwei- bis dreiwöchiger Kultur auf Elongationsmedium.

**Abb. 3.3: Organogenetische Regenerationsprozesse an einem kultiviertem *Holsteiner Cox* Blattsegment.** Die Kultur erfolgte auf einem Medium folgender Zusammensetzung: MS-Salze incl. Vit., 3% Sorbitol, 1  $\mu$ M IBA, 3  $\mu$ M TDZ und 0,3% Gelrite.

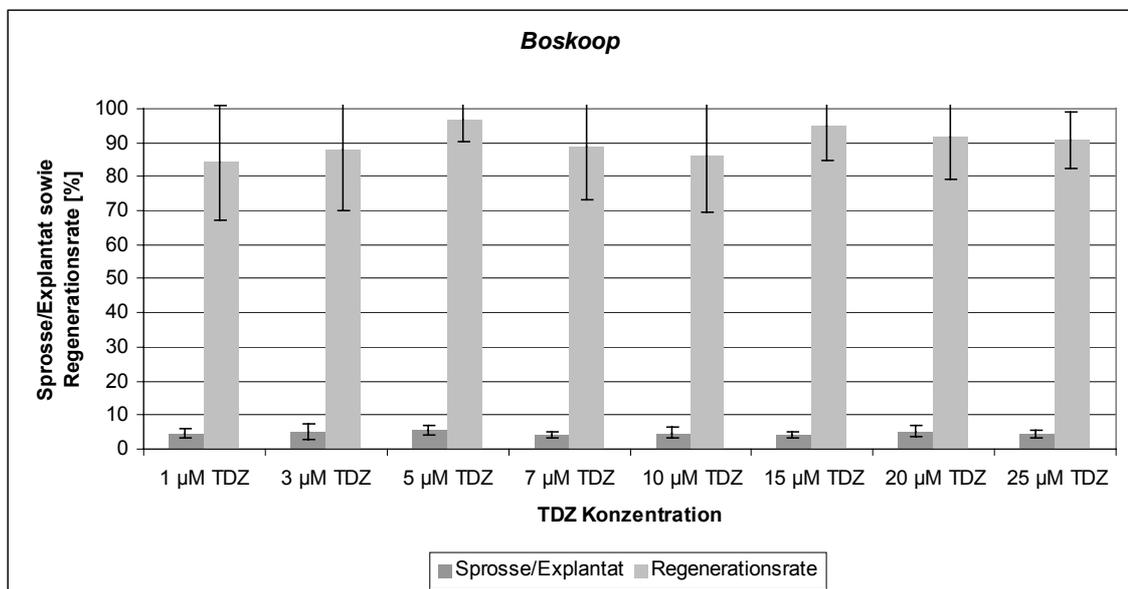
Grundsätzlich führten alle eingesetzten Medien zur Sprossinduktion an Blattexplantaten. Der Einfluss der unterschiedlichen Medien auf die Regenerationsrate sowie auf die Anzahl der regenerierten Sprosse pro Explantat ist detailliert in den Graphiken 3.4 - 3.7 dargestellt.



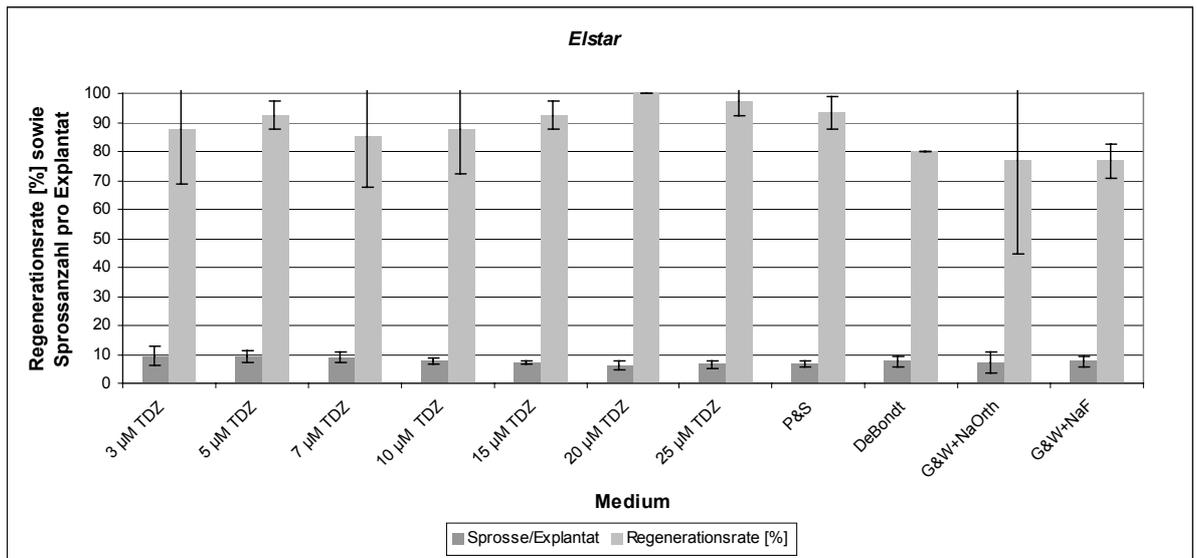
**Abb. 3.4:** Effekt steigender TDZ-Konzentrationen auf die Regenerationsrate und Anzahl der Sprosse pro Explantat der Sorte *Holsteiner Cox*. Die Werte resultieren aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 40-50 Explantaten. Die Ergebnisse wurden mittels 2-faktorieller Varianzanalyse untersucht. Mittelwerte wurden zunächst pro Petrischale ermittelt und anschließend mittels des Tuckey-Tests miteinander verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte ergänzt durch die Standardabweichung.



**Abb. 3.5:** Effekt steigender TDZ-Konzentrationen auf die Regenerationsrate und Anzahl der Sprosse pro Explantat der Sorte *Gloster*. Die Werte resultieren aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 40 Explantaten. Die Ergebnisse wurden mittels 2-faktorieller Varianzanalyse untersucht. Mittelwerte wurden zunächst pro Petrischale ermittelt und anschließend mittels des Tuckey-Tests miteinander verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte ergänzt durch die Standardabweichung.



**Abb. 3.6:** Effekt steigender TDZ-Konzentrationen auf die Regenerationsrate und Anzahl der Sprosse pro Explantat der Sorte *Boskoop*. Die Werte resultieren aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 40 Explantaten. Die Ergebnisse wurden mittels 2-faktorieller Varianzanalyse untersucht. Die Mittelwerte wurden zunächst pro Petrischale ermittelt und anschließend mittels des Tuckey-Tests miteinander verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte ergänzt durch die Standardabweichung.



**Abb. 3.7: Effekt verschiedener Medien auf die Regenerationsrate und die Anzahl der Sprosse pro Explantat der Sorte *Elstar*.** Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte eines Versuches mit 40 Explantaten pro Medium ergänzt durch die Standardabweichung dar. Die Ergebnisse wurden durch eine 1-faktorielle Varianzanalyse statistisch untersucht. Die Mittelwerte wurden zunächst pro Petrischale ermittelt und anschließend mittels des Tuckey-Tests miteinander verglichen.

Innerhalb der einzelnen Sorten waren bei Verwendung der unterschiedlichen Medien weder in der Regenerationsrate noch in der Sprosszahl pro Blattexplantat signifikante Unterschiede statistisch abzusichern. Die durchschnittlich höchste Anzahl an Sprossen pro Explantat wurden jedoch unabhängig von der Sorte bei einer TDZ-Konzentration von 3 µM erzielt; bei der Sorte *Boskoop* auch bei 5 µM. Die Effektivität, ausgedrückt in der Anzahl der Sprosse pro Explantat, variierte stark zwischen den einzelnen Sorten. Bei der Konzentration von 3 µM TDZ betrug die durchschnittlich höchste Sprosszahl bei *Elstar* 9,3, bei *Gloster* durchschnittlich 12,8. *Boskoop* bildete durchschnittlich lediglich 5,18 Sprosse pro Explantat, während *Holsteiner Cox* mit durchschnittlich 20,88 die höchste Anzahl an Regeneratpflanzen pro Explantat hervorbrachte. Die Regenerationsraten, d.h. die Gesamtheit der Explantate, die bei der TDZ Konzentration von 3µM Sprossregeneration aufwiesen, lagen bei den Sorten *Gloster* und *Boskoop* um 84%, während die von *Elstar* und *Holsteiner Cox* mit 92,5% und 99,17% deutlich darüber lagen. Da steigende TDZ-Konzentrationen mit einer deutlichen Abnahme der Sprossgröße einher gingen, eignete sich auch aus diesem Grund die relativ geringe Konzentration von 3 µM besonders gut zur Sprossinduktion für die vier getesteten Sorten.

### 3.3 Bewurzelung

Die Überführung von *in vitro* Material an *ex vitro* Bedingungen erforderte eine vorherige in Bewurzelung *in vitro*. Die in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Medien mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Auxine IBA und NAA wurden auf ihre Eignung zur Induktion von Wurzelwachstum bei den verschiedenen Apfelsorten getestet. Ein Medium wurde dann als geeignet angesehen, wenn der prozentuale Anteil wurzelbildender Sprosse (Bewurzelungsrate) hoch war und eine hohe Anzahl von Wurzeln pro Sproß generiert wurden, die weder kallös verdickt noch verkümmert erschienen. Anhand der Anzahl der gebildeten Wurzeln erfolgte eine Zuordnung der Sprosse zu Boniturklassen, die in Abb. 3.7 exemplarisch dargestellt und in der Bildunterschrift erläutert sind. Ein weiteres Kriterium, das wenn nötig auch bei der Ermittlung eines geeigneten Bewurzelungsmediums berücksichtigt wurde, war die Länge der gebildeten Wurzeln. Die Längenangabe wird nicht gesondert in den Tabellen angegeben. Die Kategorien waren wie folgt definiert: A = 1-3 cm; B = 4-6 cm und C = >6 cm.



**Abb. 3.8: Boniturklassen zur Bewertung der Wurzelentwicklung.** 0 = keine Wurzelentwicklung; I = Wurzelansätze; II = 1-3 Wurzeln pro Spross; III = 4-6 Wurzeln pro Spross; IV = 7-9 Wurzeln pro Spross; V = 10-12 Wurzeln pro Spross; VI = 12-15 Wurzeln pro Spross; VII = > 15 Wurzeln pro Spross.

Die Tabellen 3.1-3.4 geben einen Überblick über die errechneten Bewurzelungsraten der vier Apfelsorten bei Anwendung der verschiedenen Bewurzelungsmedien. Desweiteren

können den Tabellen die detaillierten Zuordnungen der unbewurzelten als auch der bewurzelten Sprosse zu Bonitierungsklassen entnommen werden.

Die Angabe der Bewurzelungsrate repräsentiert den prozentualen Anteil der bewurzelten Sprosse von der Gesamtheit der eingesetzten Sprosse. Erfolgte lediglich Kallusbildung, wurde dies nicht als Bewurzelung gewertet.

### 3.3.1 Holsteiner Cox

**Tab. 3.1: Zuordnung der *Holsteiner Cox*-Sprosse zu den jeweiligen Boniturklassen nach 4-wöchiger Kulturphase auf den Bewurzelungsmedien.**

Med	Hormonkonz.	Bew. Rate [%]	Unbewurzelte Sprosse		Bewurzelte Sprosse/ Einteilung in die Boniturklassen [%]							
			Kallus Bdg. [%]	0	I	II	III	IV	V	VI	VII	
B 0	Hfr	58,93	-	41,07	-	28,57	16,07	7,14	5,36	1,79		
B 1	0,75µM IBA	88,88	-	11,11		18,52	22,22	31,48	9,26	7,41		
B 2	1,5 µM IBA	96,67	-	3,33	5	11,67	31,67	31,67	15	1,67		
B 3	3 µM IBA	100	-	-	6,56	16,39	22,95	34,43	11,48	4,92	3,28	
B 4	6 µM IBA	100	-	-	5,08	6,78	10,17	18,64	20,34	25,42	13,56	
B 5	9 µM IBA	100	-	-	3,28	4,92	13,11	19,67	24,59	9,84	24,59	
B 6	12 µM IBA	98,31	1,69	-	16,95	5,08	3,39	15,25	28,81	11,86	16,95	
B 7	0,75µM NAA	98,31	-	1,69	8,47	11,86	20,34	20,34	13,56	8,47	15,25	
B 8	1,5 µM NAA	100	-	-	1,67	5	10	20	20	13,33	30	
B 9	3 µM NAA	91,53	8,47	-	1,69	8,47	18,64	22,03	18,64	6,78	15,25	
B 10	6 µM NAA	91,66	8,33	-	45	3,33	13,33	11,67	11,67	1,67	5	
B 11	9 µM NAA	91,67	6,67	1,67	35	13,33	15	13,33	1,67	11,67	1,67	
B 12	12 µM NAA	95	5	-	56,67	5	6,67	10	11,67		5	

Stichprobengrößen: B0: 56; B1: 54; B2: 60; B3: 61; B4: 59; B5: 61; B6: 59; B7: 59; B8: 60; B9: 59; B10: 60; B11: 60; B12: 60.

Mit Ausnahme des hormonfreien und des sehr niedrig dosierten IBA Mediums (0,75µM) wurde mit allen IBA- und NAA-Konzentrationen eine nahezu 100%tige Bewurzelungsrate der Sorte *Holsteiner Cox* erzielt. Dennoch konnten sowohl bei den unterschiedlichen Auxinen als auch deren verschiedenen Konzentrationen erhebliche Qualitätsunterschiede der Wurzeln festgestellt werden. Während bei dem Medium B2 (1,5µM) und B3 (3µM) eine hohe Anzahl an morphologisch normal ausgebildeten Wurzeln induziert wurden, führte bereits eine Konzentration von 6µM IBA zu teilweise kallös verdickten Wurzeln,

die überwiegend nur in die Längenkategorie A eingeordnet werden konnten. Dieser Effekt verstärkte sich bei den Konzentrationen 9 und 12  $\mu\text{M}$  IBA und wurde auch bei der Anwendung von NAA beobachtet. Steigende NAA Konzentrationen führten zu vermehrter Kallusbildung bzw. zu kallös verdickten Wurzeln, die teilweise lediglich als Wurzelansätze charakterisiert wurden. Abschließend läßt sich feststellen, dass die Medien B2 und B3 besonders zur Wurzelinduktion an *Holsteiner Cox in vitro* Sprossen geeignet waren. Zur routinemäßigen Bewurzelung wurde allerdings das Medium B2 eingesetzt, da bei diesem eine deutlich höhere Anzahl in die Kategorie C eingeordnet wurde, d.h. die Wurzeln durchschnittlich länger waren als bei dem Medium B3.

### 3.3.2 Elstar

Für die Sorte *Elstar* wurde zusätzlich zur Medienreihe mit den unterschiedlichen NAA- und IBA-Konzentrationen ein bereits für *Elstar* publiziertes Bewurzelungsmedium (PUITE & SHAART 1996) in die Untersuchungen einbezogen.

**Tab. 3.2: Zuordnung der *Elstar*-Sprosse zu den jeweiligen Boniturklassen nach 4-wöchiger Kulturphase auf den Bewurzelungsmedien.**

Med	Hormonkonz.	Bew. Rate [%]	Unbewurzelte Sprosse		Bewurzelte Sprosse/ Einteilung in die Boniturklassen [%]							
			Kallus Bdg. [%]	0	I	II	III	IV	V	VI	VII	
B 0	Hfr	29,31	1,72	68,97	1,72	13,8	5,17		6,9	1,72		
B 1	0,75 $\mu\text{M}$ IBA	55,74	3,28	41	21,31	26,23	3,28		4,92			
B 2	1,5 $\mu\text{M}$ IBA	65	3,33	31,67	26,67	21,67	11,66	3,33	1,67			
B 3	3 $\mu\text{M}$ IBA	64,91	5,26	29,82	17,54	15,79	15,79	10,53	3,51	1,75		
B 4	6 $\mu\text{M}$ IBA	88,34	11,66		25	31,67	15	5	5	5	1,67	
B 5	9 $\mu\text{M}$ IBA	78,69	18,03	3,28	32,78	19,67	9,84	9,84	3,28	3,28		
B 6	12 $\mu\text{M}$ IBA	80	18,33	1,67	35	23,33	11,67	8,33	1,67			
B 7	0,75 $\mu\text{M}$ NAA	65,52	20,69	13,79	13,79	17,25	24,14	5,17	3,45			1,72
B 8	1,5 $\mu\text{M}$ NAA	62,72	15,25	22,03	47,47	5,08	6,79	1,69	1,69			
B 9	3 $\mu\text{M}$ NAA	68,33		31,67	55	6,67		5	1,66			
B 10	6 $\mu\text{M}$ NAA	26,67	13,33	60	23,33			1,67	1,67			
B 11	9 $\mu\text{M}$ NAA	26,67	3,33	70	26,67							
B 12	12 $\mu\text{M}$ NAA	20	3,33	76,67	20							
Puite&Shaart Bew. Med.		92,16	3,92	3,92	13,73	17,65	21,57	21,57	9,8	7,84		

Stichprobengrößen: B0: 58; B1: 61; B2: 60; B3: 56; B4: 60; B5: 61; B6: 60; B7: 58; B8: 59; B9: 60; B10: 60; B11: 60; B12: 60; Puite&Shaart Bew. Medium: 51.

Steigende IBA-Konzentrationen führten bei der Sorte *Elstar* zu steigenden Bewurzelungsraten; die Wurzeln waren jedoch größtenteils lediglich als Wurzelansätze ausgebildet. Parallel dazu stieg auch der Anteil an Sprossen, die lediglich Kallusbildung aufwiesen. Der Zusatz von NAA zum Bewurzelungsmedium korrelierte bei steigenden Konzentrationen mit einer Verminderung der Bewurzelungsrate. Zwar wurde bei der Konzentration von  $0,75\mu\text{M}$  NAA noch eine Bewurzelungsrate von 65,52% erreicht, steigende Konzentrationen führten jedoch entweder zu einer vermehrten Entwicklung von Wurzelansätzen, oder aber zu keinerlei Wurzelbildung. Die höchste Bewurzelungsrate von 92,16% wurde bei der Verwendung des Bewurzelungsmediums nach PUITE & SHAART (1996) erzielt. Der Anteil an Sprossen, die lediglich Wurzelansätze ausgebildet hatten, war mit 13,73% vergleichsweise gering und die Anzahl der gebildeten Wurzeln entsprechend der Einordnung in die jeweiligen Boniturklassen zufriedenstellend hoch.

### 3.3.3 Gloster

**Tab. 3.3: Zuordnung der *Gloster*-Sprosse zu den jeweiligen Boniturklassen nach 4-wöchiger Kulturphase auf den Bewurzelungsmedien.**

	Medium	Bew. Rate [%]	Unbewurzelte Sprosse		Bewurzelte Sprosse/ Einteilung in die Boniturklassen							
			Kallus Bdg. [%]	0	I	II	III	IV	V	VI	VII	
B 0	Hfr	0	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
B 1	$0,75\mu\text{M}$ IBA	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 2	$1,5\mu\text{M}$ IBA	60	30	10	-	30	30	-	-	-	-	-
B 3	$3\mu\text{M}$ IBA	55	45	-	30	20	-	5	-	-	-	-
B 4	$6\mu\text{M}$ IBA	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 5	$9\mu\text{M}$ IBA	60	-	40	55	5	-	-	-	-	-	-
B 6	$12\mu\text{M}$ IBA	50	5	45	50	-	-	-	-	-	-	-
B 7	$0,75\mu\text{M}$ NAA	10	5	85	15	-	-	-	-	-	-	-
B 8	$1,5\mu\text{M}$ NAA	15	-	85	15	-	-	-	-	-	-	-
B 9	$3\mu\text{M}$ NAA	15	-	85	15	-	-	-	-	-	-	-
B 10	$6\mu\text{M}$ NAA	5	-	95	5	-	-	-	-	-	-	-
B 11	$9\mu\text{M}$ NAA	0	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
B 12	$12\mu\text{M}$ NAA	0	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-

Stichprobengrößen: je 20 Pflanzen.

Durch Kultur der *Gloster*-Sprosse auf den Medien B2 und B5 konnten mit 60% die höchsten Bewurzelungsraten erzielt werden. Die Anzahl der Wurzeln pro Sproß war bei

Applikation von 1,5µM IBA (B2) jedoch deutlich höher als bei der Konzentration von 9µM. So konnten jeweils 30% der Boniturklasse II und III zugeordnet werden, während bei Kultur auf dem Medium B5 55% nur in die Boniturklasse I eingeordnet wurde. NAA eignete sich nicht zur Wurzelinduktion. Steigende Konzentrationen korrelierten mit sinkenden Bewurzelungsraten. Mit den Konzentrationen 9 und 12µM NAA konnte keine Wuzelbildung induziert werden. Von allen getesteten Medien erwies sich die Konzentration von 1,5µM als geeignet zur Wurzelinduktion an *in vitro* Sprossen der Sorte *Gloster*.

### 3.3.4 Boskoop

**Tab. 3.4: Zuordnung der *Boskoop*-Sprosse zu den jeweiligen Boniturklassen nach 4-wöchiger Kulturphase auf den Bewurzelungsmedien.**

Med	Hormonkonz.	Bew. Rate [%]	Unbewurzelte Sprosse	Bewurzelte Sprosse/ Einteilung in die Boniturklassen [%]							
			Kallus Bdg. [%]	I	II	III	IV	V	VI	VII	
B 0	Hfr	0	100								
B 1	0,75 µM IBA	10	90		10						
B 2	1,5 µM IBA	15	85			15					
B 3	3 µM IBA	70	30		15	40	15				
B 4	6 µM IBA	95	5		5	25	40	15	5	5	
B 5	9 µM IBA	80	20		10	20	30	15	5		
B 6	12 µM IBA	95	5		15	25	15	25	15		
B 7	0,75 µM AA	20	80		5	15					
B 8	1,5 µM NAA	55	45		20	10	15	10			
B 9	3 µM NAA	70	30		30	15	20	5			
B 10	6 µM NAA	65	35		65						
B 11	9 µM NAA	55	45		45	5	5				
B 12	12 µM NAA	30	70		30						

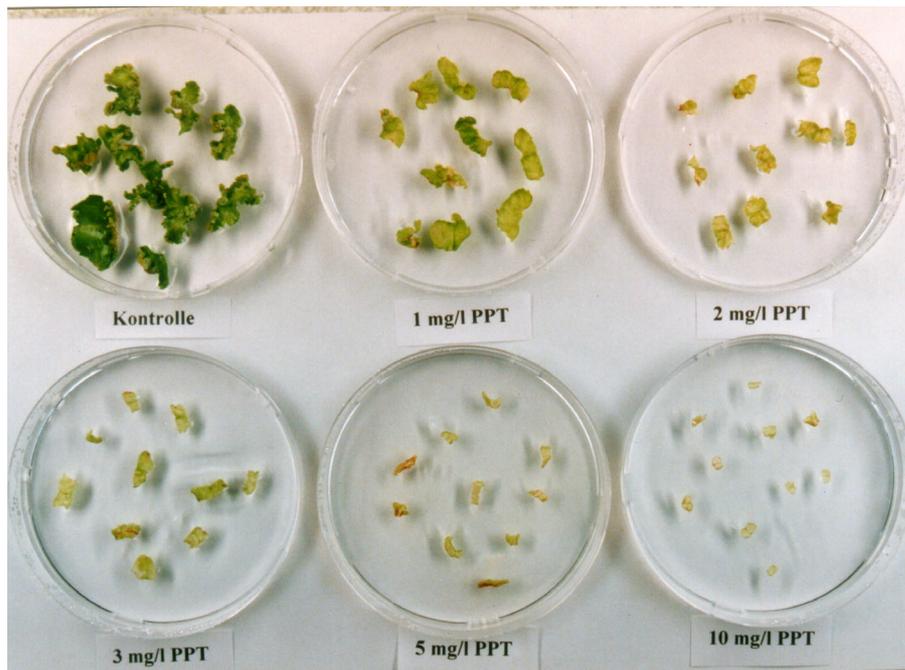
Stichprobengrößen: je 20 Pflanzen.

Die Sorte *Boskoop* zeigte die höchsten Bewurzelungsraten von 95% auf den Medien B4 und B6. Bevorzugt bei der routinemäßigen Bewurzelung wurde allerdings das Medium B4, da auf diesem Medium der Prozentsatz von Sprossen, die lediglich Wurzelansätze ausgebildet hatten, deutlich geringer war.

## 3.4 Transformation

### 3.4.1 Ermittlung geeigneter Selektionsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Selektion transgener Zellen das Markergen *bar* aus *Streptomyces hygroscopicus*, dessen Produkt die Resistenz gegen das Herbizid Glufosinat-Ammonium (PPT) bewirkt, eingesetzt. Um eine effektive Selektion transgener Zellen bei einer gleichzeitigen konsequenten Eliminierung nicht-transgener Zellen zu gewährleisten, wurden zunächst die kritischen Konzentrationen des selektiven Agens PPT ermittelt, die zur effektiven Abtötung nicht transgener Zellen notwendig sind. Die Abbildung 3.9 demonstriert den Effekt ansteigender PPT-Konzentrationen bis zu 10 mg/l auf nicht-transformierte Explantate.



**Abb. 3.9:** Effekt steigender Glufosinat-Ammonium (PPT) Konzentrationen auf die Regenerationsfähigkeit nicht-transformierter Blattsegmente. Es handelte sich um Explantate der Sorte *Elstar* auf dem Puite & Shaart-Regenerationsmedium nach einer Kulturdauer von 3 Wochen bei einem Licht/Dunkel-Verhältnis von 16/8h.

Ansteigende PPT-Konzentrationen korrelierten deutlich mit einer zunehmenden Nekrosität des Gewebes. Während bei Konzentrationen bis zu 3 mg/l noch Zellen im Gewebe überlebten, wirkten die steigenden Konzentrationen zunehmend schädigend auf das pflanzliche Gewebe. Die Dosis von 10 mg/l war letal für nicht transgene Zellen. Die Fähigkeit eines regenerierten Sprosses auf einem Medium mit diesem Glufosinat-Gehalt zu wachsen, wurde daher als erster Hinweis auf Transgenität gewertet.

### 3.4.2 Transformationsmethode

Der indirekte Gentransfer mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wurde an Blattexplantaten der Apfelsorten *Holsteiner Cox* und *Elstar* durchgeführt.

### 3.4.3 Transformationseffizienz

Einen Überblick über die durchgeführten Transformationsexperimente, deren Versuchsbedingungen und Ergebnisse gibt die Tab. 3.5. Die Transformationseffizienz (TE) ergab sich aus der Formel (GAMBORG & PHILLIPS [Eds.] 1995, S. 192):

$$TE = \text{Anzahl bestätigter transgener Sprosse} \times 100 / \text{Anzahl der eingesetzten Explantate}$$

Transformationsexperimente, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, in denen jedoch keine transgenen Pflanzen regeneriert werden konnten, sind in der Tabelle 3.5 zusammengefasst worden. Aus der Versuchsnummer kann entnommen werden, ob es sich um ein oder mehrere Experimente handelte. Die Transformationen, aus denen transgene Pflanzen hervorgingen, sind gesondert aufgeführt und die Transformationseffizienzen bezogen sich auf das jeweilige Experiment. Eine Beeinflussung der Transformationsraten durch Parameter, die nicht versuchsbedingt waren, deren Identifizierung jedoch im Rahmen der Arbeit nicht möglich war, sollten so vermieden werden.

**Tab. 3.5: Ergebnisse der durchgeführten Transformationsexperimente.**

<b>Transf. /Sorte</b>	<b>Transf. Nr.</b>	<b>Gen</b>	<b>Anzahl eingesetzter Explantate, Behandlung</b>	<b>Regener. transgene Linien</b>	<b>Transf. Effizienz</b>
T/E Elstar	99.7	vst1	150 Expl. Mit verzögerter Selektion, 144 mit sofortigem, kontinuierlich ansteigendem Selektionsdruck auf Puite & Shaart Med.	-	-
T/E Elstar	99.8	vst1	156 Expl. mit sofortigem, kontinuierlich ansteigendem Selektionsdruck auf 3µM TDZ und 0,5µM NAA	-	-
T/E Elstar	00.1	vst1	335 Expl. /verzögerte Selektion mit kontinuierlich ansteigendem PPT-Gehalt auf 3µM TDZ und 0,5µM NAA	1	0,29
T/E Elstar	00.2	vst1	242 Expl. /verzögerte Selektion mit kontinuierlich ansteigendem PPT-Gehalt auf 3µM TDZ und 0,5µM NAA	-	-
T/E Elstar	00.7 und 00.8	K-PGIP	330 Expl. /sofortige Selektion mit ansteigenden PPT-Konzentrationen (max. 10mg/l) auf 3µM TDZ und 0,5µM NAA	-	-
T/HC	00.1	vst1	315 Expl. /verzögerte Selektion mit kontinuierlich ansteigendem PPT-Gehalt (max. 10mg/l) auf Puite & Shaart (1996)	-	-
T/HC	00.2 und 00.3	vst1	371 Expl. /verzögerte Selektion mit kontinuierlich ansteigendem PPT-Gehalt (max. 10 mg/l) auf 3µM TDZ und 0,5µM NAA 90 Expl. /sofortige Selektion mit 10mg/l PPT auf 3µM TDZ und 0,5µM NAA	-	-
HC	C	vst1	178 Expl. / sofortige Selektion mit ansteigenden Konzentrationen (max. 10mg/l PPT) auf 3µM TDZ und 1µM IBA	8	4,49
HC	C1	vst1	158/ sofortige Selektion mit ansteigenden Konzentrationen (max 10 mg/l PPT) auf 3µM TDZ und 1µM IBA	1	0,6
HC	00.5	vst1	300 Expl. /verzögerte Selektion mit ansteigenden Konzentrationen (max. 10mg/l PPT) auf 3µM TDZ und 1µM IBA	-	-
HC	00.6	K-PGIP	135 Expl. / sofortige Selektion mit ansteigenden Konzentrationen (max. 10 mg/l PPT) auf 3 µM TDZ und 1 µM IBA	-	-
HC	01.1	K-PGIP	425 Expl. / sofortige Selektion mit ansteigenden Konzentrationen (max. 10mg/l PPT) auf 3µM TDZ und 1µM IBA	3	0,7
HC	01.2	K-PGIP	278 Expl. / verzögerte Selektion mit ansteigenden Konzentrationen (max. 10mg/l PPT) auf 3µM TDZ und 1µM IBA	-	-

Aus mehreren Transformationen, die mit der Sorte *Elstar* unter Verwendung des *vst1*-Gens durchgeführt wurden, ging lediglich aus dem Transformationsexperiment T/E 00.1 eine transgene Linie hervor. Bei dieser Transformation wurde die Vorgehensweise der verzögerten Selektion verfolgt. Auf dem für *Elstar* optimierten Sprossinduktionsmedium wurden zunächst Sprosse regeneriert, die anschließend einer Selektion mit ansteigender

Konzentration bis zu 10 mg/l PPT unterworfen wurden. Problematisch bei der Transformation von *Elstar* erwies sich die Anwendung Agrobakterien-eliminierender Antibiotika, die unter 3.4.5 näher erläutert wird. Alle transformierten Explantate neigten zu sehr starken Vitrifizierungen, so dass trotz zunächst fehlender Selektion nahezu keine morphologisch normalen Sprosse regeneriert wurden. Die geringe Transformationseffizienz von 0,26 bei diesem Experiment und die erfolglos durchgeführten anderen *Elstar*-Transformationen mögen z.T. darin begründet sein, dass viele, eventuell transgene Sprosse aufgrund der abnormalen Entwicklung verworfen werden mussten.

Bei der Transformation der Sorte *Holsteiner Cox* traten die oben genannten Probleme bei der Regeneration nicht auf. Alle sich an transformierten Blattexplantaten entwickelnden Sprosse zeigten trotz der Anwendung der Antibiotika einen normalen Habitus und wurden bei fehlender Selektion auch in vergleichbarer Anzahl induziert. Auch während der Mikropropagation der transgenen Sprosse wurde kein negativer Effekt der Antibiotika festgestellt.

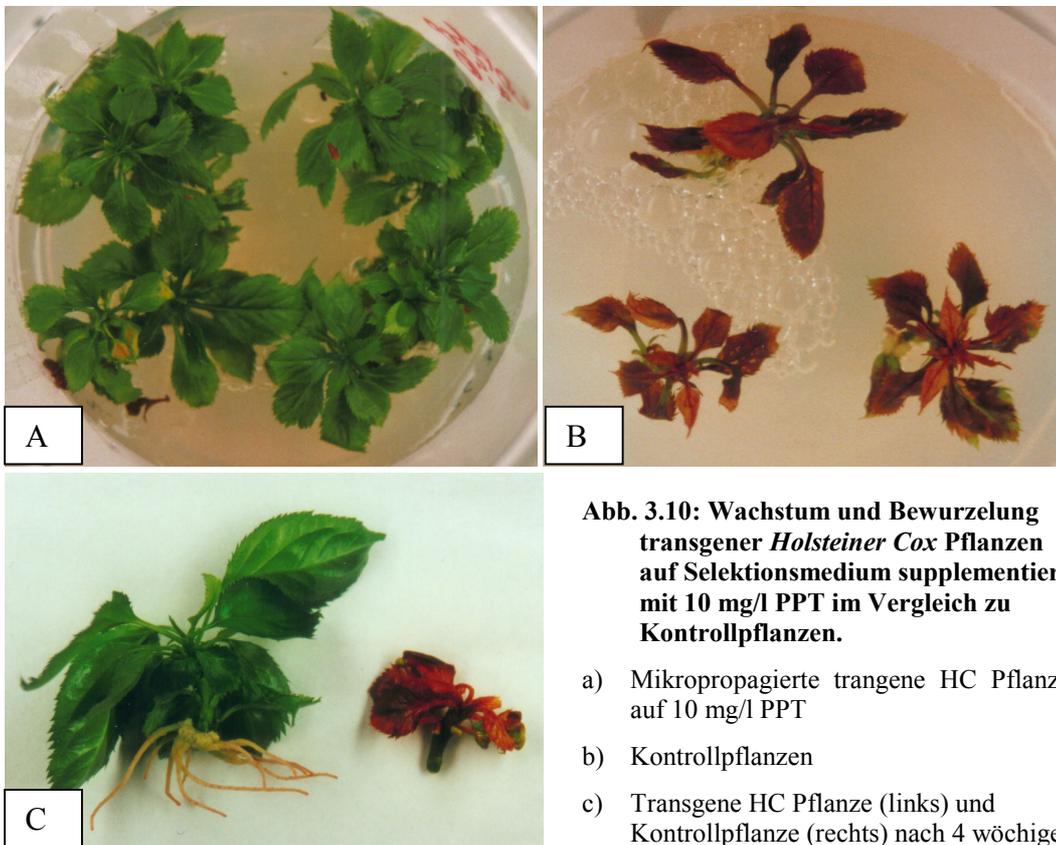
Aus der Transformation T/HC C gingen 8 bisher bestätigte Linien mit *vst1*-Gen hervor. Die Transformationseffizienz für dieses Transformationsexperiment lag damit bei 4,49. Einige weitere auf PPT wachsende Linien konnten in Rahmen der Arbeit nicht mehr abschließend molekular charakterisiert werden, so dass die TE eventuell höher liegen könnte. Die Regeneration erfolgte auf dem für *Holsteiner Cox* optimierten Medium (3  $\mu$ M TDZ und 1  $\mu$ M IBA) mit sofortiger, nach der Cokultur beginnender Selektion mit einer Konzentration von 3 mg/l PPT, die im Laufe der weiteren Kultur auf 10 mg/l gesteigert wurde. Unter gleichen Bedingungen wurde im Rahmen des Transformationsexperiments T/HCC1 eine weitere transgene *vst1*-Linie generiert; dies entsprach einer Transformationseffizienz von 0,6. Aus der Transformation T/HC 01.1 gingen ebenfalls unter den gleichen Versuchsbedingungen bei Verwendung des PGIP-Gens drei transgene *Holsteiner Cox* Linien hervor. Die TE der Transformation T/HC 01.1 lag damit bei 0,7. Die für die Sorte *Holsteiner Cox* angewendete Transformationsmethode erwies sich als reproduzierbar und ist somit zur Erzeugung transgener Apfelsorten geeignet.

### 3.4.4 Selektion

Der höchste applizierte Selektionsdruck von 10 mg/l PPT erwies sich als sehr effektiv zur Differenzierung transgener Zellen bzw. Sprosse. Während die Kontrollpflanzen komplett

abgetötet wurden, konnte keine inhibierende Wirkung des Herbizids auf das Wachstum der transgenen Pflanzen festgestellt werden (Abb. 3.10 a-b). Die Mikropropagation der herbizidresistenten Pflanzen verlief uneingeschränkt.

Die vierwöchige Kultur auf Bewurzelungsmedium, ebenfalls angereichert mit 10 mg/L PPT, bestätigte die selektive Wirkung dieser Konzentration. Nicht-transgene Pflanzen gingen ein, während transgene Sprosse uneingeschränkte Wurzelbildung aufwiesen (Abb. 3.10 c). Die auf dem Medium wachsenden Sprosse wurden als potenziell transgen eingestuft. Die Transgenität wurden in allen Fällen durch die molekularen Analysen bestätigt. Es wurden keine „Ausreisser“ detektiert.



**Abb. 3.10: Wachstum und Bewurzelung transgener *Holsteiner Cox* Pflanzen auf Selektionsmedium supplementiert mit 10 mg/l PPT im Vergleich zu Kontrollpflanzen.**

- a) Mikropropagierte transgene HC Pflanzen auf 10 mg/l PPT
- b) Kontrollpflanzen
- c) Transgene HC Pflanze (links) und Kontrollpflanze (rechts) nach 4 wöchiger Kultur auf Bewurzelungsmedium supplementiert mit 10 mg/l PPT

### 3.4.5 Eliminierung der Agrobakterien nach der Transformation

Die Applikation Agrobakterien-eliminierender Antibiotika nach der Transformation zur Abtötung und Verhinderung eines erneuten Auswachsens der Bakterien verursachte bei der Sorte *Elstar* starke Vitrifizierungen während der Regenerationsphase. Dieses Phänomen konnte eindeutig auf den Einsatz der Antibiotika und nicht auf die Transformationsprozedur zurückgeführt werden, da die starken Vitrifizierungen und die damit verbundene abnormale Sprossentwicklung auch bei nicht-transformierten, auf antibiotikahaltigem Medium kultivierten *Elstar*-Kontrollexplantaten beobachtet wurde. Die Vitrifizierungen traten unabhängig vom eingesetzten Antibiotikum auf, so wurden sie sowohl bei Anwendung von Cefotaxim, als auch durch den Einsatz der Kombination von Ticarcillin und Combactam verursacht.

Um den Effekt der Antibiotika auf ein Minimum zu reduzieren, wurde versucht, die eingesetzten Konzentrationen zu verringern. Eine gleichbleibende Eliminierung sollte durch den Zusatz von PPM<sup>TM</sup> (Plant Preservative Mixture) gewährleistet werden. Bei PPM<sup>TM</sup> handelt es sich um ein breitwirkendes Biozid, das mikrobielle Kontaminationen in der Gewebekultur reduzieren bzw. beseitigen soll und auch zur Eliminierung von Agrobakterien geeignet ist ([www.ppm4plant-tc.com](http://www.ppm4plant-tc.com)).

Durch die Reduktion des Antibiotikagehalts auf 50 mg/l Ticarcillin bei gleichzeitiger Anwendung von 0,2% PPM<sup>TM</sup> konnte der vitrifizierende Effekt nahezu behoben werden. Dennoch muß angemerkt werden, dass eine langfristige Anwendung dieser Kombination nicht geeignet war, um die Agrobakterien vollständig zu eliminieren. Im Verlauf der weiteren Kultur kam es zu einem erneuten Auswachsen der Agrobakterien.

Die letztendlich aus Transformation T/E 001.1 hervorgegangene transgene *Elstar* Linie regenerierte mit normalen Habitus trotz der Anwendung von Ticarcillin und Combactam in Kombination. Auch während der folgenden Mikropropagationsphase traten keinerlei Vitrifizierungen mehr auf. Der normale Habitus blieb trotz gleichbleibender Konzentration der Antibiotika stabil.

Die Sorte *Holsteiner Cox* war von einem derartigen Effekt der Antibiotika auf Konstitution der regenerierten Sprosse nicht betroffen.

### 3.4.6 Überführung der regenerierten Pflanzen ins Gewächshaus

Die *in vitro* bewurzelten transgenen sowie Kontroll-Regeneratpflanzen konnten erfolgreich ins Gewächshaus überführt werden und entwickelten sich zu morphologisch normalen Pflanzen. Wie die Abb. 3.11 veranschaulicht, konnten im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen bei den transgenen Regeneraten keine phänotypischen Unterschiede festgestellt werden. Größe, Morphologie und Habitus der transgenen *Elstar* und *Holsteiner Cox* Pflanzen entsprachen den jeweiligen Kontrollpflanzen.



**Abb. 3.11: Phänotypischer Vergleich transgener *vsf1*-Pflanzen und Kontrollpflanzen.**

A: *Holsteiner Cox* Kontrollpflanze (rechts) und *vsf1*-transgene Linie T/HC C1.1 (links).

B: *Elstar* Kontrollpflanze (rechts) und *vsf1*-transgene *Elstar*-Linie (links).

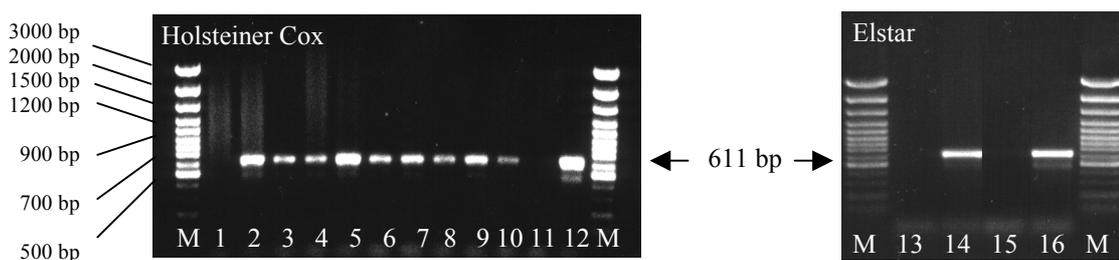
## 3.5 Molekulare Analysen

### 3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Integration der Transgene ins Apfelgenom wurde zunächst durch PCR-Analysen überprüft. Als *Template* für die Amplifikation der Genfragmente wurde, wenn nicht anders angegeben, entweder isolierte genomische DNA oder ein mit einer Pipettenspitze ausgestanztes Blattstück der zu untersuchenden Pflanze eingesetzt. Diese von BERTHOMIEU & MEYER (1991) abgeleitete Methode ermöglichte eine sehr zeitsparende Analyse ohne vorherige DNA-Isolation und lieferte bei Verwendung von *in vitro* Pflanzenmaterial vergleichbare Ergebnisse. Sie eignete sich nicht zur Untersuchung von Gewächspflanzen, da es aufgrund der Beschaffenheit des Blattmaterials bei der Probenentnahme eher zu Brüchen des Blattgewebes kam und so die Zellbeschädigungen nicht effizient genug waren, um DNA in ausreichender Menge als Targetsequenz freizusetzen.

#### 3.5.1.1 PCR zum Nachweis des Stilbensynthasegens

Zum Nachweis der Integration des Stilbensynthasegens dienten die vom kodierenden Bereich des *vs1*-Gens abgeleiteten Primer RT*vs1*-sense und RT*vs1*-antisense. Sie binden an Position 1710 bp und 2321 bp des *vs1*-Gens und führen zur Amplifikation eines Fragments der Größe 611 bp.



**Abb. 3.12: PCR-Amplifikation des *vs1*-Genfragments aus DNA-Proben potenziell transgener Apfelpflanzen.** In der PCR wurde isolierte DNA als *Template* eingesetzt. Die Probenzuordnung ist der Tab. 3.6 zu entnehmen.

**Tab. 3.6: Probenzuordnung zur *vst1*-PCR transgener *Holsteiner Cox* und *Elstar* Linien.**

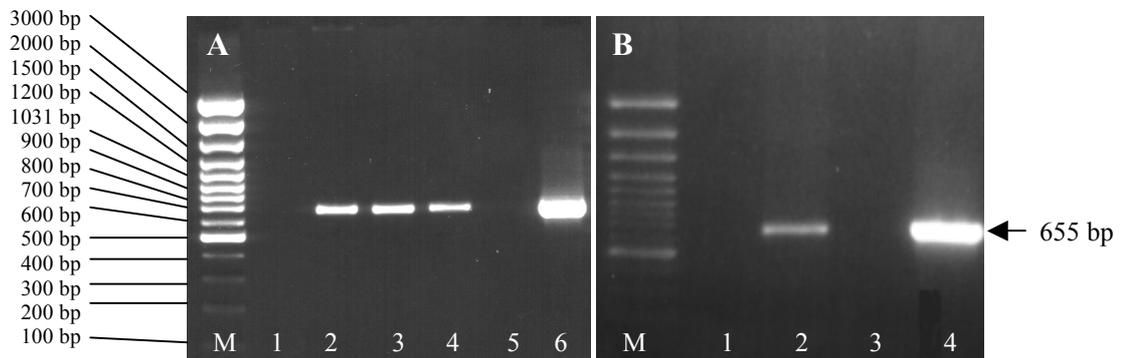
Bahn	Probe	<i>Vst1</i> -PCR
M	100bp+ Leiter	---
1	HC nicht transf.	-
2	T/HC C1.1	+
3	T/HC 2	+
4	T/HC 12	+
5	T/HC 17	+
6	T/HC 21	+
7	T/HC 27.3	+
8	T/HC 30.2	+
9	T/HC 45.3	+
10	T/HC 50	+
11	H <sub>2</sub> O	-
12	Plasmid pHKvst	+
13	<i>Elstar</i> nicht transf.	-
14	T/E 00.1	+
15	H <sub>2</sub> O	-
16	Plasmid pHKvst	+

Mittels der PCR wurde in allen untersuchten Proben potenziell transgener *Elstar* und *Holsteiner Cox* Pflanzen das erwartete *vst1*-Fragment der Größe von 611 bp amplifiziert. Bei Verwendung der isolierten DNA nicht-transformierter Kontrollpflanzen als *Template* wurde keine Bande detektiert (Abb. 3.12, Bahn 1 und 13). In der H<sub>2</sub>O-Kontrolle wurde auf Grund fehlender Ausgangs-DNA keine Bande detektiert.

### 3.5.1.2 PCR zum Nachweis des K-PGIP-Gens

Das PGIP-Gen aus Kiwi (*Actinidia deliciosa*) und das PGIP-Gen aus Apfel (*Malus domestica*) weisen auf DNA-Ebene eine Sequenz-Homologie von 71% auf (YAO et al. 1999). Da die Primer zum Nachweis des Kiwi-PGIP-Transgens aber mit dem PGIP-Gen aus *Malus* jeweils nur zu 55% und 60% komplementär sind, waren sie zur Differenzierung zwischen dem *Malus*- und dem heterologen Kiwi-PGIP geeignet. Die Verwendung der Primer führte zu keinem Amplifikationsprodukt bei der Untersuchung der nicht-transgenen Kontrollpflanzen.

Aus der Transformation T/HC 01.1 gingen vier potenziell transgene Linien hervor. An Explantat Nr. 1 regenerierten zwei Sprosse (1.1 und 1.2), deren Ursprung nicht eindeutig lokalisiert werden konnte. Beide Sprosse wurden daher auf Integration des PGIP-Gens mit der PCR getestet.



**Abb. 3.13: PCR-Amplifikation eines spezifischen Fragments des Kiwi-PGIP-Gens aus Proben transgener *Holsteiner Cox* Pflanzen.**

Gel A: M: 100bp+ Längenstandard; Bahn 1: HC negativ; Bahn 2: Klon 1.1; Bahn 3: Klon 1.2; Bahn 4: Klon 2.1; Bahn 5: H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle; Bahn 6: Plasmid pSCP2. Die PCR wurde mit dem Extract-N-Amp<sup>TM</sup> Plant PCR Kit der Firma Sigma durchgeführt.

Gel B: M: 100bp+ Längenstandard; Bahn 1: HC negativ; Bahn 2: Klon 3; Bahn 3: H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle; Bahn 4: Plasmid pSCP2. In dieser PCR wurde ein Gewebestück als *Template* eingesetzt.

Die Primer binden an Position 31 bp und 686 bp des PGIP-Gens aus Kiwi und liefern somit ein Amplifikat von 655 bp. Dieses konnte in allen untersuchten DNA-Proben potenziell transgener Pflanzen nachgewiesen werden.

Bei der untransformierten *Holsteiner Cox*-Kontrollpflanze (Abb. 3.13; A und B jeweils Bahn 1) wurde mit den verwendeten Primern kein Amplifikationsprodukt erzeugt. In der H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle wurde erwartungsgemäß aufgrund fehlender Ausgangs-DNA keine Bande detektiert.

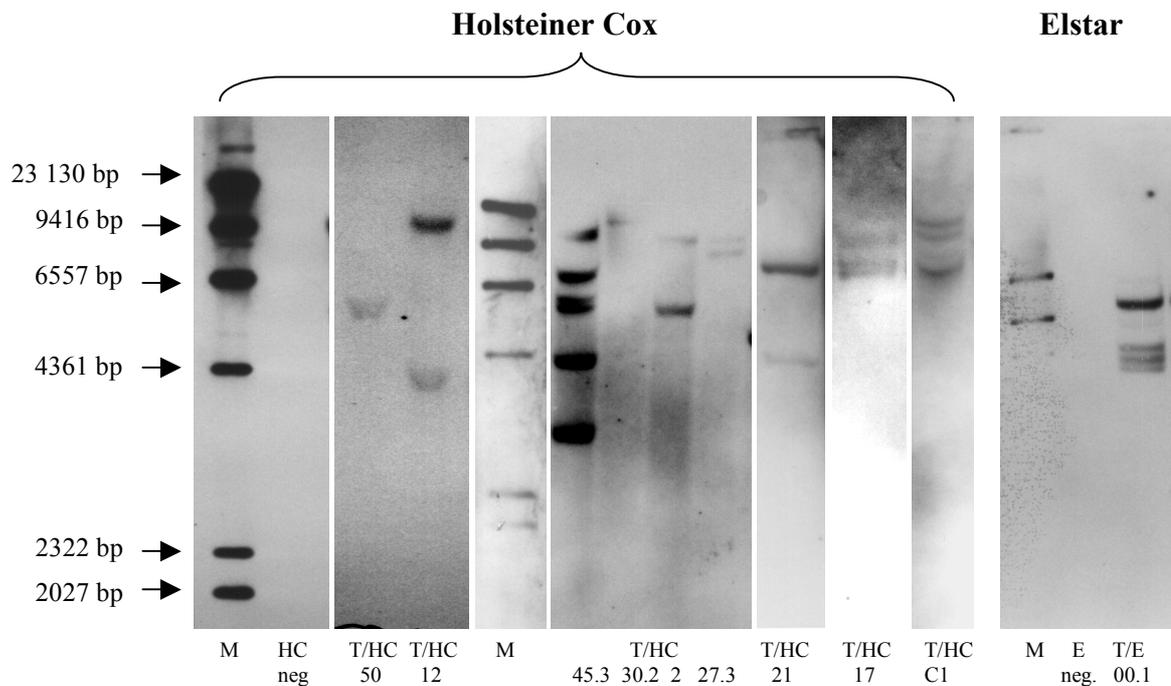
### 3.5.2 Southern Blot Analysen zum Nachweis der Integration der Transgene ins Apfelgenom

Die transgenen Pflanzenlinien wurden hinsichtlich der Integration der Transgene ins Pflanzengenom, ihrer Unabhängigkeit sowie der Anzahl integrierter Genkopien mit Hilfe des *Southern Blots* untersucht. Die Restriktionsenzyme zum Verdau der genomischen Pflanzen-DNA wurden so gewählt, dass sie nur eine Erkennungssequenz im Plasmid

besitzen. Mögliche freie Plasmid-DNA im Pflanzengenom sollte so in Form nur eines Hybridisierungssignals auf Höhe der jeweiligen Plasmidgröße zu erkennen sein. In das Pflanzengenom integrierte Plasmid-DNA liefert Hybridfragmente variabler Größe von Plasmid- und pflanzlicher DNA, da die nächste Schnittstelle des Enzyms ausserhalb der Plasmid-DNA zufällig verteilt im Apfelgenom liegt. Jede im *Southern Blot* sichtbare Bande (Hybridfragment) repräsentiert somit eine Integrationsstelle des Transgens im Apfelgenom.

### 3.5.2.1 Stilbensynthase-transgene Pflanzen

Das Stilbensynthasegen besitzt im Promotorbereich eine singuläre *Eco*R1-Schnittstelle (KIESECKER 1999); das Enzym wurde daher zur Restriktionsspaltung der DNA-Proben der *vs1*-transgenen sowie Kontrollpflanzen verwendet.



**Abb. 3.14:** Nachweis der Integration des *vs1*-Gens in die genomische DNA der *vs1*-transgenen *Holsteiner Cox* Pflanzen sowie der *vs1*-transgenen *Elstar* Linie mittels *Southern Blot* Analyse.

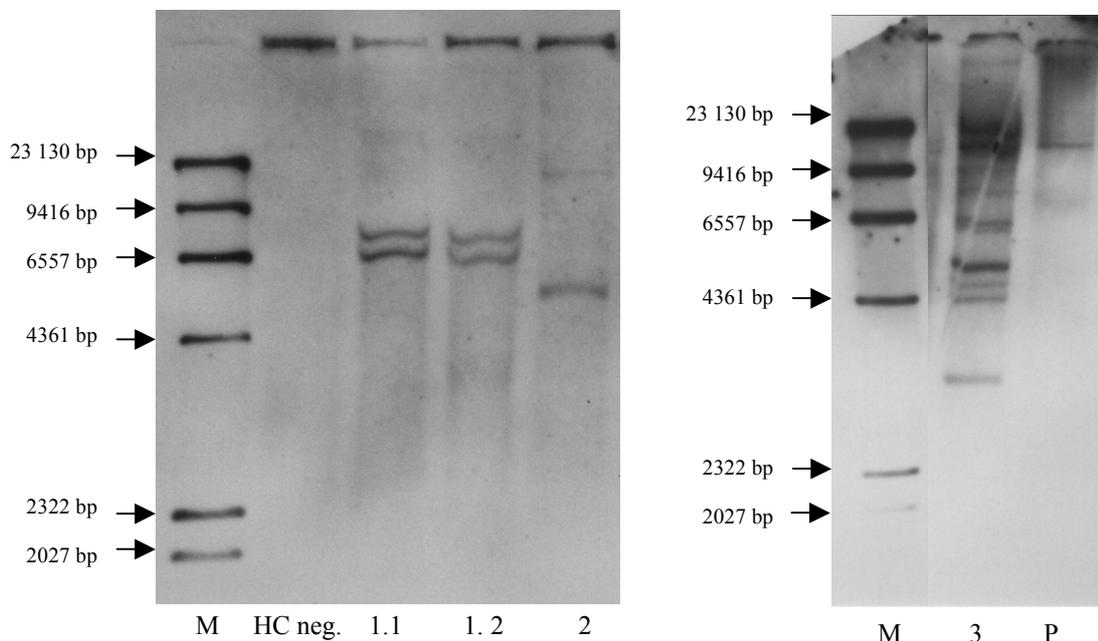
In der Probe der genomischen DNA nicht-transgener *Holsteiner Cox*- und *Elstar*-Kontrollpflanzen trat nach der Hybridisierung mit der *vs1*-Sonde kein Signal auf.

Bei den untersuchten transgenen *Holsteiner Cox* Linien variierte die Anzahl integrierter *vs1*-Genkopien stark. In die Linien T/HC 50 und T/HC 30.2 wurde das Stilbensynthasegen

jeweils einmal integriert. Die Linien T/HC 12, 2, 17, 27.3 und 21 wiesen je zwei *vst1*-Kopien auf und die Linie 1 aus der Transformation T/HC C1 drei bis vier Kopien. Bei der Linie 45.3 traten sechs Hybridisierungssignale auf. Die Regeneratpflanzen der *Elstar* Transformation T/E 00.1 wiesen die Integration von drei *vst1*-Genkopien auf.

### 3.5.2.2 K-PGIP transgene Pflanzen

*Bam*H1 bzw. *Sac*I besitzen eine singuläre Erkennungssequenz im PGIP-Gen bzw. der T-DNA des binären Plasmides pSCP2. Der Nachweis des Gens in den Apfelpflanzen erfolgte daher nach vorheriger Restriktionsspaltung der pflanzlichen DNA mit den genannten Enzymen.



**Abb. 3.15:** Nachweis der Integration des PGIP-Gens aus Kiwi in die genomische DNA verschiedener *Holsteiner Cox* Linien mittels *Southern Blot* Analyse nach Restriktion mit *Sac*I bzw. *Bam*H1. Untersucht wurden die Linien 1.1, 1.2, 2 und 3, die aus der Transformation T/HC 01.1 hervorgegangen sind. Bahn M: Dig-markierter DNA-MolekulargewichtsmarkerII, P: linearisiertes Plasmid pSCP2.

Die Negativ-Kontrolle in Form einer nicht transgenen *Holsteiner Cox* Pflanze zeigte nach der Hybridisierung mit der Dig-markierten K-PGIP-Sonde kein Signal. Die beiden an Explantat Nr. 1 regenerierten Sprosse (T/HC 01.1.1.1 und T/HC 01.1.1.2) wiesen ein identisches Integrationsmuster zweier PGIP-Kopien auf und wurden daher einer Linie (T/HC 01.1.1) zugeordnet. Ebenfalls zwei Integrationen des K-PGIP-Gens wies die Linie 2

auf. Die Anzahl der Kopienanzahl bei Klon 3 konnte aufgrund der vielen Hybridisierungssignale nur abgeschätzt werden. Die Mindestkopienzahl lag bei 10.

### 3.5.3 Expressionsanalysen

Die Expression der Transgene auf Transkriptionsebene wurde über eine Amplifikation spezifischer m-RNA bzw. cDNA-Fragmente mittels RT-PCR untersucht.

Bei der Isolation der Gesamt-RNA können trotz eines Abbaus der DNA mit DNaseI DNA-Kontaminationen im Isolationsansatz verbleiben. Bei dem Umschreiben der mRNA in cDNA verbleiben so eventuell DNA-Kontaminationen in der Probe und können in der PCR als *Template* für die Primer fungieren und zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Um dies zu vermeiden, können die Primer z.B. so gewählt werden, daß sie ein Intron flankieren. Das Amplifikationsprodukt der von der gespleißten mRNA abgeleiteten cDNA ist dann entsprechend der Größe des Introns kleiner und kann von amplifizierten Fragmenten von DNA-Kontaminationen differenziert werden.

Diese Strategie wurde bei der Detektion der mRNA der Stilbensynthase angewendet.

Eine andere Möglichkeit, DNA-Kontaminationen zu detektieren ist, parallel zum Einsatz der cDNA als *Template*, ebenfalls die RNA aus dem Isolationsansatz in einem gesonderten Ansatz einzusetzen. Eventuelle DNA-Kontaminationen innerhalb der isolierten RNA können so nachgewiesen werden und bei der Bewertung der Ergebnisse der RT-PCR mit berücksichtigt werden.

Diese Methode wurde bei der Untersuchung der Expression des PGIPs-Gens durchgeführt.

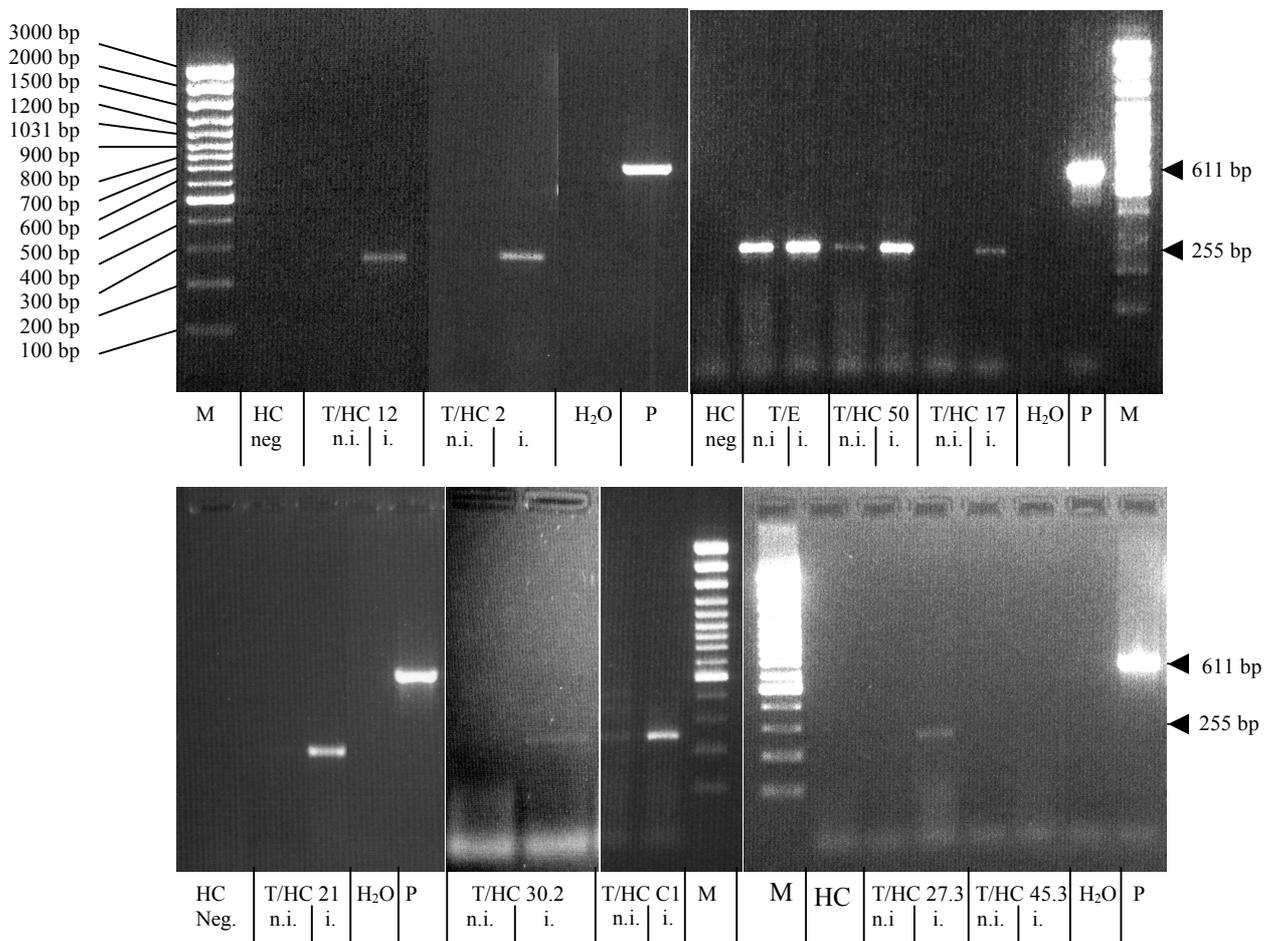
#### 3.5.3.1 Stilbensynthase-transgene Pflanzen

##### 3.5.3.1.1 Nachweis der Expression des *vst1*-Gens

Das *vst1*-Gen aus *Vitis vinifera* L. wird durch den eigenen wund,- elicitor- und UV-induzierbaren Promotor reguliert. Bei der Überprüfung der heterologen Expression des *vst1*-Gens in transgenen Apfelpflanzen erfolgte die Induktion des Gens durch mechanisches Verwunden der Blätter mit einer Pinzette. Die Isolation der Gesamt-RNA wurde eine Stunde nach der Induktion durchgeführt. Von neun zuvor durch PCR und *Southern Blot* charakterisierten transgenen *Holsteiner Cox* Linien und der transgenen *Elstar* Linie sowie deren Kontrollpflanzen wurde sowohl im nicht-induzierten (n.i.) als auch im induzierten (i.) Zustand RNA isoliert.

Die verwendeten Primer zum Nachweis des *vst1*-Gens binden an Position 1710 bp und 2321 bp und flankieren damit ein Intron. Auf Ebene der DNA wird somit ein Fragment der Größe 611 bp amplifiziert. Nach der Prozessierung ist das amplifizierte Fragment um die Größe des Introns reduziert und beträgt auf mRNA- bzw. cDNA-Level nur noch 255 bp.

Die Abbildung 3.16 zeigt die Ergebnisse der RT-PCRs der *vst1*-transgenen *Elstar* und *Holsteiner Cox* Linien.



**Abb. 3.16: Expressionsanalyse der *vst1*-transgenen Pflanzen durch Nachweis der *vst1*-mRNA mit RT-PCR.** Die RNA wurde jeweils im nicht-induzierten (n.i.) Zustand sowie nach einer Induktion (i.) des *vst1*-Promotors (durch Verletzung des Blattmaterials) isoliert.

Wie die Abbildungen verdeutlichen, wurde für die transgene *Elstar* Linie sowie für acht der neun transgenen *Holsteiner Cox* Linien das erwartete Fragment der Größe 255 bp

amplifiziert. In keiner der eingesetzten Proben wurde ein aus DNA-Kontaminationen resultierendes Fragment der Größe 611 bp amplifiziert.

Für die transgene Linie T/HC 45.3, die sechs *vst1*-Kopien besitzt (Abb. 3.14), wurde trotz dreimaliger Wiederholung der RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR kein *vst1*-Transkript nachgewiesen.

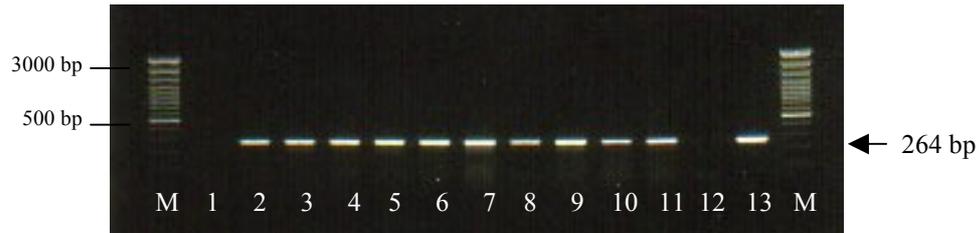
Die Plasmidkontrolle zeigte erwartungsgemäß das von der DNA amplifizierte Fragment der Größe 611 bp.

Die Ergebnisse bestätigen die Wundinduzierbarkeit des Promotors, da nach mechanischer Beschädigung des Blattmaterials die Transkription des *vst1*-Gens initiiert wurde. Bei allen getesteten *Holsteiner Cox* Linien bestand eine deutliche Korrelation der Stärke der Expression und der Induktion. Bei den Klonen T/HC 50 und T/HC c1/1 war ohne Induktion eine schwache Bande erkennbar, bei den übrigen wurde kein Fragment des Gens amplifiziert. Im Gegensatz dazu wurde bei allen induzierten Proben das erwartete Fragment amplifiziert. Bei der transgenen Elstar Linie konnte auch ohne vorherige Induktion die *vst1*-mRNA nachgewiesen werden. Dieses war versuchsbezogen, bei einer wiederholten RT-PCR der transgenen Elstar Linie war bei der nicht induzierten Probe keine *vst1*-cDNA nachweisbar. Die Ergebnisse demonstrieren ebenfalls, dass die RNA erwartungsgemäß gespleißt wurde.

#### **3.5.3.1.2 Nachweis der Expression des *bar*-Gens**

Das *bar*-Gen kodiert für die Phosphinotricinacetyltransferase und wurde in der vorliegenden Arbeit als selektives Markergen eingesetzt. Es steht unter der Kontrolle des *nos*-Promotors und wird somit konstitutiv exprimiert. Für den Nachweis der Expression des *bar*-Gens in den *vst1*-transgenen Pflanzen wurden die selben cDNA-Proben verwendet, die auch in der Stilbensynthese-RT-PCR eingesetzt worden sind. Die Proben waren durch die *vst1*-RT-PCR als DNA-frei identifiziert worden (Abb. 3.16); das amplifizierte *bar*-Fragment kann daher nur aus der mRNA bzw. cDNA resultieren.

Die Ergebnisse der RT-PCR des *bar*-Gens sind in Abbildung 3.17 dargestellt.



**Abb. 3.17: Nachweis der *bar*-mRNA mit RT-PCR in *vst1*-transgenen Pflanzen.** M: 100bp-Größenmarker; Bahn 1: HC-Kontrolle; Bahn 2: T/Elstar 00.1; Bahn 3: T/HC C1/1; Bahn 4: T/HC 2; Bahn 5: T/HC 12; Bahn 6: T/HC 17; Bahn 7: T/HC 21; Bahn 8: T/HC 27.3; Bahn 9: T/HC 30.2; Bahn 10: T/HC 45.3; Bahn 11: T/HC 50; Bahn 12: H<sub>2</sub>O-Kontrolle; Bahn 13: Plasmid pHK<sub>vst</sub>.

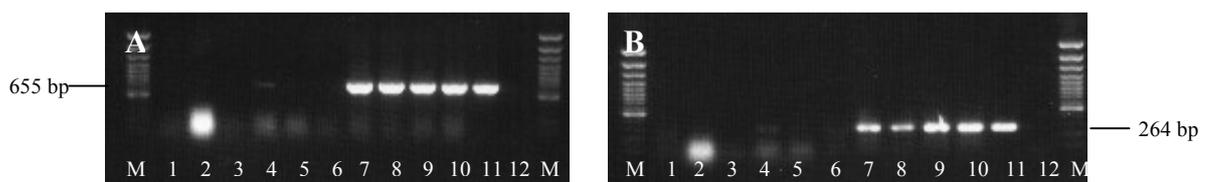
Die Herbizidresistenz der transgenen Pflanzen wurde durch die Expressionsanalyse des *bar*-Gens bestätigt. In allen untersuchten cDNA-Proben der transgenen Pflanzen wurde das Fragment mit der erwarteten Größe von 264 bp amplifiziert und entsprach damit der Plasmidkontrolle.

### 3.5.3.2 PGIP-transgene Pflanzen

#### 3.5.3.2.1 Nachweis der Expression des PGIP-Gens und des *bar*-Gens

Die transgenen Linien der Sorte *Holsteiner Cox* wurden hinsichtlich der Expression des PGIP-Gens sowie des *bar*-Gens untersucht. Da die Expressionsanalysen vor dem *Southern Blot* zum Nachweis der Integration durchgeführt wurden, wurde zu diesem Zeitpunkt noch von vier transgenen Linien ausgegangen.

Zur Überprüfung eventueller DNA-Kontaminationen wurde neben der generierten cDNA auch Gesamt-RNA der entsprechenden Proben eingesetzt. Die Abb. 3.18 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese der amplifizierten Genfragmente. Die Kennzeichnung der Proben ist Tab. 3.7 zu entnehmen.



**Abb. 3.18: Nachweis der PGIP- und *bar*-mRNA in transgenen *Holsteiner Cox* Pflanzen.**

**Tab. 3.7: Nachweis von PGIP-mRNA in transgenen Pflanzen mit RT-PCR.**

Bahn	Probe	Gel A (PGIP)	Gel B ( <i>bar</i> )
M	Längenmarker 100 bp+		
1	HC nicht transf.; RNA als <i>Template</i>	-	-
2	T/HC 01.1 Klon 1.1; RNA als <i>Template</i>	-	-
3	T/HC 01.1 Klon 1.2; RNA als <i>Template</i>	-	-
4	T/HC 01.1 Klon 2.1; RNA als <i>Template</i>	-/+	-/+
5	T/HC 01.1 Klon 3; RNA als <i>Template</i>	-	-
6	HC nicht transf.; RNA als <i>Template</i>	-	-
7	T/HC 01.1 Klon 1.1; cDNA als <i>Template</i>	+	+
8	T/HC 01.1 Klon 1.2; cDNA als <i>Template</i>	+	+
9	T/HC 01.1 Klon 2.1; cDNA als <i>Template</i>	+	+
10	T/HC 01.1 Klon 3; cDNA als <i>Template</i>	+	+
11	PSCP2-Plasmid	+	+
12	H <sub>2</sub> O	-	-

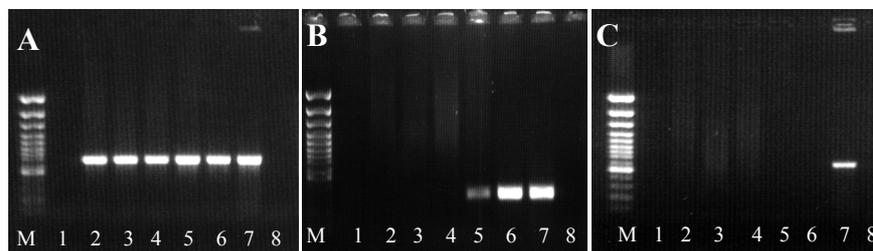
In allen Ansätzen, in denen die cDNA als *Template* eingesetzt wurde, wurde das erwartete Fragment der Größe von 655 bp amplifiziert und entsprach damit dem Amplifikationsprodukt der Kontroll-Plasmid-DNA. Lediglich in einer der RNA-Kontrollproben wurde eine sehr schwache Bande detektiert, die auf DNA-Verunreinigungen schließen läßt. Dennoch kann ein falsch positives Signal der cDNA Probe des Klons 2.1 aufgrund der Kontamination als unwahrscheinlich eingestuft werden, da die Intensität des Amplifikationsproduktes der cDNA deutlich stärker war als das der RNA-Probe.

### 3.5.4 Transfer von Plasmidsequenzen ausserhalb der T-DNA

Bei dem *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer wird der Bereich zwischen der linken und rechten Bordersequenz, die T-DNA, des Vektor-Plasmides in die Pflanzenzellen übertragen. Literaturangaben (KONONOV et al. 1997, MARTINEAU et al. 1994, RAMANATHAN & VELUTHAMBI 1995, CLUSTER et al. 1996, VAN DER GRAAFF et al. 1996, WENCK et al. 1997, WOLTERS et al. 1998, DE BUCK et al. 2000) weisen jedoch darauf hin, dass auch Vektorsequenzen ausserhalb der T-DNA, vom sog. Rückgrat, in die Pflanzenzellen übertragen werden können. Da sowohl das Stilbensynthaseplasmid pHK<sub>vst</sub> als auch das PGIP-Konstrukt pSCP2 auf dem Vektor pGPTV (BECKER et al. 1992)

basieren und damit Derivate des pBIN19 sind, tragen beide auf dem Rückgrat ein Kanamycin-Resistenzgen. Anhand des Nachweises dieses Gens in DNA-Proben transgener Pflanzen mit Hilfe der PCR wurde auf Anwesenheit von Rückgratsequenzen des Vektors getestet. Um ein positives Signal aufgrund evt. persistierender Agrobakterien auszuschliessen, wurden die Proben parallel einer PCR mit Agrobakterien-spezifischen Primern unterzogen. Zusätzlich wurde erneut auf Anwesenheit des Transgens geprüft. Getestet wurden alle Linien der PGIP- und *vst1*-transgenen Pflanzen.

Die Abb. 3.19 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese der amplifizierten Fragmente der PGIP transgenen Pflanzen. Die Probenzuordnung kann der Tab. 3.8 entnommen werden.



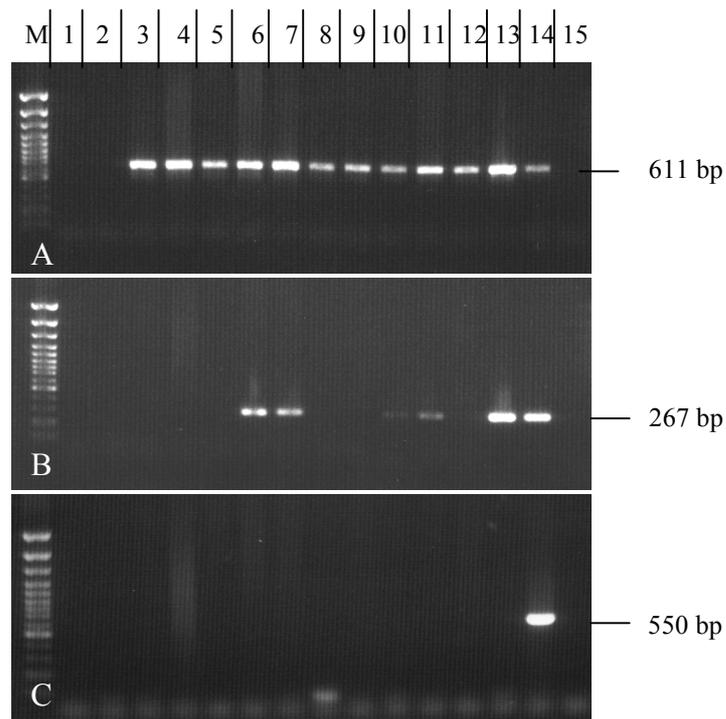
**Abb. 3.19:** Überprüfung des Transfers von Rückgratsequenzen des eingesetzten Vektors anhand des ausserhalb der T-DNA befindlichen Kanamycin-Resistenzgens in das Pflanzengenom PGIP-transgener Pflanzen. Gel A: Amplifizierte Fragmente des K-PGIP-Gens. Gel B: Amplifizierte Fragmente des *aphIII*-Gens. Gel C: PCR-Amplifikation eines Agrobakterien-spezifischen Genfragmentes.

**Tab. 3.8:** Probenzuordnung der PCR-Analysen zum Nachweis von Rückgratsequenzen im Genom transgener PGIP-Holsteiner Cox Pflanzen.

Bahn	Probe	Gel A PGIP-PCR (655 bp)	Gel B aphIII-PCR (267 bp)	Gel C Agrobakterien-spezifische PCR (550 bp)
M	100bp+ Größenmarker	----	----	----
1	HC nicht transf.	-	-	-
2	T/HC 01.1/ 1.1	+	-	-
3	T/HC 01.1/ 1.2	+	-	-
4	T/HC 01.1/2.1	+	-	-
5	T/HC 01.1/ 3	+	+	-
6	Plasmid pSCP2	+	+	-
7	EHA105/pSCP2	+	+	+
8	H <sub>2</sub> O	-	-	-

Die verwendeten Primer Kan/bin 999 und Kan/bin 1266 binden an den Positionen 999 bp und 1266 bp des *aphIII*-Gens und führen somit zur Amplifikation eines Fragments der Größe 267 bp. Bei der Überprüfung der PGIP-transgenen *Holsteiner Cox* Pflanzen hinsichtlich des Transfers von Rückgratsequenzen wurde bei der Probe T/HC01.1.3 ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert (Gel B, Bahn 5). In der pSCP2-Plasmid Kontrolle und ebenso in der Agrobakterienkontrolle wurde eine Bande der gleichen Größe detektiert. Ein positives Signal aufgrund persistierender Agrobakterien kann ausgeschlossen werden, da diese in den Proben der transgenen Pflanzen mit Hilfe der PCR nicht nachgewiesen werden konnten (Gel C). Lediglich die Positiv-Kontrolle in Form denaturierter Agrobakterien (EHA105/pSCP2) gab ein positives Signal (Gel C, Bahn 7).

Des weiteren wurden bei der Überprüfung der *vst1*-transgenen Pflanzen vier Linien identifiziert, die ebenfalls die Integration des *aphIII* Gens bzw. Sequenzabschnitten des Gens aufwiesen (Abb.3.20). Betroffen waren die transgenen *Holsteiner Cox* Linien T/HC 12, 17, 30.2 und 45.3.



**Abb. 3.20: Überprüfung des Transfers von Rückgratsequenzen des eingesetzten Vektors anhand des Kanamycin-Resistenzgens in das Pflanzengenom *vst1*-transgener Pflanzen.**

Gel A: Amplifizierte Fragmente des *vst1*-Gens. Gel B: Amplifikation des *aphIII*-Fragments. Gel C: PCR-Amplifikation eines Agrobakterien-spezifischen Genfragments. Die Proben-zuordnung ist der Tab. 3.9 zu entnehmen.

**Tab. 3.9: Probenzuordnung der PCR-Analysen zum Nachweis von Rückgratsequenzen im Genom transgener *vsf1*-Pflanzen.**

Bahn	Probe	Gel A	Gel B	Gel C
		<i>vsf1</i> -PCR (611 bp)	<i>aphIII</i> -PCR (264 bp)	Agrobakterien- spezifische PCR (550 bp)
M	100bp+ Größenmarker	----	----	----
1	HC nicht transf.	-	-	-
2	Elstar nicht transf.	-	-	-
3	T/E 00.1	+	-	-
4	T/HC C1.1	+	-	-
5	T/HC 2	+	-	-
6	T/HC 12	+	+	-
7	T/HC 17	+	+	-
8	T/HC 21	+	-	-
9	T/HC 27.3	+	-	-
10	T/HC 30.2	+	-/+	-
11	T/HC 45.3	+	+	-
12	T/HC 50	+	-	-
13	Plasmid pHKvst	+	+	-
14	EHA105/pHKvst	+	+	+
15	H <sub>2</sub> O	-	-	-

Ob das Kanamycin-Resistenzgen vollständig oder lediglich Fragmente des Gens in das pflanzliche Genom integriert wurden, konnte bis zum Ende der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Ebenso können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob der gesamte Vektor in die Pflanzengenome integriert wurde.

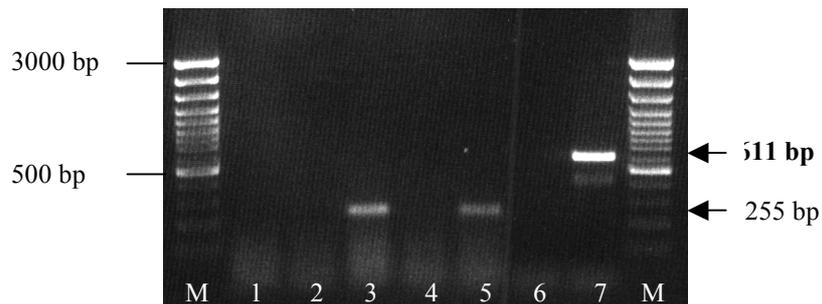
### 3.6 Nachweis von Resveratrol mit HPLC

Die Aktivität der Stilbensynthase in den *vst1*-transgenen Pflanzen wurde über den Nachweis des Syntheseproduktes Resveratrol überprüft. Pflanzenextrakte *vst1*-transgener und Kontrollpflanzen wurden dazu einer HPLC-Analyse unterzogen.

#### 3.6.1 Induktion des *vst1*-Promotors

Der Nachweis des Resveratrols in den transgenen Pflanzen bedingte die vorherige Expression der Stilbensynthase und damit die Induktion des Stilbensynthase-Promotors.

Um eine gleichmäßige und für das Pflanzengewebe schonende Induktion des Promotors zu erreichen, wurde die UV-Bestrahlung gewählt (LANGCAKE & PRYCE 1977, SCHÖPPNER & KINDL 1979, HAIN et al. 1990). Die Induzierbarkeit des *vst1*-Promotors durch 5-minütige UV-Bestrahlung wurde anhand des Nachweises des *vst1*-Transkripts mittels RT-PCR überprüft und zweifelsfrei nachgewiesen (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Induktion des *vst1*-Promotors durch 5-minütige UV-Bestrahlung.** M = 100bp+ Leiter; Bahn 1: HC-Kontrollpflanze; Bahn 2: transgene HC Pflanze (T/HC 12) nicht induziert; Bahn 3: transgene HC Pflanze (T/HC 12) nach 5 min. UV-Bestrahlung; Bahn 4: transgene *Elstar* Pflanze nicht induziert, Bahn 5: transgene *Elstar* Pflanze nach 5 min. UV-Bestrahlung, Bahn 6: H<sub>2</sub>O; Bahn 7: Plasmid pHK*vst*.

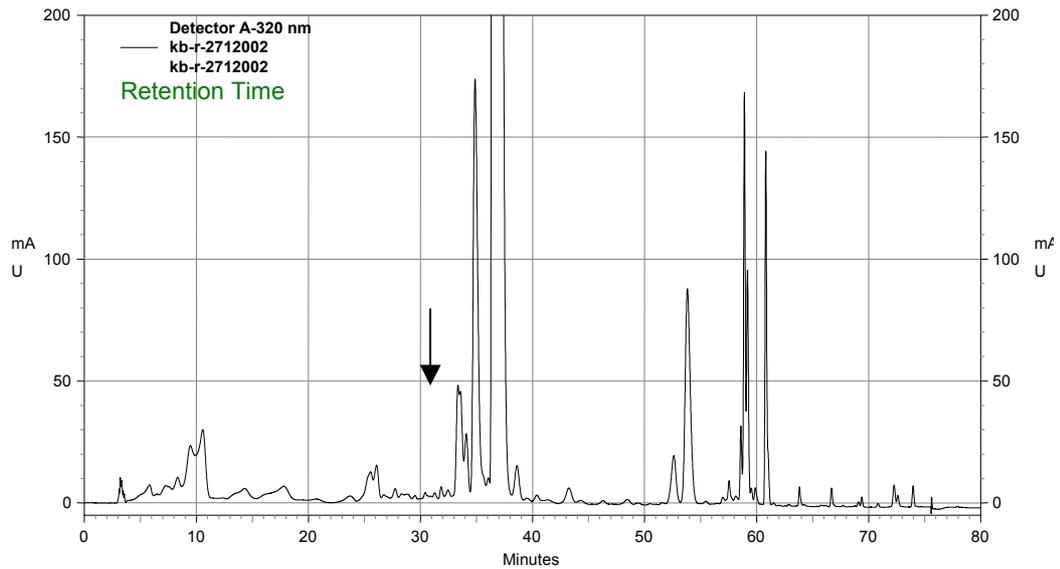
Bei den induzierten transgenen Pflanzen wurde das erwartete Fragment der Größe 255bp von der gespleißten mRNA (cDNA) amplifiziert. Das vom Plasmid amplifizierte Fragment zeigte die erwartete Größe von 611bp.

### 3.6.2 HPLC-Analysen

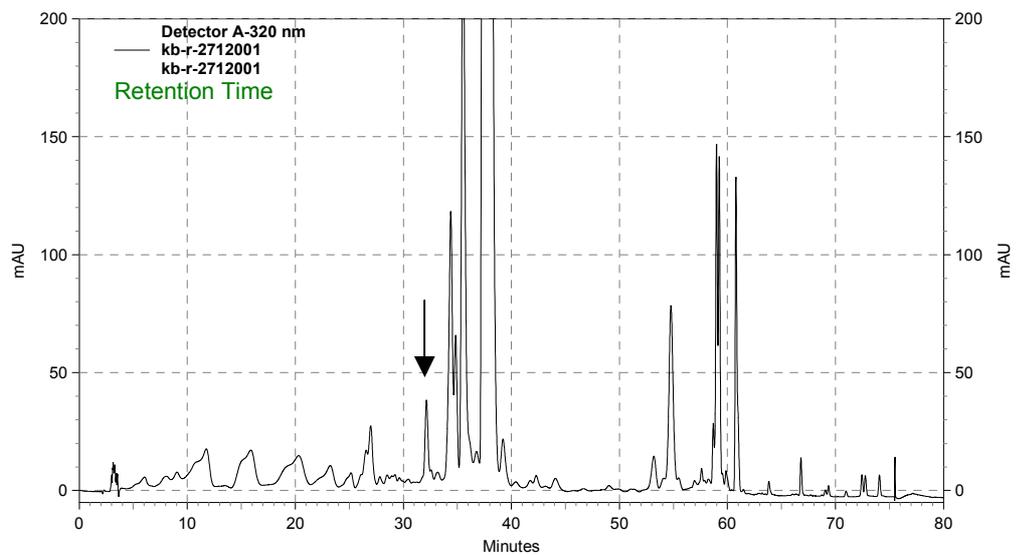
Die HPLC-Analysen zum Nachweis von Resveratrol wurden mit Pflanzenextrakten der *vst1*-transgenen *Holsteiner Cox* Linien T/HC 30.2, T/HC 50, T/HC 12 und T/HC 2 sowie einer nicht-transformierten *Holsteiner Cox* Pflanze durchgeführt. Die Aufreinigung der Proben erfolgte 24h nach UV-Induktion des *vst1*-Promotors.

In allen Proben der untersuchten transgenen *Holsteiner Cox* Linien trat bei der Retentionszeit von 31,5 min ein unbekannter Peak auf (Abb. 3.23 – 3.26), der nicht in der Kontrollprobe detektiert wurde (Abb. 3.22). Zwar lag die erwartete Retentionszeit von freiem Resveratrol bei 38,5 min, da jedoch die UV-Spektren des unbekanntes Peaks (31,5 min) und des Resveratrol-Peaks (38,5 min) übereinstimmten (Abb. 3.27), lag die Vermutung nahe, dass ein Resveratrol-Derivat vorlag. Die Absorptionsmaxima lagen entsprechend der Literaturangaben (LANGCAKE & PRYCE 1976, JEANDET et al. 1997, PEZÉT et al. 1994, HIPSKINDS & PAIVA 2000) um 307 nm und 320 nm. Die Bestätigung, dass es sich tatsächlich um ein Resveratrol-Derivat handelte, erbrachte eine anschließend durchgeführte saure Hydrolyse, die zur Detektion von freiem Resveratrol (Abb. 3.29) führte.

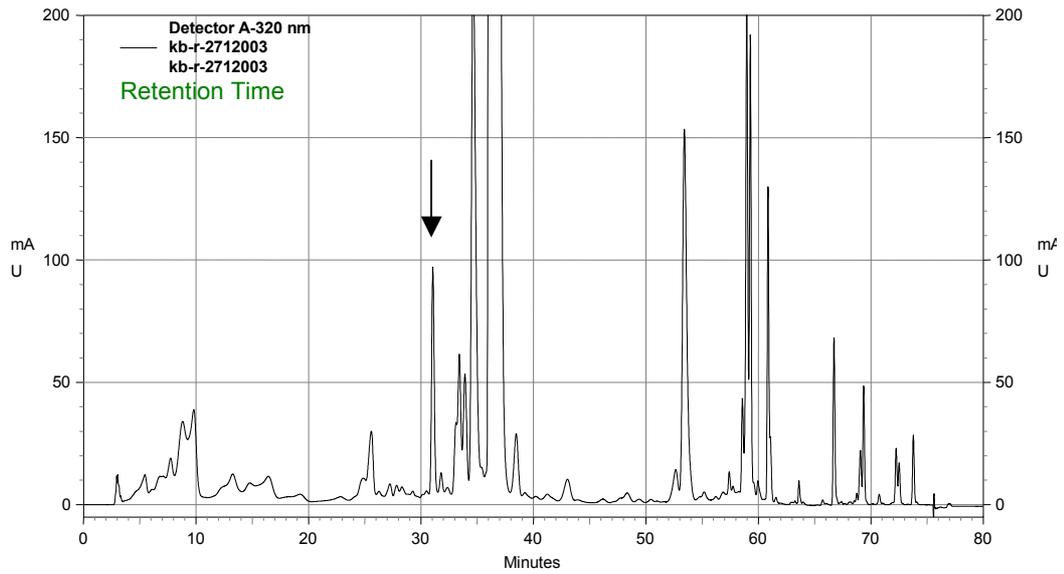
Aufgrund dieser Ergebnisse sowie der reduzierten Retentionszeit kann davon ausgegangen werden, dass das Resveratrol durch die Addition einer hydrophilen Gruppe modifiziert wurde und möglicherweise glykosidisch gebunden vorliegt (JEANDET et al. 1997). Die Absorptionsspektren werden durch eine glykosidische Bindung kaum beeinflusst (mündliche Mitteilung K. Briviba, ROMERO-PÉREZ et al. 2001, DOMÍNGUEZ et al. 2001, JEANDET et al. 1997).



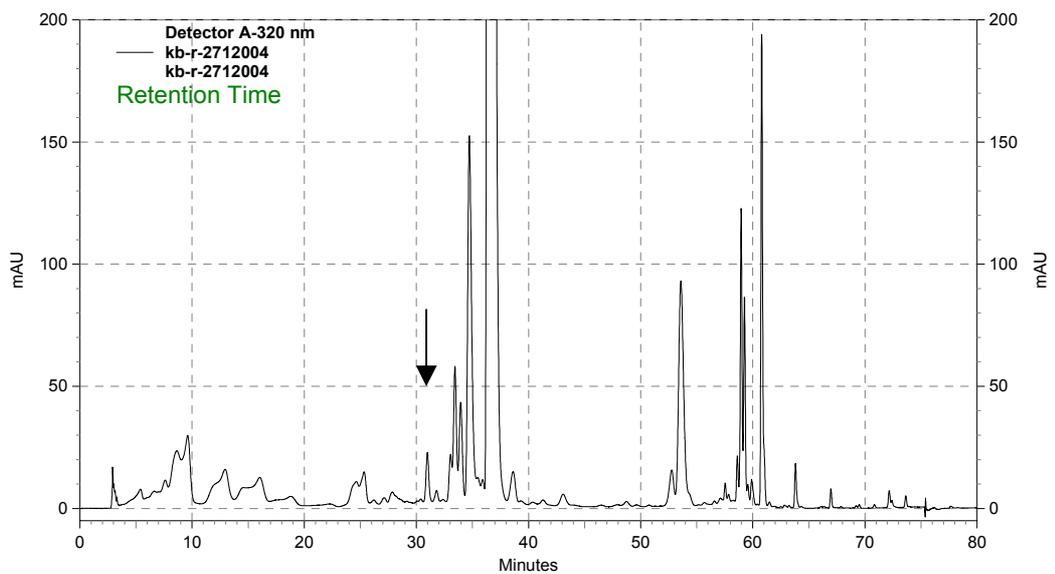
**Abb. 3.22:** HPLC-Analyse einer nicht-transgenen *Holsteiner Cox* Kontrollpflanze. Im Gegensatz zu den Proben der transgenen Pflanzen trat hier kein Signal bei einer Retentionszeit von 31,5 min auf.



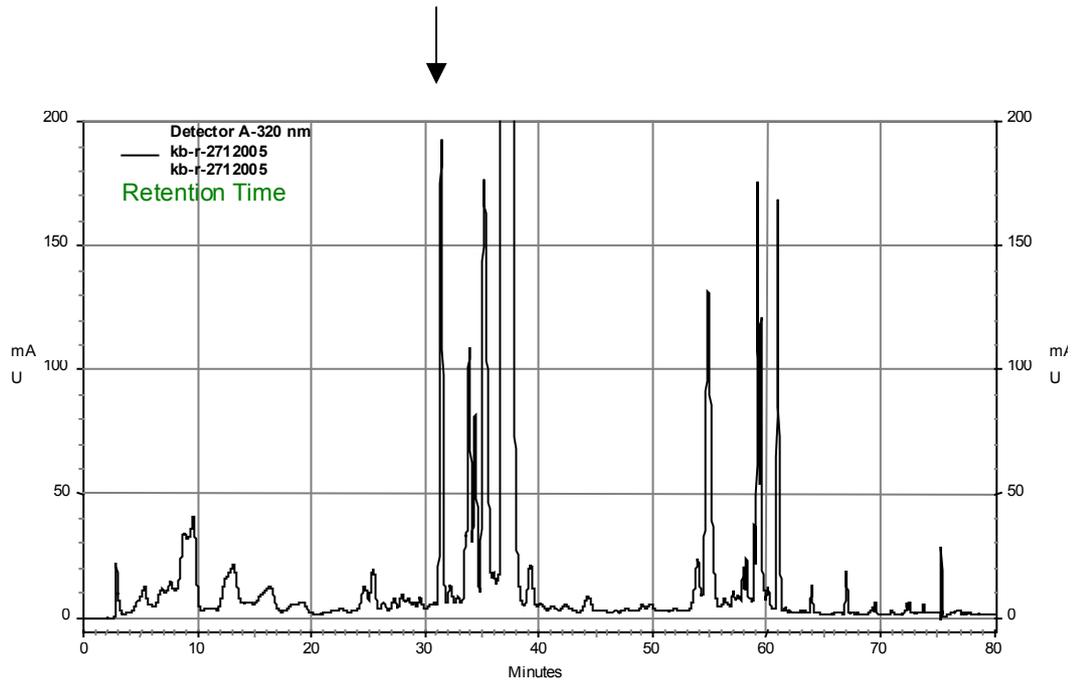
**Abb. 3.23:** Chromatogramm der HPLC-Analyse der Probe T/HC 30.2. Diese transgene *Holsteiner Cox* Linie hat eine Kopie des *vs1*-Gens integriert. Bei einer Retentionszeit von 31,5 min trat ein Peak auf, der nicht in der Kontrollprobe detektiert wurde (Pfeil).



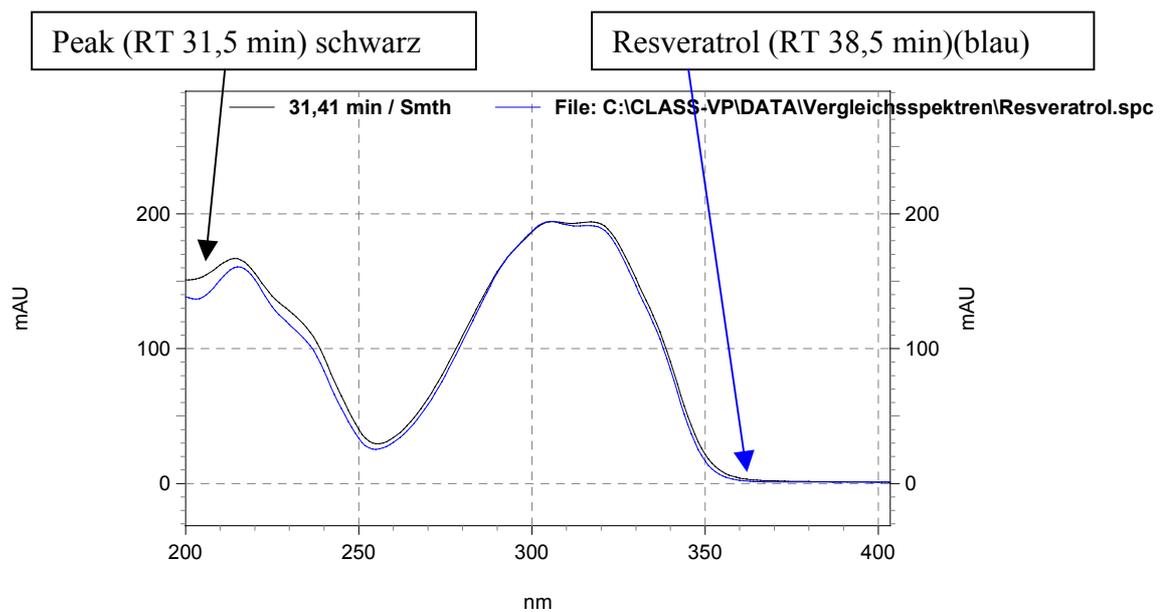
**Abb. 3.24:** Chromatogramm der HPLC-Analyse der Probe T/HC 12. Laut *Southern Blot* wurden zwei *vs1*-Genkopien integriert. Bei einer Retentionszeit von 31,5 min trat ein Peak auf, der nicht in der Kontrollprobe detektiert wurde (Pfeil).



**Abb. 3.25:** Chromatogramm der HPLC-Analyse der Probe T/HC 50. Diese transgene *Holsteiner Cox* Linie hat eine Kopie des *vs1*-Gens integriert. Bei einer Retentionszeit von 31,5 min trat ein Peak auf, der nicht in der Kontrollprobe detektiert wurde (Pfeil).



**Abb. 3.26:** Chromatogramm der HPLC-Analyse der Probe T/HC 2. Diese transgene Linie enthält laut *Southern Blot* Analysen zwei *vst1*-Integrationen. Bei einer Retentionszeit von 31,5 min trat ein Peak auf, der nicht in der Kontrollprobe detektiert wurde (Pfeil).



**Abb. 3.27:** Vergleich der Absorptionsspektren von Resveratrol und dem Peak aus den Proben der transgenen *Holsteiner Cox* Pflanzen.

Die saure Hydrolyse wurde mit der Probe T/HC 2 durchgeführt. Sie führte zur Freisetzung von Resveratrol (Abb. 3.29).

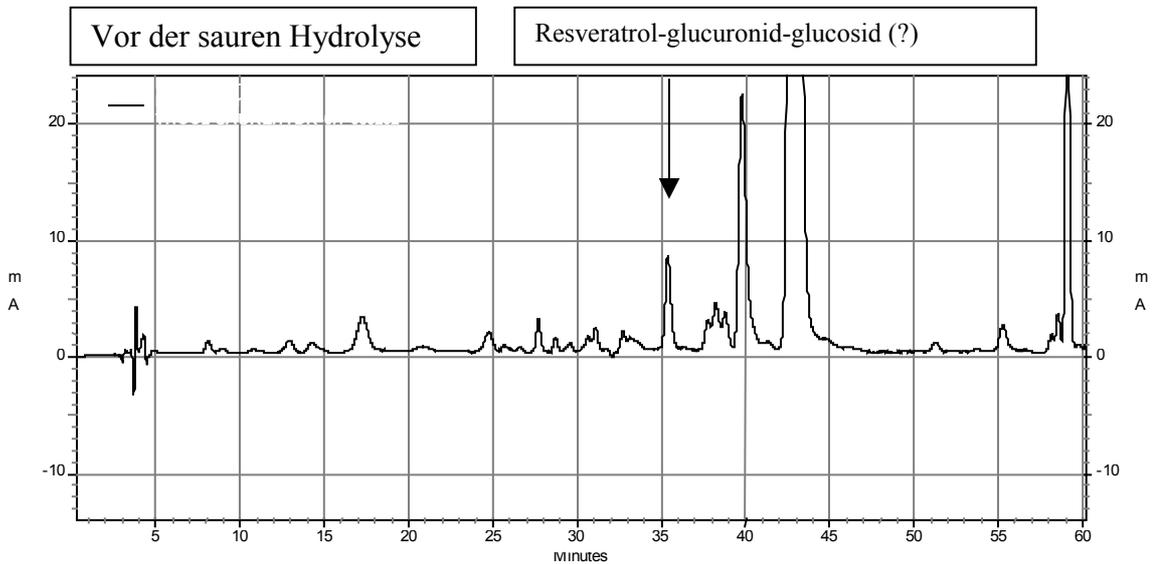


Abb. 2.28: Chromatogramm der Probe der transgenen Linie T/HC 2 vor der sauren Hydrolyse. Der Pfeil markiert den Peak des Resveratrol-Derivates.

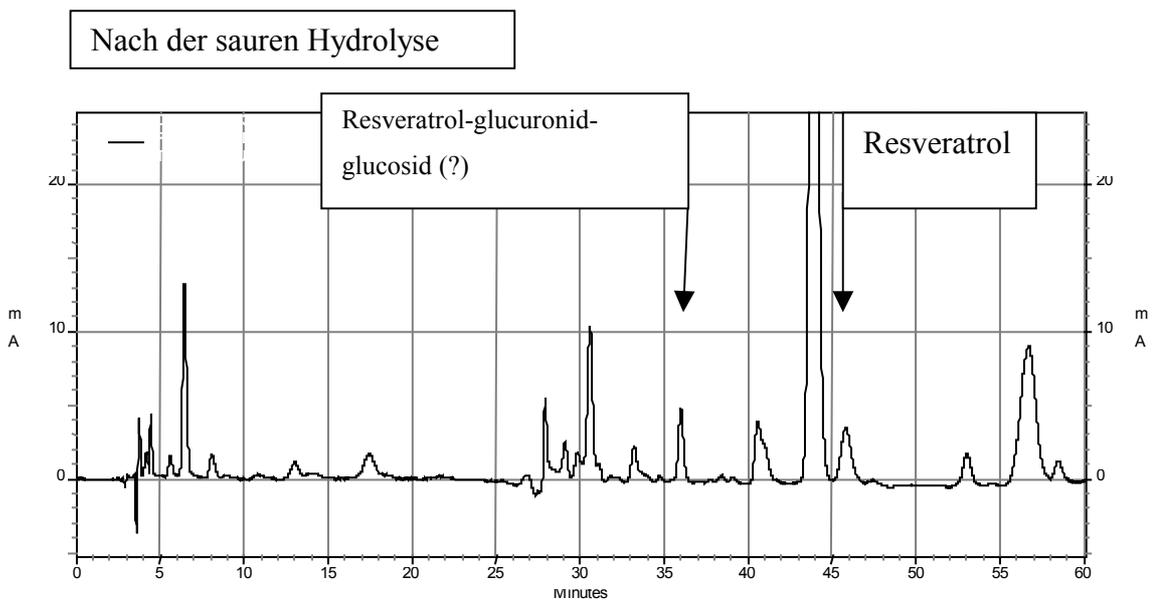
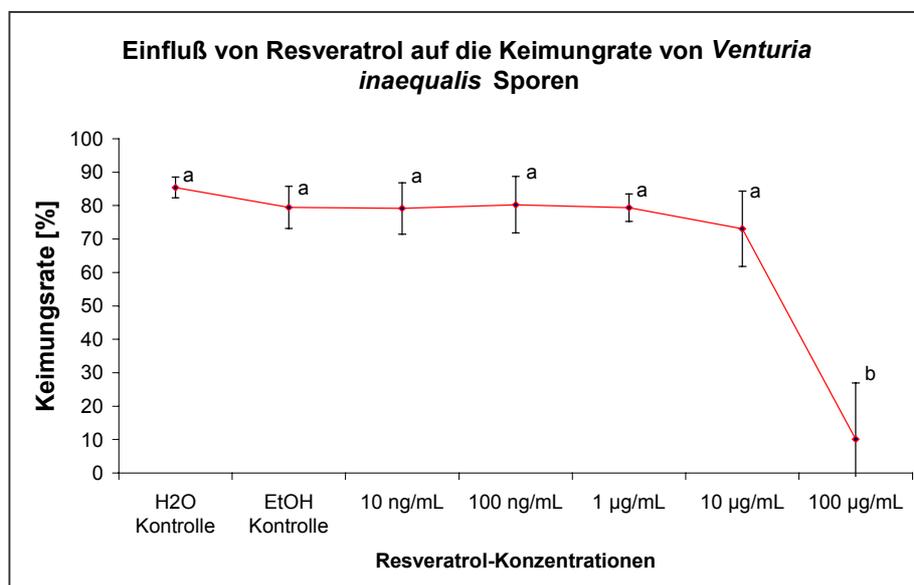


Abb. 3.29: Nachweis des durch Hydrolyse freigesetzten Resveratrols in der transgenen *Holsteiner Cox* Linie T/HC 2.

### 3.7 Einfluss von Resveratrol auf die Sporenkeimung von *Venturia inaequalis*

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von Resveratrol gegenüber dem Apfelschorferreger *Venturia inaequalis*, wurden *in vitro* Keimungstests auf Wasseragar, supplementiert mit steigenden Resveratrolkonzentrationen, durchgeführt. Um den Einfluss des Lösungsmittels (EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50) der Reinsubstanz Resveratrol in der Auswertung zu berücksichtigen, wurde jeweils neben einer Kontrolle, die anstatt des Resveratrols Wasser enthielt, eine Kontrolle, die nur das Lösungsmittel enthielt, in die Untersuchung mit einbezogen.

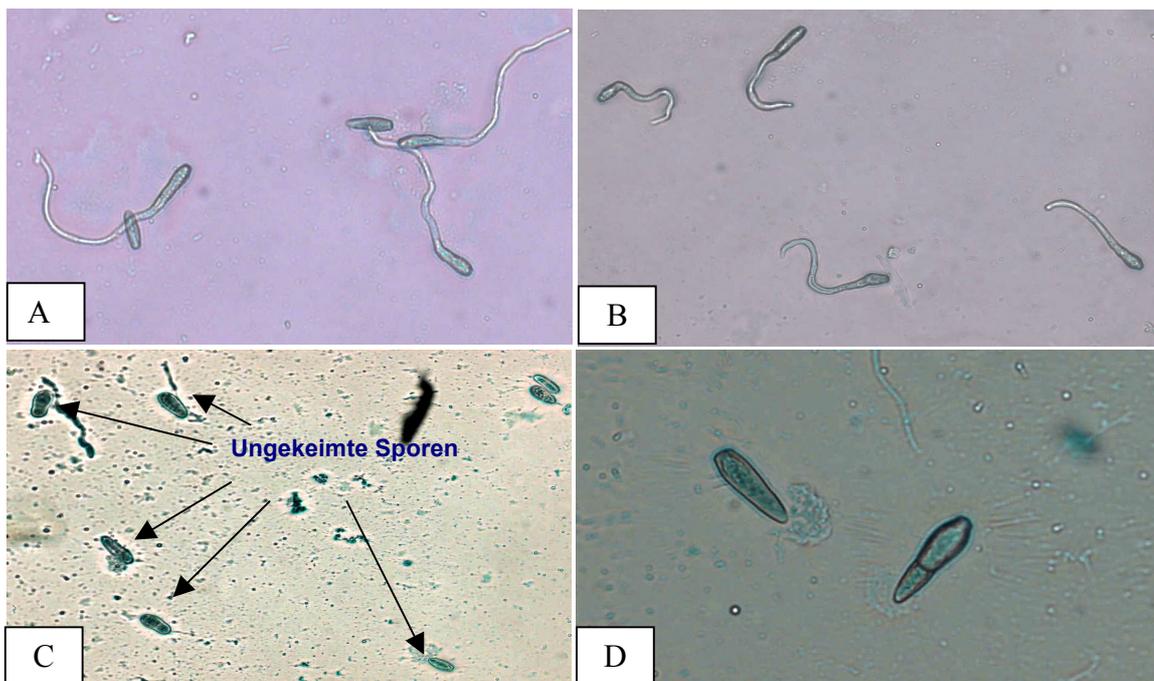
Die Keimung der Sporen auf Wasseragar vollzieht sich in Form einer Entwicklung von Keimschläuchen. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der gekeimten und ungekeimten Konidien mit Hilfe eines Mikroskops. Die Keimungsrate gibt den prozentualen Anteil der gekeimten Sporen an und ist in der Abbildung 3.30 graphisch dargestellt.



**Abb. 3.30:** Einfluß steigender Resveratrolkonzentrationen auf die Keimungsrate von *Venturia inaequalis*-Sporen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Werte, die mit dem gleichem Buchstaben gekennzeichnet sind, sind nach dem Tuckey Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0.05$  nicht signifikant unterschiedlich.

Das Lösungsmittel allein führte zwar zu einer deutlichen Verkürzung der Länge der Keimschläuche (Abb. 3.31b), nicht aber zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Keimungsrate im Vergleich zur Wasserkontrolle (Abb. 3.30). Die Keimungsrate auf Wasseragar ohne Resveratrolzusatz betrug durchschnittlich 85,4%, die Keimung auf ethanolhaltigem Agar durchschnittlich 79,4%. Der Einfluss des Lösungsmittels (EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50) auf die Keimrate konnte daher vernachlässigt werden.

Bis zu einer Konzentration von 10 µg/l Resveratrol wurde kein keimungsinhibierender Effekt verzeichnet. Die Supplementierung des Mediums mit 100 µg/l Resveratrol führte jedoch zu einer signifikanten Hemmung der Sporenkeimung, sowohl im Vergleich zur Wasserkontrolle als auch im Vergleich zur EtOH-Kontrolle. Bei dieser Konzentration keimten durchschnittlich lediglich 10,17% der Sporen (Abb. 3.30).



**Abb. 3.31: Effekt von Resveratrol auf die Sporenkeimung und die Länge der Keimschläuche von *Venturia inaequalis*.**

- Kontrolle: Keimung der Sporen nach 24h Kultur auf Wasseragar (100-fache Vergrößerung).
- EtOH-Kontrolle: Keimung der Sporen nach 24h auf Wasseragar supplementiert mit dem Lösungsmittel [EtOH/H<sub>2</sub>O 50:50] (100-fache Vergrößerung). Die Keimschläuche sind deutlich verkürzt im Vergleich zur Wasserkontrolle.
- und d) Ungekeimte Sporen (Pfeile) nach 24h Kultur auf Agar supplementiert mit 100µg/l Resveratrol (c: 100-fache Vergrößerung, d: 400-fache Vergrößerung).

## 3.8 Infektion mit Apfelpathogenen

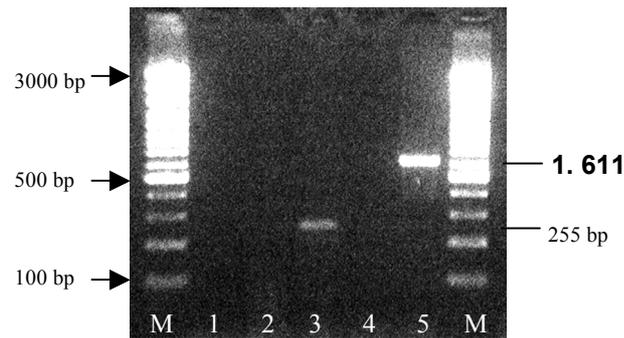
### 3.8.1 Mehltau (*Podosphaera leucotricha* [Ell. et Ev.] Salm)

Zur Begutachtung des Resistenzverhaltens der *vst1*-transgenen Pflanzen gegenüber dem Mehltau verursachenden Pilz *Podosphaera leucotricha* wurde zum einen die Entwicklung der Konidien sowie das Ausmaß der Ausbreitung des Pilzes auf der Blattoberfläche transgener Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen nach gezielten Inokulationen untersucht.

Die Infektion der Blätter erfolgte durch Übertragung von *Podosphaera leucotricha* Konidien, die die Nebenfruchtform des Pilzes darstellen. Mit einer sog. Penetrationshyphne dringt der Pilz in die Epidermis ein und erweitert sich zum Haustorium. Bereits nach einigen Tagen überzieht ein reichverzweigtes somatisches Hyphengeflecht als Mycel die Blattoberfläche und bildet Konidienträger, die dann wiederum Konidien entwickeln. Das sich ausbreitende Mycel manifestiert sich als sichtbares Symptom und kann ebenso wie die Anzahl der gebildeten Konidien pro Konidienträger (KRIEGHOFF 1995) zur Bewertung des Resistenzverhalten der transgenen Pflanzen im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollpflanzen herangezogen werden.

#### 3.8.1.1 *vst1*-Promotor Induktion durch Pathogenbefall

Voraussetzung für die antifungale Wirkung des Produktes des Transgens gegen Pathogene ist dessen Verfügbarkeit bei Pathogenbefall. Die Elicitorinduzierbarkeit des Stilbensynthasepromotors durch spezifische Apfelpathogene muss daher gewährleistet sein. Um dies zu überprüfen, wurden an der BAZ in Ahrensburg transgene Pflanzen sowie Kontrollpflanzen mit Mehltau infiziert. Von der transgenen *Holsteiner Cox* Linie 21 wurde von einem stark mit der Einsporlinie FGDT6 infizierten Blatt RNA isoliert und eine cDNA generiert. Diese wurde einer RT-PCR mit *vst1*-Primern unterzogen. Als Kontrollen dienten eine ebenfalls infizierte aber nicht transgene *Holsteiner Cox* Pflanze sowie eine nicht-infizierte Gewächshauspflanze der transgenen *Holsteiner Cox* Linie 21. Die Abb. 3.32 zeigt das Ergebnis der RT-PCR.



**Abb. 3.32.: *vsf1*-Promotorinduktion durch Mehлтаubefall.**

Bahn M: 100bp+ Längenstandard, Bahn 1: Nicht-transgene *Holsteiner Cox*-Pflanze mit Mehltau-Einsporlinie FGDT6 infiziert, Bahn 2: transgener HC Klon Nr. 21 nicht infiziert, Bahn 3: transgener HC Klon Nr. 21 mit Mehltau-Einsporlinie FGDT6 infiziert, Bahn 4: H<sub>2</sub>O-Kontrolle, Bahn 5: Plasmid pHK<sub>vsf1</sub>.

Wie aus Abbildung 3.32 deutlich hervorgeht, war es möglich, durch die Mehltau-Infektion die Expression des Stilbensynthasegens zu induzieren. Das amplifizierte cDNA-Fragment zeigte die erwartete Größe von 255 bp. Bei der nicht-transgenen Kontrollpflanze war trotz Infektion kein Amplifikat erkennbar. Auch die nicht-infizierte, transgene Pflanze zeigte keine Stilbensynthaseexpression, was die Induzierbarkeit des Promotors durch Pathogenbefall, in diesem Fall durch die Infektion mit Apfelmehltau, bestätigt.

### 3.8.1.2 Gezielte Mehltauinokulationen

Die Infektion junger Blätter transgener und nicht-transgener *Holsteiner Cox* und Elstar Pflanzen wurde mit den Einsporisolaten B11 und FGDT7 durchgeführt. Die Sporendichten wurden bei den Infektionen variiert; sie sind der Tabelle 3.10 zu entnehmen.

**Tab. 3.10: Versuchsbedingungen der gezielten Mehltau-Infektionen.**

Experiment	A	B	C	D
Isolat	B11	B11	FGDT7	FGDT7
Konidiendichte (Konidien/mm <sup>2</sup> )	~ 6,7	2,1	6,36	1,5

Zur Charakterisierung der Mehltauanfälligkeit der untersuchten Pflanzen wurden die folgenden Parameter bewertet:

- Anzahl der Konidien pro Konidienträger fünf Tage nach der Infektion
- Prozentualer Anteil des Befalls pro Blatt nach neun Tagen.

### 3.8.1.2.1 Konidien pro Konidienträger

Nach KRIEGHOFF (1995) läßt sich die Mehltauanfälligkeit durch die gebildeten Konidien pro Konidienträger quantifizieren. Die Auszählung muss innerhalb weniger Tage nach der Sporulation durchgeführt werden, da sich bei längeren Inkubationszeiten bzw. ab einer Kettenlänge von 10 Konidien pro Konidienträger, die Konidien vom Konidienträger zu lösen beginnen (KRIEGHOFF 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Evaluierung fünf Tage nach der Inokulation durchgeführt. Getestet wurden drei *vst1*-transgene Linien der Sorte *Holsteiner Cox* (T/HC 50, T/HC 2 und T/HC 12), für die die Aktivität des *vst1*-Gens bereits durch RT-PCR und HPLC-Analysen bestätigt worden war. Desweiteren wurde die transgene Elstar Linie in die Untersuchungen einbezogen.

Aufgrund der besonders hohen Sporendichte in Experiment A (Tab. 3.10) wurde zur Evaluierung der Anzahl der Konidien pro Konidienträger lediglich dieses Experiment herangezogen. Von mindestens vier Blättern pro Linie wurde jeweils die Anzahl der Konidien von 20 Konidienträgern pro Blatt nach 5 Tagen unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Graphik 3.33 ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Berechnungen zu entnehmen.

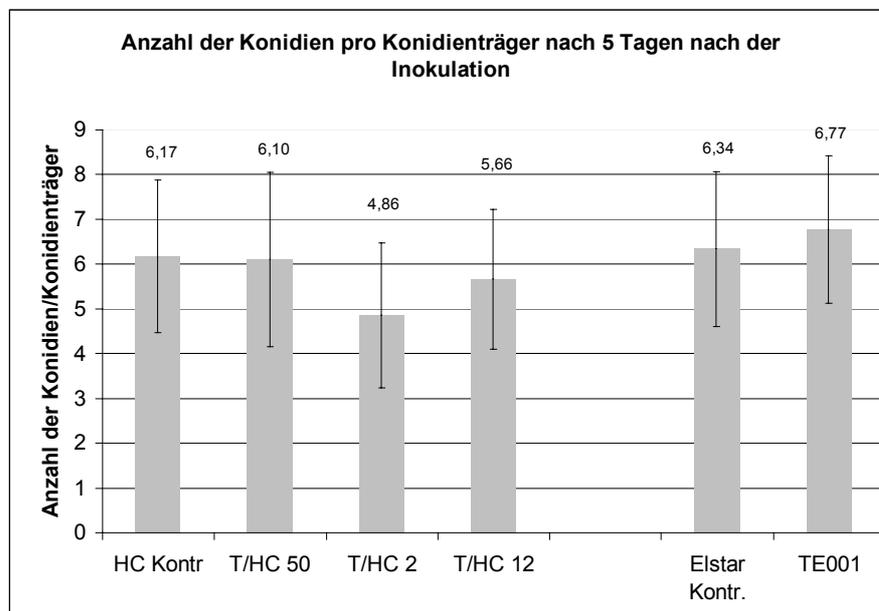


Abb. 3.33: Anzahl der Konidien pro Konidienträger bei Mehltau infizierten *vst1*-transgenen- und Kontrollpflanzen.

Die Konidienanzahl pro Konidienträger verhielt sich sehr indifferent. Wie aus der Graphik 3.33 hervorgeht, lag die durchschnittliche Konidienanzahl der Kontrollpflanze bei 6,17. Die Linie T/HC 50 lieferte mit durchschnittlich 6,10 Konidien pro Konidienträger ein vergleichbares Ergebnis. Die Durchschnittswerte der Linien T/HC 2 und T/HC 12 lagen mit 4,86 und 5,66 zwar etwas unterhalb des Wertes der Kontrollpflanze, signifikante Unterschiede ließen sich aber nicht statistisch absichern. Ebenso war die etwas erhöhte Anzahl der Konidien/Konidienträger der transgenen Elstar Linie im Vergleich zur Kontrollpflanze nicht signifikant.

Ein Einfluss der Stilbensynthese bzw. ihres Syntheseproduktes auf die Konidienanzahl pro Konidienträger des Pilzes *Podosphaera leucotricha* konnte in diesem Experiment nicht festgestellt werden.

### 3.8.1.2.2 Prozentualer Befall pro Blatt

Nach GOSZCZYNSKI & CIMANOWSKI (1985) läßt sich die Anfälligkeit für Mehltau auch durch Einteilung in die folgenden Boniturklassen quantifizieren:

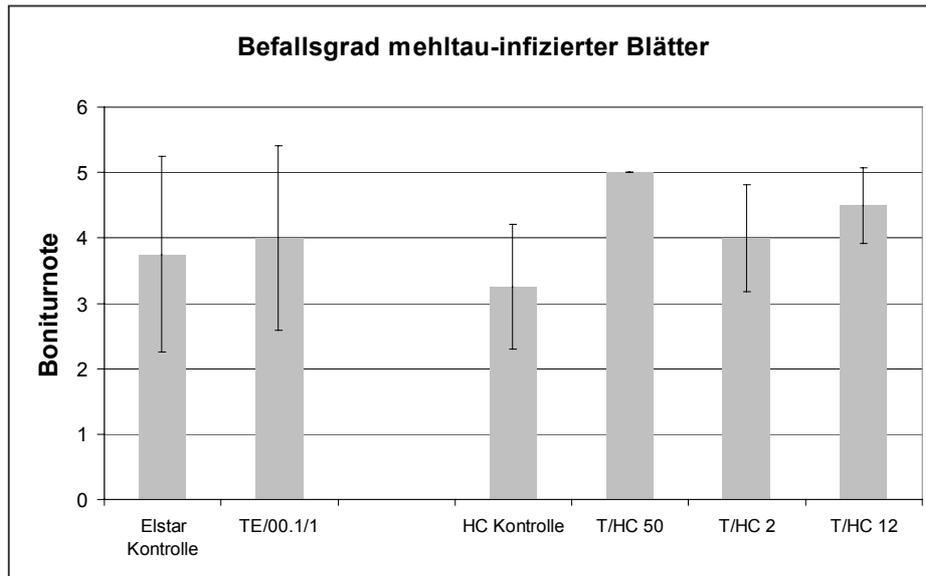
0	=	keine Infektion
I	=	bis zu 1 % der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt
II	=	bis zu 10% der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt
III	=	bis zu 30% der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt
IV	=	30-50% der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt
V	=	über 50% der Blattoberfläche mit sporulierendem Mycel bedeckt

Zur Ermittlung des prozentualen Anteils der befallenen Blattoberfläche wurden die infizierten Blätter der Experimente A und C herangezogen und in das Bonitierschema eingeordnet. Im Anschluß wurde für jede getestete Linie nach der Formel

$$W = \text{Summe der Bonitierungswerte} / \text{Anzahl der bonitierten Blätter}$$

ein Wert für die Anfälligkeit berechnet.

Eine signifikante Reduktion des Anteils befallener Blattfläche konnte bei den Blättern transgener Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen nicht beobachtet werden (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34: Befallsgrad von Apfelblättern transgener und Kontrollpflanzen nach gezielter Mehltauinfektion.**

## 4 Diskussion

Die klassische Pflanzenzüchtung, basierend auf der gezielten Kreuzung ausgewählter Individuen, wird mehr und mehr durch das Instrumentarium des molekularen Gentransfers erweitert. Auch in der Apfzüchtung fanden bereits mehrfach gentechnische Methoden Anwendung. Die Transformation von Apfel (*Malus domestica*) wurde erstmals von JAMES et al. (1989) beschrieben. Sie basierte wie alle folgenden erfolgreich durchgeführten Transformationen auf dem *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer (Übersicht: STEINBIB 1995 und HOOYKAAS & SCHILPEROORT 1992).

Neben der Etablierung und Optimierung von Transformationsbedingungen unter Einsatz von visuell detektierbaren Produkten von Reporter genen (YAO et al. 1995b, PUIITE & SHAART 1996, BOLAR et al. 1999, MAXIMOVA et al. 1998) hatten die Transformationen Merkmalsverbesserungen (HOLEFORS et al. 1998 und 2000, SEDIRA et al. 2001) oder die Untersuchung des Vererbungsmusters (JAMES et al. 1995 und 1996) zum Ziel.

Unter dem Aspekt der Erhöhung der Krankheitsresistenz fanden allgemein wirkende Prinzipien zur Resistenzverbesserung gegenüber wichtigen Apfelpathogenen Anwendung.

JAMES et al. (1993b) transferierten ein für einen Trypsin-Inhibitor codierendes Gen (CpTI) aus *Vigna unguiculata* L. Walp. sowie ein Gen für ein intrakristallines Protein aus *Bacillus thuringiensis* (CryIA[c]) in die Apfelsorte *Greensleeves*, um die Abwehr gegen Insekten zu erhöhen. Zur Verbesserung der Resistenz gegen bakterielle Erreger wie den Feuerbrand (*Erwinia amylovora*), transformierten NORELLI et al. (1994) die Apfelunterlage M26 mit einem für das lytische Protein Attacin E kodierende Gen. Die Pflanzen wiesen eine erhöhte Resistenz gegen Feuerbrand auf; ebenso transgene *Royal Gala* Pflanzen mit dem Cecropin MB39 (LIU et al. 2001).

Zur Steigerung der Abwehr der Sorten *Royal Gala* und *McIntosh* gegenüber fungalen Pathogenen wurde das Gen für die Endochitinase aus *Trichoderma harzianum* eingesetzt (WONG et al. 1999 und BOLAR et al. 2000). Durch die Fähigkeit des Enzyms zur Degradierung pilzlicher Zellwände wurde eine gesteigerte Resistenz gegen Apfelschorf erreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Strategie verfolgt, das antifungale Potenzial der Produkte des *vst1*-Gens aus *Vitis vinifera* L. und des PGIP-Gens aus Kiwi (*Actinidia deliciosa*) in Apfelpflanzen verfügbar zu machen. Damit wurde die Grundlage geschaffen, die Beeinflussung des Resistenzniveaus von Apfel gegenüber Pathogenen durch die

Erweiterung des Phytoalexinspektrums und durch die Produktion des heterologen Polygalacturonase-inhibierenden Proteins aus Kiwi zu ermessen.

Die Arbeit gliederte sich in mehrere Schritte: von der Initiation steriler Stockkulturen, über die Etablierung von Regenerations- und Transformationssystemen bis hin zur eingehenden molekularen Charakterisierung der entwickelten transgenen Pflanzen. Teilweise flossen bereits erste Untersuchungen zur Interaktion von Pflanze-Pathogen in die Arbeit ein.

## 4.1 Regeneration

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist das Vorhandensein eines stabilen und effektiven Regenerationssystems, um eine möglichst große Schnittmenge regenerations- und transformationskompetenter Zellen zu erzielen. Der Anspruch, der daher an die zu etablierenden Regenerationssysteme formuliert wurde, war eine möglichst hohe Effizienz in Gestalt hoher Regenerationsraten und hoher Anzahl regenerierter phänotypisch normaler Sprosse pro Explantat. Die Systeme sollten die Möglichkeit bieten, in einem möglichst kurzen Zeitraum *de novo* Sprosse zu regenerieren, zu bewurzeln und an *ex vitro* Bedingungen anzupassen.

Verschiedene Wege wurden bereits bei der *de novo*-Regeneration von Apfel beschritten: die Regeneration aus Protoplasten (PERALES & SCHIEDER 1993, PATAT-OCHATT & POWER 1990, PATAT-OCHATT et al. 1993, SAITO & SUZUKI 1999, OCHATT & PATAT-OCHATT 1995, AI-PING et al. 1995), weit häufiger jedoch die Regeneration aus Geweben wie Internodalsegmenten (BELAIZI et al. 1991, LIU et al. 1998), Kotyledonen und Embryoachsen (KEULEMANS & WITTE 1994), aus Kallus, induziert an Sprossapices (CABONI et al. 2000) vor allem aber aus Blattexplantaten (BARBIERI & MORINI 1987, JAMES et al. 1988, THEILER-HEDTRICH & THEILER-HEDTRICH 1990, DUFOUR 1990, SRISKANDARAJAH et al. 1990, HANKE et al. 1991, FAMIANI et al. 1994, YEPES & ALDWINCKLE 1994a, PAWLICKI & WELANDER 1994, SARWAR & SKIRVIN 1997, GRAFE & WRICKE 1998, SRISKANDARAJAH & GOODWIN 1998, CABONI & TONELLI 1999).

Bedeutung im Hinblick auf die Etablierung von Transformationssystemen erlangte lediglich die Organogenese, induziert an hoch morphogenem Gewebe wie Blattmaterial. Dieser Ansatz wurde daher auch in der vorliegenden Arbeit favorisiert.

Die Regeneration von Apfel aus somatischem Blattgewebe zeichnet sich durch eine starke Genotypenabhängigkeit aus (SRISKANDARAJAH et al. 1990, MALAVASI & PREDIERI 1990, HANKE et al. 1991, YEPES & ALDWINCKLE 1994b). Mit Ausnahme der Sorte *Elstar* wurden weder für *Holsteiner Cox*, *Gloster* noch für *Boskoop* Protokolle für die Regeneration über Organogenese aus Blattexplantaten in der zugänglichen Literatur gefunden. Die Systeme sollten daher zunächst an die Sorten angepasst werden. In den Etablierungsprozess wurden gezielt Faktoren involviert, deren Relevanz für die Regeneration von Apfel (*Malus x domestica*) beschrieben wurde.

#### 4.1.1 Physiologie des Ausgangsmaterials

Der physiologische Zustand des Ausgangsmaterials ist ausschlaggebend für die Eignung zur Regeneration. So können sowohl die Spendersprosse und deren Kulturbedingungen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit des entnommenen Materials haben (HANKE et al. 1991, PAWLICKI & WELANDER 1994, FERRADINI et al. 1996, SRISKANDARAJAH & GOODWIN 1998), als auch der physiologische Zustand des Blattes selbst, von dem das Explantat entnommen wurde. JAMES et al. 1990, DE BONDT et al. (1994) sowie DE BONDT et al. (1996) fanden heraus, dass das Alter und der Entwicklungszustand der Blätter für die Regenerationsfähigkeit von *Malus x domestica* und die Suszeptibilität gegenüber *Agrobacterium tumefaciens* sehr entscheidend ist. Sie verweisen wie auch YEPES & ALDWINCKLE (1994a) und PAWLICKI & WELANDER (1994) auf die bessere Eignung junger Blätter zur Adventivsprossregeneration. Zur Standardisierung dieses Faktors wurden in der vorliegenden Arbeit in allen Regenerations- und Transformationsexperimenten die vier jüngsten vollentfalteten Blätter vier-Wochen alter mikropropagierter *in vitro* Sprosse verwendet. Während JAMES et al. (1988), NORELLI et al. (1993) und BOLAR et al. (1999) die Explantate von bewurzelten Sprossen gewonnen haben, wurden in der vorliegenden Arbeit Blätter unbewurzelter Sprosse als Ausgangsmaterial verwendet. Die erzielten Regenerationsraten lagen deutlich über denen von JAMES et al. (1988), so dass dieser Faktor vernachlässigt werden konnte.

Die regenerativen Prozesse, zunächst in Form der Bildung kleiner Kalli, aus denen im späteren Verlauf die Sprosse regenerierten, nahmen ihren Anfang an den Schnittstellen, hier besonders an den Bereichen der Explantate, die ehemals zum Stiel hin gerichtet waren. Dies entspricht den Beobachtungen von HANKE et al. (1991). In diesem Zusammenhang verweisen SARWAR & SKIRVIN (1997) und YEPES & ALDWINCKLE (1994a) auf den Einfluss

der Position des Explantates innerhalb des Blattes. Sie konnten zeigen, dass die Explantate, die von der Nähe der Petiole entnommen wurden, bessere Regenerationsraten zeigten, als Explantate aus den apexnahen Bereichen. Ein Gradient von Wachstumsregulatoren und Nährstoffen innerhalb des Blattes ist vermutlich für die unterschiedlichen organogenetischen Reaktionen verantwortlich zu machen.

Die Verletzung ist ein entscheidender Prozess zur Induktion des Regenerationsprozesses (YEPES & ALDWINCKLE 1994a, SARWAR & SKIRVIN 1997). In Anlehnung daran wurden wie auch bei YEPES & ALWINCKLE (1994a) Blattstreifen als Explantate eingesetzt, die zwei Schnittkanten aufwiesen und aus der Nähe der Petiole stammten (s.o.).

#### 4.1.2 Medienzusammensetzung

Entscheidend für den Regenerationsprozess von Apfelsprossen ist neben dem Basismedium (SRISKANDARAJAH et al. 1990, HANKE et al. 1991, PAWLICKI & WELANDER 1994, YEPES & ALDWINCKLE 1994a) das Zusammenspiel von Cytokinin und Auxinen. In der vorliegenden Arbeit wurde das synthetische Cytokininanalogon TDZ (*N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) zur Adventivsprossinduktion an Blattexplantaten von Apfel eingesetzt. TDZ ist eine substituierte Phenyl-Harnstoff-Verbindung, die sehr effizient als Bioregulator zur Morphogenese in der pflanzlichen Gewebekultur eingesetzt wird. Es imitiert in seiner Wirksamkeit sowohl Cytokinine als auch Auxine (Übersicht: MURTHY et al. 1998). Entsprechend werden durch die Applikation von TDZ diverse morphogene Entwicklungen an kultiviertem Pflanzengewebe induziert: von Kallusentwicklung (RUGINI & MUGANO 1998, LIN et al. 1989) über Organogenese (s.u.) und somatische Embryogenese (DAIGNY et al. 1996, LI et al. 1998) bis hin zur Induktion des Knospenausbruchs (WANG et al. 1986, WANG & FAUST 1988). Trotz der imitierenden Wirkung unterscheidet es sich strukturell von Cytokinin und Auxinen. Entscheidend für die Wirksamkeit des Moleküls sind zwei komplementär agierende funktionelle Ringstrukturen, eine Phenyl- und eine Thidiazolgruppe (MOK et al. 1982, MURTHY et al. 1998). Die Art und Weise, wie TDZ in die verschiedenen morphogenen Entwicklungen eingreift, ist nicht vollständig geklärt. Die Beobachtung, dass es neben den Entwicklungsgängen, die für die Anwendung von Cytokinin typisch sind, auch die somatische Embryogenese induziert, die normalerweise mit der Applikation von Auxinen assoziiert ist, läßt auf eine entscheidende Rolle beim Metabolismus endogener Wachstumsregulatoren schließen. Diese erstreckt sich auf die Modulation des Cytokinin-,

des Auxin-Metabolismus (MURTHY et al. 1995) und der Ethylenproduktion (HUTCHINSON et al. 1997), bzw. auf die Modifikation des Verhältnisses der endogenen Hormone zueinander (DAIGNY et al. 1996).

Über die Wirksamkeit von TDZ bezüglich der Adventivsprossregeneration bei Apfel wurde zahlreich berichtet (SRISKANDARAJAH et al. 1990, HANKE et al. 1991, DE BONDT et al. 1996, NORELLI et al. 1996, HAMMERSCHLAG et al. 1997, SRISKANDARAJAH & GOODWIN 1998). Es kann alternativ zu anderen Cytokininen, wie BAP, eingesetzt werden. BAP zeigt meist erst in sehr hohen Konzentrationen Wirksamkeit (JAMES et al. 1988, THEILER-HEDTRICH & THEILER-HEDTRICH 1990, DUFOUR 1990, FAMINANI et al. 1994, YEPES & ALDWINCKLE 1994a, FERRADINI et al. 1996), während TDZ bereits in niedrigen Dosen eingesetzt sehr effektiv Adventivsprossbildung induziert (THEILER-HEDTRICH & THEILER-HEDTRICH 1990, SARWAR & SKIRVIN 1997, PAWLICKI & WELANDER 1994) oder diese erst ermöglicht (HANKE et al. 1991).

Auch für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sorten erwies sich TDZ als ausschlaggebend für die Sprossinduktion. Die durchgeführten Regenerationsversuche mit Medien, die mit steigenden TDZ-Konzentrationen supplementiert waren, ergaben, dass unabhängig von der Sorte die höchste Anzahl an Sprossen pro Explantat mit einer TDZ-Konzentration von 3  $\mu$ M erzielt wurde. Dies entspricht auch Ergebnissen von SARWAR & SKIRVIN (1997). Die Regenerationsraten und die Anzahl der Sprosse pro Explantat unterschieden sich innerhalb der TDZ-Reihe nicht signifikant, dennoch wurde die TDZ-Konzentration als optimal angesehen, die durchschnittlich die höchste Anzahl an Sprossen pro Explantat bei gleichzeitig hohen Regenerationsraten (Anteil sprossbildender Explantate) hervorbrachte. Desweiteren sollte die TDZ-Konzentration so gering wie möglich sein. Ein negativer Einfluss auf die Apikaldominanz, der sich bei steigenden TDZ-Konzentrationen deutlich in Form reduzierter Elongationsfähigkeit manifestierte, sowie eine eventuell verringerte Bewurzelungsfähigkeit (MURTHY et al. 1998) sollten so weitestgehend vermieden werden. Aus diesem Grund wurde TDZ auch lediglich zur sechswöchigen Induktion der Sprosse verwendet und nicht mehr für die folgende Elongations- und Multiplikationsphase eingesetzt.

Die vielfach beobachtete Genotypenabhängigkeit hinsichtlich der Regeneration bezog sich hier weniger auf die Ansprüche der Sorten an das Medium (die optimalen Medien unterschieden sich kaum zwischen den verschiedenen Sorten), sondern viel mehr auf die Effektivität, mit der die Sorten auf die unterschiedlichen TDZ-Konzentrationen reagierten.

Während bei der Sorte *Holsteiner Cox* Regenerationsraten von nahezu 100% mit über 20 Sprossen pro Explantat erzielt wurden, fielen diese Werte bei den anderen Sorten deutlich geringer aus. *Boskoop* zeigte zwar ähnlich hohe Regenerationsraten, bildete durchschnittlich aber nur 5,5 Sprosse pro Explantat bei der Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  TDZ.

Ein anderer, bei der Medienzusammensetzung entscheidender Faktor für die Regenerationsfähigkeit kultivierter Blattsegmente, kann die Kohlenstoffquelle sein. Die Induktionsmedien enthielten als Kohlenstoffquelle Sorbitol, mit Ausnahme der Medien nach DE BONDT et al. (1994) und GRAFE & WRICKE (1998), die mit Saccharose supplementiert wurden. Der Einfluß von Zuckern wurde bei SEINGRE et al. (1991) näher untersucht. Sie stellten einen positiven Effekt von Sorbitol als Kohlenstoffquelle bei der Mikropropagation des *Malus* Klons *EM IX* im Vergleich zu Saccharose und anderen Zuckern fest. SEINGRE et al. (1991) verweisen in diesem Zusammenhang darauf, dass bei den *Rosaceae*n im allgemeinen und bei den *Pomoideae* im speziellen, Sorbitol nicht nur das Wachstum *in vitro* kultivierter Zellen begünstigt, sondern auch das Hauptprodukt der Photosynthese in der *Malus* Gruppe ist. Es stellt somit die natürliche Transportform von Kohlenhydraten in der Pflanze dar. PAWLICKI & WELANDER (1994) konnten die positive Wirkung von Sorbitol gegenüber anderen Kohlenstoffquellen auf die Adventivsprossbildung an Blattexplantaten und KARHU (1997) auf die Sprossmultiplikation von Apfel bestätigen.

Auch das Verfestigungsmittel des Regenerationsmediums kann maßgeblichen Einfluss auf die Morphologie der regenerierten Sprosse nehmen. Mit Ausnahme des Mediums nach GRAFE & WRICKE (1998) wurden alle zur Sprossinduktion verwendeten Medien mit Gelrite<sup>®</sup> verfestigt. Das Heteropolysaccharid aus zum Teil acetylierten Glucuronsäure-, Glucose- und Rhamnoseeinheiten wird oft bevorzugt bei der Induktion von Adventivsprossen an Apfelexplantaten (BOLAR et al. 1999, DE BONDT et al. 1996, PAWLICKI et al. 1994, PUIITE & SHAART 1996). Eine für die Zellkultur wichtige Eigenschaft ist, dass die Medienbestandteile in mit Gelrite<sup>®</sup> verfestigten Nährböden besser verfügbar sind als in Agarnährböden (HUANG et al. 1995). Die Verwendung von Gelrite<sup>®</sup> kann aber auch von einer erhöhten Neigung zur Vitrifizierung begleitet sein (PAWLICKI & WELANDER 1994, ZIMMERMANN et al. 1995). Das Phänomen der Vitrifizierung wurde zwar teilweise, jedoch in sehr geringem Maße, bei den vier verwendeten Apfelsorten während der Regenerationsphase beobachtet. Es war dann jedoch eher auf den physiologischen Zustand der Explantate bzw. der Pflanze, von dem das Explantat entnommen worden war, als auf

die Verwendung von Gelrite<sup>®</sup> zurückzuführen. Meist waren nur Explantate betroffen, die einen identischen Ursprung hatten, sprich, von ein und derselben Pflanze stammten.

Nach der sechswöchigen Induktionsphase auf TDZ-haltigem Medium wurden die regenerierten Sprosse von dem Ursprungsexplantat getrennt und auf ein Elongationsmedium überführt. Das Medium glich in seiner Hormonzusammensetzung dem von PUITE & SHAART (1996) vorgeschlagenen Elongationsmedium und enthielt BAP und GA<sub>3</sub> und wurde, wie auch die Multiplikationsmedien, mit Agar verfestigt. Es erwies sich bei allen vier untersuchten Sorten als zur Spross-Streckung geeignet. Die elongierende Wirkung hängt maßgeblich mit der Applikation von GA<sub>3</sub> zusammen (YEPES & ALDWINCKLE 1994b).

Die etablierten Regenerationssysteme ermöglichten die *de novo* Sprossregeneration innerhalb von acht bis neun Wochen.

### 4.1.3 Kulturbedingungen

Bei der Organogenese an Blattexplantaten von Apfel wird oftmals zu Beginn der Regenerationsphase eine Dunkelperiode eingeschoben, die je nach Arbeitsgruppe in ihrer Dauer variiert (DUFOUR 1990, MALAVASI & PREDIERI 1990, SRISKANDARAJAH et al. 1990, FAMIANI et al. 1994, PAWLICKI & WELANDER 1994, GERCHEVA et al. 1994, FERRADINI et al. 1996, THEILER-HEDTRICH & THEILER HEDTRICH 1990, YAO et al. 1995b, PUITE & SHAART 1996, SARWAR & SKIRVIN 1997, HOLEFORS et al. 1998, BOLAR et al. 1999, LIU et al. 2001). Dieser Aspekt wurde auch bei der Regeneration der Apfelsorten *Elstar*, *Holsteiner Cox*, *Gloster* und *Boskoop* aufgegriffen. Die Blatt-Explantate wurden zunächst für zwei Wochen in völliger Dunkelheit kultiviert, bevor sie in einen Licht-Dunkel Rhythmus von 16h/8h ausgesetzt wurden. Anhaltspunkte über die Art und Weise, in der sich eine Dunkelphase auswirkt, geben FERRADINI et al. (1996). Sie berufen sich auf Publikationen, in denen festgestellt wurde, dass Licht die endogenen Hormonkonzentrationen modifiziert. So kann es zu einer durch Licht induzierten Reduktion des freien endogenen Auxins sowie zu einer Stimulation der Gibberelin-Biosynthese kommen.

## 4.2 Bewurzelung

Die Induktion der Rhizogenese an *Malus in vitro* Sprossen erfolgt grundsätzlich durch die Gabe von Auxinen. Die Auxine und die Art der Applikation können variieren. Grob unterscheiden lassen sich zwei Strategien der Wurzelinduktion: die Pulsgabe durch kurze Applikation (Stunden bis Tage) relativ hoher Auxindosen (SRISKANDARAJAH et al. 1982, SEIFERT et al. 1994, DE KLERK et al. 1995, WELANDER et al. 1998, MAXIMOVA et al. 1998, BOLAR et al. 1998, SEDIRA et al. 2001) oder die dauerhafte Gabe von Auxinen während der gesamten Bewurzelungsphase (PUITE & SHAART 1996, DE KLERK et al. 1997, MA et al. 1998, LIU et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die zweite Variante angewendet, d.h. die Sprosse wurden während der gesamten vierwöchigen Bewurzelungsphase auf den auxinhaltigen Medien kultiviert. Im Gegensatz zu MAXIMOVA et al. (1998), PUITE & SHAART (1996), WELANDER et al. (1998), DE KLERK et al. (1997), BOLAR et al. (1998), SEDIRA et al. (2001) und LIU et al. (2001), die zu Beginn der Bewurzelungsphase eine Dunkelperiode vorschlugen, wurden die Sprosse der Apfelsorten *Holsteiner Cox*, *Elstar*, *Gloster* und *Boskoop* während der gesamten Phase einem Licht/Dunkelrhythmus von 16h/8h ausgesetzt.

Das am häufigsten für die Wurzelinduktion bei *Malus x domestica* angewendete Auxin IBA (LIU et al. 2001, SEDIRA et al. 2001, SRISKANDARAJAH et al. 1994, SEIFERT et al. 1994, BOLAR et al. 1998 u.a.) lieferte auch bei den vier untersuchten Apfelsorten deutlich bessere Ergebnisse als NAA. Im Vergleich zu den Sorten *Elstar* und *Gloster* wurden bei den Sorten *Holsteiner Cox* und *Boskoop* zwar auch bei der Anwendung von NAA verhältnismäßig hohe Bewurzelungsraten erreicht, die Wurzeln waren bei der Sorte *Boskoop* aber eher als Wurzelansätze ausgeprägt. Bei *Holsteiner Cox* war die Kallusbildung durch die Applikation von NAA deutlich erhöht und auch die gebildeten Wurzeln waren teilweise kallös verdickt. Über ähnliche Beobachtungen berichten DE KLERK et al. (1997) und YEPES & ALDWINCKLE (1994b), bei denen die NAA-Applikation zur Bildung von Kalli führte, die bei YEPES & ALDWINCKLE keine Verbindung zum Vaskularsystem aufwiesen. Dies wirkte sich auf die Überlebensrate der in Erde überführten Sprosse aus, die <10% betrug, während die auf IBA-Medium bewurzelten Sprosse zu über 95% erfolgreich in Erde überführt werden konnten.

Die unterschiedliche Effektivität verschiedener Auxine kann neben möglicherweise unterschiedlichen Affinitäten von Auxin-Rezeptoren, auch in Differenzen in der Aufnahme, im Transport und im Metabolismus begründet sein (DE KLEERK et al. 1997).

Die für eine optimale Bewurzelung benötigte IBA-Konzentration war genotypabhängig. Während *Gloster* und *Holsteiner Cox* gute Bewurzelungsraten auf dem Medium mit 1,5  $\mu\text{M}$  IBA zeigten, war für die Sorten *Boskoop* eine höhere Dosis (6  $\mu\text{M}$  IBA) notwendig. Die Eignung des von PUIITE & SHAART (1996) für *Elstar* vorgeschlagenen Mediums wurde bestätigt.

Die Bewertungskriterien, die zur Ermittlung eines optimalen Bewurzelungsmediums herangezogen wurden (Anzahl und Qualität der gebildeten Wurzeln pro Spross und Länge der Wurzeln) erwiesen sich als angemessen. Die mit den optimierten Medien routinemäßig bewurzelten Kontroll- sowie transgenen Pflanzen konnten problemlos an *ex vitro* Bedingungen akklimatisiert werden und entwickelten sich zu phänotypisch unauffälligen Pflanzen.

## 4.3 Transformation

### 4.3.1 Transformationsmethode

Der indirekte Gentransfer mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* stellt die gängigste Methode der Apfeltransformation dar (LAMBERT & TEPFER, 1992, JAMES et al. 1989; MOONEY & GOODWIN 1989, MAHESWARAN et al. 1992, SRISKANDARAJAH et al. 1994, DE BONDT et al. 1994, NORELLI et al. 1994, YAO et al. 1995b, PUIITE & SHAART 1996, DE BONDT et al. 1996, WELANDER et al. 1998, MAXIMOVA et al. 1998, HOLEFORS et al. 1998, BOLAR et al. 1999, WONG et al. 1999, HOLEFORS et al. 2000, LIU et al. 2001, SEDIRA et al. 2001). Der direkte Gentransfer in Apfelprotoplasten führte zwar bei HYUNG et al. (1995) zur transienten Expression eines visuellen Markergens, erlangte aber bisher keinerlei weitere Bedeutung für die Produktion transgener Apfelpflanzen.

Auch die Sorten *Holsteiner Cox* und *Elstar* wurden erfolgreich unter Anwendung des *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers transformiert. Die Transformations-effizienzen lagen für *Holsteiner Cox* zwischen 0,7 und 4,49. Da keinerlei Veröffent-

lichungen über die Transformation der Sorte *Holsteiner Cox* vorliegen, hinkt ein Vergleich mit Transformationseffizienzen anderer Sorten. Denn wie auch bei der Regenerationskompetenz, hängt die Effizienz der Transformation maßgeblich vom Genotyp ab (DE BONDT et al. 1994 und 1996). Für die Sorte *Elstar* wurden bereits Transformationsprotokolle publiziert. Die Transformationseffizienz von 0,29 fiel geringer aus als die Werte, die von DE BONDT et al. (1996) und PUIE & SHAART (1996) für *Elstar* ermittelt wurden (4 und 0,4-0,8). Rückschlüsse auf die Qualität des Systems können dennoch nicht gezogen werden, da bei der Sorte *Elstar* andere Faktoren, die nicht auf die Transformationsmethode zurückzuführen sind, die Effizienz maßgeblich beeinflusst haben könnten. Ausschlaggebend waren hier möglicherweise die starken Vitrifizierungen, die bei *Elstar* aufgrund der Antibiotikaapplikation zur Eliminierung der Agrobakterien verursacht wurden (siehe auch 4.3.4). Da nur phänotypisch normale Pflanzen zur weiteren Mikropropagation eingesetzt wurden, könnten möglicherweise einige transgene Sprosse aufgrund des anormalen Habitus verworfen worden sein. Bei entsprechender Optimierung des Regenerationsverlaufs nach der Transformation können möglicherweise mit der angewendeten Transformationsmethode auch für *Elstar* höhere Effizienzen erzielt werden.

Es muss jedoch noch einmal betont werden, dass sich die oben angegebenen Effizienzen immer auf einen Versuchsansatz bezogen, um wirklich nur Explantate miteinander zu vergleichen, die unter identischen Bedingungen transformiert wurden. Da nicht alle Transformationen erfolgreich verliefen, spielen eventuell Faktoren eine Rolle, die nicht auf die Prozedur allein zurückzuführen sind. Jahreszeitliche Abhängigkeiten, Alter der Bakterienstockkulturen oder auch physiologische Unterschiede des Ausgangsmaterials, die zwar durch standardisierte Bedingungen weitestgehend vermieden werden sollten, können ausschlaggebend für den Erfolg einer Transformation sein. Sie lassen sich aber nur schwerlich retrospektiv erfassen.

Mehr noch als die erreichten Transformationsraten reflektiert die Reproduzierbarkeit einer Methode deren Eignung zur Erzeugung transgener Pflanzen. Die in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode erwies sich trotz einiger erfolgloser Versuche mehrfach als reproduzierbar für die Sorte *Holsteiner Cox* und ist damit sehr gut zur Erzeugung transgener Apfelpflanzen geeignet.

Bei der Etablierung der Methode wurden mehrere Faktoren berücksichtigt, die maßgeblich den Erfolg einer Transformationsmethode beeinflussen können.

Einer der Faktoren ist zweifelsohne der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm (DE BONDY et al. 1994). Zur Transformation von *Elstar* und *Holsteiner Cox* wurde ausschließlich der supervirulente, entwaffnete Agrobakterienstamm EHA105 eingesetzt (HOOD et al. 1993). Er leitet sich vom supervirulenten Wildstamm A281 ab, dessen Derivate sich bereits mehrmals als effektiver bei der Transformation gezeigt haben, als weniger virulente Stämme wie z.B. LBA4404 (DE BONDY et al. 1994, CAO et al. 1998, HUMARA et al. 1999), ein Derivat des schwach virulenten Stammes Ach5 (HOEKEMA et al. 1983), oder C58 (GHORBEL et al. 2001).

Die Verwundung und die damit verbundene Freisetzung phenolischer Substanzen ist entscheidend für die Induktion der Virulenzgene von *Agrobacterium tumefaciens*. Die phenolischen Substanzen werden von dem membranständigen, konstitutiv exprimierten *virA* Proteinen als Signal erfasst und lösen über eine zweite Komponente, dem *virG* Protein, eine Reaktionskaskade aus, die zur Aktivierung der Virulenzregion führt (Übersicht: STEINBIB 1995 und HOOYKAAS & SCHILPEROORT 1992). Die Virulenz eines Stammes hängt maßgeblich von der Quantität und Qualität des *virG*-Proteins ab. GHORBEL et al. (2001) bewiesen, dass durch die Addition zusätzlicher *virG* Genkopien die Virulenz eines für Citrus schwach virulenten Stammes C58 auf annähernd das Maß gesteigert werden konnte, das für EHA105 erzielt wurde. Sie verweisen auf die Rolle von *virG* als Aktivator der Transkription der anderen *vir*-Gene und postulieren, dass die erhöhte Verfügbarkeit von *virG* in einer verstärkten Expression der *vir*-Gene resultiert. Gleichzeitig leiten sie daraus ab, dass die Quantität und Qualität des *virG*-Proteins entscheidend für die Hypervirulenz von EHA105 ist.

Unabhängig vom genetischen Hintergrund der Agrobakterien kann die Transformationseffizienz durch die Unterstützung der Induktion der *vir*-Region positiv beeinflusst werden. Durch die exogene Applikation phenolischer Substanzen, wie Acetosyringon (STACHEL et al. 1985), kann die Interaktion mit dem membranständigen *virA*-Protein und die folgende Aktivierung effizienter gestaltet werden.

DANDEKAR et al. (1990), JAMES et al. (1993a und b), NORELLI et al. (1994 und 1996) schlagen eine Konzentration von 100  $\mu$ M Acetosyringone als Zusatz zum Inokulationsmedium vor. Diese wurde daraufhin auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

### 4.3.2 Cokultur

Die in der Literatur berichteten Zeiten der Cokultur variieren zwischen zwei (DANDEKAR et al. 1990, NORELLI et al. 1994, PUIITE & SHAART 1996) und vier Tagen (SRISKANDARAJAH et al. 1994 und 1998, DE BONDT et al. 1996). DE BONDT et al. (1994) verweisen darauf, dass mit vier Tagen Cokultur das Limit erreicht ist, da ansonsten eine vollständige Eliminierung der Bakterien nicht mehr möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde daher, wie auch bei JAMES et al. (1989), HOLEFORS et al. (1998), WELANDER et al. (1998), SEDIRA et al. (2001) und LIU et al. (2001), eine dreitägige Cokulturphase gewählt.

### 4.3.3 Selektion

Im Laufe des Transformationsprozesses wird nur in wenige Zellen fremde DNA integriert, während der Großteil der Zellen untransformiert bleibt. Die Identifikation transgener Zellen erfolgt durch den Transfer von Markergenen, üblicherweise Antibiotika- oder Herbizidresistenzen. Der Einsatz von Markergenen ist umstritten. Im Fokus der öffentlichen Diskussion steht das Risiko eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen auf Bakterien der Umwelt oder Intestinalmikroorganismen. Ein solcher Transfer wird zwar als unwahrscheinlich eingestuft und wurde bisher nicht nachgewiesen (SMALLA et al. 2000), dennoch ist er prinzipiell möglich. Im Visier stehen vor allem Markergene (SCHIEMANN et al. 2000) wie Antibiotikaresistenz-Gene. Vor dem Hintergrund der Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, die eine schrittweise Einstellung der Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in gentechnisch veränderten Organismen (GVO) vorsieht ([http://europa.eu.int/eur-lex/de/lif/dat/2001/de\\_301L0018.html](http://europa.eu.int/eur-lex/de/lif/dat/2001/de_301L0018.html) [19.03.2002]), wurde in der vorliegenden Arbeit die Herbizidresistenz gegenüber der Antibiotikaresistenz bevorzugt.

Als Herbizidresistenz-Gen wurde das Phosphinotricin-acetyltransferase-Gen *bar* aus *Streptomyces hygroscopicus* (THOMPSON et al. 1987) eingesetzt, das transgene Pflanzen zur Inaktivierung des Herbizids Phosphinotricin (PPT, aktives Agens des Herbizids Liberty®) befähigt (DE BLOCK et al. 1987).

Der Einsatz von Herbizidresistenzen als selektive Marker fand bei der Entwicklung transgener Apfelsorten bisher wenig Beachtung. In den zahlreichen Publikationen zur Apfeltransformation, die bereits unter 4.3.1 Erwähnung gefunden haben, wurde fast ausschließlich über den Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen berichtet. Lediglich DE

BONDT et al. (1996) setzten alternativ zu einem Antibiotikaresistenz-Gen ebenfalls das Herbizidresistenz-Gen *bar* als selektierbaren Marker ein (s.u.). Die Anwendung blieb allerdings erfolglos; sie konnten keine PPT-resistenten Sprosse regenerieren.

Eine effiziente Regeneration transgener Pflanzen bedingt die konsequente Eliminierung nicht transgener Zellen. Die Kenntnis der hierfür benötigten Konzentrationen ist zwingend. Durch eine Testung des Einflusses steigender Konzentrationen des selektiven Agens auf die Regenerationsfähigkeit nicht transformierter Blattexplantate wurde eine letale Dosis von 10 mg/L PPT ermittelt. Zwar waren auch bei deutlich geringeren Konzentrationen keine oder wenig regenerative Prozesse sichtbar, dennoch wurde die Dosis gewählt, bei der definitiv keine der Zellen des nicht-transgenen Gewebes überlebten. Die Fähigkeit, auf diesem Medium regenerative Prozesse wie Sprossinduktion, -entwicklung und –multiplikation und Rhizogenese zu durchlaufen, wurde als erster Hinweis auf Transgenität gewertet. Diese Annahme erwies sich als angemessen, da die Transgenität in allen Fällen durch molekulare Analysen verifiziert werden konnte. Es wurden keine „Ausreisser“ detektiert. Die eingesetzte Dosis wirkte sich nicht negativ auf die Wachstumsfähigkeit transgener Pflanzen aus. Die Multiplikationsrate war im Vergleich zu den mikropropagierten nicht-transgenen Stockkulturen uneingeschränkt.

Die letale Dosis von 10 mg/L PPT wurde auch DE BONDT et al. (1996) zur Selektion transformierter Apfelexplantate eingesetzt. Sie applizierten diese jedoch sofort nach der Cokultur. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Selektion transgener Zellen im Prinzip zwei davon abweichende Strategien verfolgt. Die sofortige Applikation des selektiven Agens, mit jedoch zunächst niedriger Konzentration, die im Verlauf der Kulturphase kontinuierlich bis zur letalen Dosis von 10 mg/L gesteigert wurde, und die verzögerte Selektion, bei der erst nach bereits erfolgter Knospen- bzw. Sprossregeneration ein steigender Selektionsdruck ausgeübt wurde. Die erste Variante erwies sich bei den *Holsteiner Cox* Transformationen als angemessen, während die erfolgreich durchgeführte *Elstar* Transformation nach dem zweiten Schema durchgeführt wurde. Im Falle der Sorte *Elstar* sind keine vergleichenden Analysen möglich, da lediglich aus einer Transformation eine transgene Linie hervorging. Das für *Holsteiner Cox* angewendete Selektionsschema erwies sich als reproduzierbar.

Ob dieses zu DE BONDT et al. (1996) differierende Selektionsschema mit PPT letztendlich ausschlaggebend für den Erfolg der *Holsteiner Cox* und *Elstar* Transformationen war, der von DE BONDT et al. (1996) nicht erzielt wurde, ist schwierig zu beurteilen.

Möglicherweise hat jedoch die Art und Weise der Applikation einen Einfluß auf die Regeneration transgener Pflanzen. Vorstellbar ist, dass durch die sofortige Applikation sehr hoher Dosen des selektiven Agens die nicht-transgenen Zellen zwar schnell und effektiv abgetötet werden, gleichzeitig aber auch die erfahrungsgemäß sehr wenigen transgenen Zellen durch das Übermaß der sterbenden Zellen mit abgetötet werden. Eine Exkretion toxischer Substanzen oder auch eine Nährstoffunterversorgung aufgrund des massiven Absterbens nicht transgener umliegender Zellen, sind als Ursachen denkbar. Ein zu Beginn niedriger Selektionsdruck bietet die Chance, zunächst die Integrität des Gewebes zu wahren und erst nach der Etablierung der Teilungsaktivität nicht-transgene Zellen durch langsam ansteigende Konzentrationen effektiv abzutöten.

#### **4.3.4 Effekt von Antibiotika auf die Regenerationsfähigkeit kultivierter Blattexplantate**

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Eliminierung der Agrobakterien zunächst Cefotaxim eingesetzt, später die Kombination Ticarcillin und Combactam ( $\beta$ -Lactamase-Inhibitor). Cefotaxim und Ticarcillin gehören zur Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, deren Wirkungsweise auf der Inhibierung der Zellwandsynthese sich teilender Bakterien und einer damit verbundenen Lyse der Bakterien beruht.

Grundsätzlich erwies sich die Anwendung der Kombination Ticarcillin und Combactam als wirkungsvoller zur Eliminierung der Agrobakterien im Vergleich zu Cefotaxim. Dies deckt sich mit Beobachtungen von DE BONDT et al. (1996), die bei der Anwendung von Cefotaxim mit dem Problem des erneuten Auswachsens überlebender Agrobakterien konfrontiert wurden. Durch Zusatz der Clavulansäure (Combactam) wurde eine höhere Photostabilität erzielt und einer Inaktivierung durch  $\beta$ -Lactamase vorgebeugt (LING et al. 1998), so dass während der gesamten Kulturphase kein erneutes Auswachsen von Agrobakterien auftrat. Während bei der Sorte *Holsteiner Cox* kein negativer Effekt auf die Regenerationsfähigkeit der transformierten Explantate auftrat, war die Applikation sowohl von Cefotaxim als auch der Kombination Ticarcillin/Combactam bei der Sorte *Elstar* mit starken Vitrifizierungen und abnormaler Sprossentwicklung während der Regenerationsphase verbunden.

Bei der Vitrifikation handelt es sich um eine physiologische Störung, gekennzeichnet durch glasiges und wasserreiches Gewebe. Auf Zellebene wurden vergrößerte

Interzellularräume und eine reduzierte Chloroplastendichte festgestellt (WILLIAMS & TAJI 1991).

Ein solcher vitrifizierender Effekt scheint nicht typisch für die verwendeten Antibiotika zu sein. Gerade für das Antibiotikum Cefotaxim wird eine fördernde Wirkung auf die Sprossproliferation von Apfel (YEPES & ALDWINCKLE 1994a) und die Morphogenese von Apfel-Blattexplantaten (MAHESWARAN et al. 1992, YEPES & ALDWINCKLE 1994b) beschrieben. LING et al. (1998) stellten einen positiven Effekt von Ticarcillin sowohl auf das Kalluswachstum als auch auf die Sprossregeneration fest. Sie verweisen darauf, dass Ticarcillin innerhalb der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zur Gruppe der Penicilline gehört und vermuten, dass der wachstumsverstärkende Effekt auf der Freisetzung auxinähnlicher Substanzen beruhen könnte. Dieses Phänomen wurde bereits für Carbenicillin und Penicillin G. beschrieben.

Der vitrifizierende Effekt der Antibiotika steht möglicherweise mit einer verstärkten Zellproliferation in Verbindung. Vitrifizierungen treten häufig bei verstärkten Cytokiningaben auf (WILLIAMS & TAJI 1991), werden aber auch, wenn auch im geringeren Maße, nach der Supplementation von Auxinen beobachtet (KATAEVA et al. 1991). PHAN (1991) vermutet in diesem Zusammenhang, dass die Cytokinine im Nährmedium eine vermehrte Zellteilung anregen, die neugebildeten Zellen aber wegen mangelhafter Ligninsynthese nicht genügend gefestigt werden können.

Diese wachstumsstimulierende Wirkung der Antibiotika, ähnlich dem Effekt einer Hormonapplikation, ist als wahrscheinlichste Ursache der Vitrifizierung der *Elstar*-Explantate in Betracht zu ziehen. Andere Faktoren, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Vitrifikation kultivierter Explantate haben, wie z.B. Wahl des Kulturgefäßes oder der Einsatz von TDZ und/oder Gelrite (PAWLICKI & WELANDER 1994, ZIMMERMANN et al. 1995) mögen diesen genotypspezifischen Effekt begünstigt haben. Die Reduktion des Ticarcillingehaltes bei gleichzeitiger Addition des Biozids PPM schaffte zwar Abhilfe, stellte jedoch aufgrund mangelnder bakterizider Wirkung keine wirkliche Alternative dar.

#### 4.4 Molekulare Analysen

Die Integrationsanalysen mittels des *Southern Blots* offenbarten, dass bei dem überwiegenden Teil der transgenen Pflanzen Mehrfach-Insertionen der Transgene stattgefunden haben. In den *vst1*-transgenen Pflanzen wurden zwei bis sechs Genkopien,

bei den PGIP-transgenen Pflanzen zwei bis ~zehn Genkopien detektiert. Lediglich zwei der *vst1*-transgenen Pflanzen wiesen die Integration lediglich einer Kopie auf. Inwieweit die multiplen Insertionen die Aktivität der Gene beeinflussen, wurde zunächst durch Expressionsanalysen auf Transkriptionsebene mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

Aufgrund der eingesetzten Promotoren wurde erwartet, dass das *bar*-Gen und das PGIP Gen aus Kiwi in den transgenen Holsteiner Linien konstitutiv exprimiert werden. Die spezifische mRNA des *vst1*-Gens sollte erst nach vorheriger Induktion in den *vst1*-transgenen Pflanzen nachweisbar sein, da das *vst1*-Gen durch den eigenen induzierbaren *vst1*-Promotor reguliert wird. Diese Annahmen wurden durch die RT-PCR Analysen bestätigt. Zu den Signalen, die zur Induktion des *vst1*-Promotors und damit zur Transkription des Gens führen, zählen verschiedene Faktoren, wie die Freisetzung von Elicitoren nach fungaler Infektion (LANGCAKE & PRYCE 1976, LISWIDOWATI et al. 1991, STARK-LORENZEN et al. 1997), Bestrahlung mit UV-Licht (LANGCAKE & PRYCE 1976) und die Verwundungsreaktion (LECKBAND & LÖRZ 1998). Die drei Induktionswege wurden auch im „System Apfel“ bestätigt. Somit sind die Signalkaskaden, die durch die unterschiedlichen Induktoren ausgelöst werden und zur *vst1*-mRNA-Akkumulation führen, in verschiedenen Pflanzenspezies konserviert.

Während LECKBAND & LÖRZ (1998) die Verwundung bei transgenen Weizen- und Gerstpflanzen durch Abreiben der Blätter mit Seesand hervorriefen, wurden zur routinemäßigen Überprüfung der Expression des *vst1*-Gens in den transgenen *Holsteiner Cox* und *Elstar* Pflanzen Verwundungen mit Hilfe einer Pinzette gesetzt. Diese Methode hatte sich bereits bei der Induktion des *vst1*-Gens in transgenen Chrysanthemen bewährt (J.-P. Himstedt, persönliche Mitteilung) und führte auch bei Apfel zur Transkription der *vst1*-mRNA, die bereits eine Stunde nach der Induktion detektiert werden konnte. Mit einer Ausnahme wurden bei allen untersuchten *vst1*-transgenen Linien sowie den PGIP-transgenen Linien die spezifischen Transkripte nachgewiesen.

#### 4.4.1 Geninaktivierung

Bei der Analyse der Expression des Stilbensynthase-Gens in den verschiedenen Linien mittels der RT-PCR wurde bei der transgenen *Holsteiner Cox* Linie 45.3, die laut Southern Blot-Analysen sechs Kopien des *vst1*-Gens integriert hat, trotz dreimaliger Wiederholung der RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR kein *vst1*-Transkript nachgewiesen. Da in denselben Proben die mRNA des konstitutiv exprimierten *bar* Gens nachgewiesen

werden konnte, konnte ein Fehler im Rahmen der Prozedur ausgeschlossen werden. Das Phänomen, dass das *vst1*-Gen trotz der Integration in das Genom des Rezipienten inaktiv war, kann als Folge eines *gene-silencing* angesehen werden (Übersicht: DE WILDE et al. 2000, VAUCHERET et al. 1998 und STAM et al. 1997b).

Da die Inaktivität bereits auf ein Fehlen der mRNA zurückzuführen war, muss von einem transkriptionellen *Silencing* (CHAREONPORNWATTANA et al. 1999), beruhend auf der Inaktivierung des Promotors, ausgegangen werden. Damit unterscheidet es sich vom Posttranskriptionellen *Silencing* (STAM et al. 1997a, DE WILDE et al. 2001), bei dem die Qualität oder Quantität der RNA darüber entscheidet, ob die Expression des Transgens auf der Ebene nach der Transkription blockiert oder reduziert ist.

Die Ursachen der Inaktivierung der *vst1*-Gene in der Linie 45.3 können vielfältiger Natur sein. In den meisten Fällen ist das *Silencing* mit einer Methylierung von CG/CNG Sequenzen in der inaktivierten Region verbunden (HOBBS et al. 1993, PARK et al. 1996, KOHLI et al. 1999, DE WILDE et al. 2001). DIÉGEZ et al. 1998 sehen in der Methylierung allerdings nicht die Ursache der Inaktivierung, sondern machen sie verantwortlich für die Erhaltung der Inaktivität bzw. deren Etablierung (WATERHOUSE et al. 2001). Für die Methylierung ist nicht allein die genetische Konstitution eines Gens entscheidend. So stellten DE NEVE et al. (1999) fest, dass selbst bei genetisch identischen Pflanzen einer Linie unterschiedliche Methylierungsmuster auftraten. Sie charakterisierten die Auferlegung der Methylierung daher als einen hochgradig dynamischen Prozess.

Ein Positionseffekt aufgrund der Integration in der Nähe hypermethylierter Genomsequenzen ist im Falle der Linie 45.3 unwahrscheinlich. Geht man davon aus, dass die T-DNA als Einheit integriert wurde, müsste das *bar*-Gen ebenso einer Inaktivierung auf Grund der umliegenden Sequenzen unterworfen sein. Die Untersuchungen zeigten aber, dass das *bar*-Gen normal transkribiert wurde.

Auffällig bei der Linie 45.3 ist die hohe Anzahl integrierter Kopien, die mit sechs deutlich über den der anderen untersuchten Linien liegt. Einzig die PGIP-Linie Nr. 3 übersteigt mit geschätzten zehn Kopien die Anzahl der Kopien in Linie 45.3. Eine homologie-anhängige Geninaktivierung, eventuell verbunden mit einer Konkurrenz um einen limitierten Transkriptionsfaktor, ist daher als eine Ursache in Betracht zu ziehen.

Transkriptionelles *Silencing* erfordert lediglich eine Homologie in der Promotorregion (MATZKE ET AL. 1989, PARK ET AL. 1996) und ist charakterisiert durch einen starken Methylierungsgrad der inaktivierten Promotorregion (DIÉGUEZ et al. 1998, PARK et al.

1996). In der Promotorhomologie der integrierten *vst1*-Genkopien kann demnach die fehlende Aktivität der *vst1*-Gene in der transgenen Linie 45.3 begründet sein.

Steigende Kopienzahlen wirken sich jedoch nicht zwangsläufig negativ auf die Expression des jeweiligen Gens aus (CHAREONPORNWATTANA et al. 1999, KOHLI et al. 1999). Auch die Art und Weise, wie die Kopien integriert sind, kann ausschlaggebend für den Prozess der Inaktivierung sein. Die Anordnung in „*inverted repeats*“ begünstigt den *Silencing* Prozess (HOBBS et al. 1993, STAM et al. 1997a). Dass lediglich die Linie 45.3 von dem transkriptionellen *Silencing* betroffen ist, obwohl auch die anderen *vst1*-Linien oftmals mehr als eine Kopie des Gens besitzen, und auch die PGIP Linie 3 eine besonders hohe Anzahl an Integrationen aufwies, könnte in einem solchen Integrationsmuster begründet sein. Dem widerspricht allerdings die uneingeschränkte Expression der *bar*-Gene, die wahrscheinlich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den *vst1*-Integrationen lokalisiert sind.

Sie weist eher auf ein differentes Methylierungsmuster hin. KOHLI et al. (1999) liefern mit ihren Untersuchungen eine mögliche Erklärung. Sie stellten fest, dass lediglich eines von zwei in unmittelbarer Nähe integrierten Transgene von der Methylierung betroffen war und nur dieses dem *Silencing* Prozess unterworfen war.

Der sich hinter all den Beobachtungen verbergende Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden, dennoch bieten einige Modelle Erklärungsansätze, die WATERHOUSE et al. (2001) in einem Überblick zusammengefasst haben. Demnach ist das Vorhandensein einer doppelsträngigen RNA ausschlaggebend für nachfolgenden Prozesse, die gezielt zur Degradierung homologer RNA-Sequenzen führen. Multiple Integrationen und gerade die Anordnung als *inverted repeats* fördern durch komplementäre Bindungen die Entstehung doppelsträngiger RNA (dsRNA) oder die Bildung von sog. Haarnadel-RNA-Strukturen (hpRNA). Dadurch wird eine Kaskade von Prozessen induziert, die letztendlich in der Inaktivierung von Genen resultiert. WATERHOUSE et al. (2001) postulieren für die transkriptionelle und für die post-transkriptionelle Geninaktivierung einen ähnlichen Mechanismus mit unterschiedlicher Konsequenz. Enthalten die dsRNA/hpRNA Promotorsequenzen, so kommt es zur Methylierung bzw. einem veränderten Zustand der Promotor-DNA und somit zum transkriptionellem *Silencing*. Die Anwesenheit von kodierenden Sequenzen in der hpRNA/dsRNA führt zur Degradierung homologer mRNA und verursacht damit das posttranskriptionelle *Silencing*.

Unter dem evolutionären Aspekt betrachtet, werden die Gründe der Inaktivierung von Fremdgenen in einer Pflanze hauptsächlich in einer adaptiven Abwehr von Viren vermutet (Übersicht: WATERHOUSE et al. 2001).

Ein Faktor, der ebenfalls entscheidend in den Prozess der Inaktivierung involviert sein kann, ist die zusätzliche Integration prokaryontischer Sequenzen des *backbones* des Plasmides, die bei der Linie 45.3 festgestellt wurde (siehe auch 4.4.2). DE WILDE et al. 2000 verweisen auf einen negativen Effekt der prokaryontischen Vektorsequenzen auf die Aktivität von Transgenen. Sie formulieren die These, dass die Sequenzen aufgrund des abweichenden GC-Gehaltes oder aufgrund der repetitiven Sequenzen, wie bakterielle Replikationsstartpunkte, von der pflanzlichen Enzym-Maschinerie erkannt werden und so zur Inaktivierung der Transgene beitragen können.

#### **4.4.2 Transfer von Vektorsequenzen ausserhalb der T-DNA ins pflanzliche Genom**

Der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Gentransfer ist sowohl im natürlichen biologischen System während des Prozesses der Wurzelhalsgallen-Tumorgenese, als auch in dem für die gentechnische Anwendung modifizierten Mechanismus durch den Transfer der T-DNA in das Pflanzengenom gekennzeichnet. Die Bordersequenzen, bestehend aus fast identischen Wiederholungen von Basensequenzen, definieren das linke und rechte Ende der T-DNA und bestimmen damit auch den Bereich, der bei der Transformation physikalisch separat vom Ti-Plasmid (natürliches System) bzw. vom binären Vektor in die Pflanzenzellen übertragen wird. In den letzten Jahren erschienen vermehrt Berichte darüber, dass auch Sequenzen vom Rückgrat der Plasmide bei der Transformation in die Pflanzen übertragen werden können (MARTINEAU et al. 1994, RAMANATHAN & VELUTHAMBI 1995, CLUSTER et al. 1996, VAN DER GRAAFF et al. 1996, KONONOV et al. 1997, WENCK et al. 1997, WOLTERS et al. 1998, DE BUCK et al. 2000). Ausserhalb der T-DNA liegen oftmals Antibiotikaresistenzgene unter der Kontrolle bakterieller Promotoren, die zur Selektion der plasmidtragenden Agrobakterien genutzt werden.

Vor diesem Hintergrund wurden die entwickelten transgenen Linien hinsichtlich der Anwesenheit von Vektorsequenzen ausserhalb der T-DNA überprüft. Als Zielsequenz wurde das auf dem Rückgrat lokalisierte Kanamycinresistenz-Gen gewählt. Von den neun untersuchten *vst1*-transgenen *Holsteiner Cox* Linien wiesen vier Linien ein positives Signal auf; von den drei PGIP-transgenen *Holsteiner Cox* Linien nur eine. Da in der vorliegenden

Arbeit lediglich Primer, die an spezifische Sequenzen des Kanamycinresistenzgens binden, eingesetzt wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob wie bei VAN DER GRAAFF et al. (1996), WENCK et al. (1997) und DE BUCK et al. (2000) der gesamte Vektor oder lediglich Teile in die Pflanzengenome integriert wurden. Aufgrund der unten dargelegten Theorien ist dies aber als wahrscheinlich anzusehen.

Unterschiedliche Faktoren können für den Transfer von Rückgratsequenzen verantwortlich gemacht werden. Da der Transfer unabhängig von der Pflanzenspezies, der Transformationsmethode oder des angewendeten Selektionsschemas erfolgt (DE BUCK et al. 2000), ist er als Konsequenz von Vorgängen anzusehen, die sich bereits in der *Agrobacterium*-Zelle vollziehen. Das fügt sich in die Vorstellung, dass der Transfer auf einem „Durchlesen“ der linken Bordersequenz beruht und demnach maßgeblich von Bedingungen innerhalb der Zelle beeinflusst wird. Da der Transfer jedoch auch unabhängig vom eingesetzten *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm ist (KONONOV et al. 1997), richteten DE BUCK et al. (2000) das Hauptaugenmerk auf die Architektur der Bordersequenzen. Sie verglichen die Vektortransfer-Raten in transgenen Pflanzen, die entweder mit Vektoren transformiert wurden, in denen die T-DNA von Bordersequenzen aus dem natürlichen Oktopin-Kontext flankiert wurde oder in denen die innere Region der Bordersequenzen fehlte. Die Pflanzen, die aus einer Transformation hervorgingen, in denen die Bordersequenzen im natürlichen Oktopin-Kontext vorlagen, wiesen deutlich weniger Vektorintegrationen auf. DE BUCK et al. (2000) postulieren daher, dass möglicherweise durch die Deletion der inneren Bereiche der Bordersequenzen, die Teile der T-DNA des Original-Plasmides darstellen, von dem der Vektor abgeleitet wurde, die T-DNA nicht mehr effizient an der linken Border geschnitten wird. DE BUCK et al. (2000) entwickelten das Modell, dass der Transfer an der rechten Border beginnt, die linke Border überlesen wird und so der gesamte Vektor integriert wird. Falls auch die nächst folgende rechte Bordersequenz überlesen wird, können sogar zwei T-DNAs, die Vektorsequenz flankierend, transferiert werden. Diese Vorstellung widerspricht der Hypothese von VAN DER GRAAFF et al. (1996). Diese besagt, dass der Transfer an der linken Border beginnt, gefolgt von der Vektorsequenz und über die im zirkulären Plasmid folgende rechte Bordersequenz hinausgeht und an der linken wieder endet. Das Resultat ist der Transfer einer kompletten Einheit bestehend aus einer T-DNA und der gesamten Vektorsequenz, an der linken Border linearisiert.

Nicht unerwähnt bleiben sollte ein Aspekt, der von WENCK et al. (1997) aufgegriffen wurde. Sie weisen darauf hin, dass die ineffiziente Freisetzung der T-DNA aus dem Vektor auch das Resultat einer suboptimalen Genexpression der Virulenz Gene, die für die Freisetzung der T-DNA und für den Transfer ins Pflanzengenom verantwortlich sind, sein kann.

Der zusätzliche Transfer von Vektorsequenzen ausserhalb der T-DNA in das pflanzliche Genom muss als ein häufig vorkommender Prozess angesehen werden; zumindest bei der Verwendung des binären Vektorplasmids pBIN19 und seinen Derivaten (WOLTERS et al. 1998). Zu ihnen gehören auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte pHKvst und PSCP2.

Die Konsequenzen, die sich aus dem Transfer von Rückgratsequenzen der Vektoren ergeben, sind vielschichtig.

Auf den möglichen Einfluss der Rückgratsequenzen prokaryontischer Herkunft auf die Genaktivität der relevanten Gene wurde bereits unter 4.4.1 hingewiesen.

Der Transfer von Rückgratsequenzen muss aber auch im Kontext sicherheitsrelevanter Aspekte im Rahmen der pflanzlichen Gentechnik verstanden werden. Die Befürchtung eines horizontalen Gentransfers beschränkt sich nicht nur auf die Markergene. Prokaryontische Sequenzen des eingesetzten Vektors erlangen dann besondere Bedeutung im Hinblick auf die Gefahr eines horizontalen Gentransfers, wenn sich auf den Vektoren ausserhalb der T-DNA Antibiotikaresistenzgene befinden. Diese werden durch prokaryontische Promotoren reguliert und können daher auch in Bodenbakterien oder Bakterien des Intestinaltraktes abgelesen werden.

### **4.4.3 Proteinexpression**

Aussagen über die Expression der Transgene über die Transkriptionsebene hinaus sind nur begrenzt möglich. In der limitierten Anzahl an *vst1*-transgenen Pflanzen, die einer HPLC-Analyse zum Nachweis des Resveratrols unterzogen werden, konnte in allen untersuchten Pflanzen ein Peak detektiert werden, der mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine glykosilierte Form des Resveratrols repräsentiert (siehe auch 4.5.2). Ein derartiger Peak trat bei der Analyse der Kontrollpflanzen nicht auf. Damit gelang der indirekte Nachweis der Aktivität der Stilbensynthase. Post-transkriptionelle *Silencing*-Mechanismen kamen hier demnach nicht zum Tragen.

Die Expression des Kiwi-PGIP in den transgenen *Holsteiner Cox* kann derzeit noch nicht abschließend beurteilt werden. Zwar wurde die Transkription des Gens in allen PGIP-transgenen Pflanzen nachgewiesen, der Proteinnachweis steht allerdings noch aus. Ob möglicherweise gerade bei der Linie T/HC 01.1.3, die mit einer geschätzten Kopienanzahl von zehn eine sehr hohe Anzahl an Integrationen und zudem noch prokaryontische Vektorsequenzen aufweist, Inaktivierungsmechanismen auf post-transkriptioneller Ebene greifen, gilt es zukünftig zu untersuchen.

## 4.5 Nutzeffekte der Aktivität der Transgene

Die Nutzung eines gentechnischen Ansatzes zur Resistenzverbesserung von Pflanzen setzt die Wirksamkeit der transferierten Gene bzw. derer Produkte gegenüber den Zielpathogenen voraus. Die Stilbensynthase als Produkt des *vst1*-Gens synthetisiert das Phytoalexin Resveratrol, dessen antibiotisches Potenzial bereits gegen ein breites Spektrum pathogener Pilze nachgewiesen wurde. Die Wirksamkeit gegen *Botrytis cinerea* wurde frühzeitig u.a. von LANGCAKE & PRYCE (1976) erkannt und seitdem durch umfangreiche Untersuchungen homologer und heterologer Systeme bestätigt.

Das antifungale Potenzial der PGIPs wurden ebenfalls mehrfach dokumentiert (NUSS et al. 1996), wobei hierbei unterschiedliche Spezifitäten, auf die bereits in der Einleitung hingewiesen wurde, ausschlaggebend für die Wirksamkeit gegenüber den entsprechenden Pathogenen sein können. Im Gegensatz zu einigen anderen PGIPs ist über das PGIP aus Kiwi bisher wenig bekannt. Den Effekt auf relevante Krankheitserreger des Apfels sowohl *in vitro* als auch *in planta* gilt es daher zukünftig durch phytopathologische Tests zu ermitteln. Aufgrund der unterschiedlichen Spezifitäten sollten unbedingt verschiedene Pathogene in die Untersuchungen einbezogen werden.

### 4.5.1 Resveratrol *in vitro*

Aufschlüsse über den Effekt des Phytoalexins Resveratrol gegenüber dem Erreger des Apfelschorfes sollte eine Analyse des Keimungsverhaltens von *Venturia inaequalis*-Konidien auf einem resveratrolhaltigen Medium erbringen. Der *in vitro* Test ergab, dass bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml Resveratrol keine, bei der nächst höheren Konzentration von 100 µg/ml jedoch eine signifikante Hemmung der Sporenkeimung von *Venturia inaequalis* erzielt wurde. In zwei von drei unabhängigen Versuchen wurde bei

dieser Konzentration sogar keine bzw. lediglich eine 0,9%ige Sporenkeimung festgestellt. Möglicherweise sind daher bereits geringere Konzentrationen zwischen 10 und 100 µg/ml zur signifikanten Reduktion der Keimung ausreichend. Dies konnte aber im Rahmen der Arbeit nicht mehr abschließend beurteilt werden. Der fungitoxische Effekt von Resveratrol erstreckt sich somit auch auf den Erreger des Apfelschorfes. Die Biosynthese von Resveratrol in transgenen Apfelpflanzen könnte zu einer potenziellen Inhibition der Entwicklung dieses Erregers beitragen.

Das Erreichen von wirksamen Resveratrol-Konzentrationen der ermittelten Größenordnung *in planta* ist nicht unrealistisch. Ein Vergleich zu Literaturangaben gestaltet sich jedoch schwierig, da sich die dort angegebenen Mengen auf Gramm eingesetztes Frischgewicht beziehen. Setzt man ein Volumen von 1 ml jedoch näherungsweise gleich mit einem Gewicht von 1 g, sind solche Mengen durchaus zu erwarten. KOBAYASHI et al. (2000) wiesen in jungen Blättern transgener Kiwi Pflanzen 182 µg/g Frischgewicht Resveratrol nach, das nach seiner Synthese allerdings glykosidisch gebunden wurde. HAIN et al. (1993) detektierten in transgenen Tabakpflanzen sogar bis zu 400 µg Resveratrol pro g Frischgewicht.

#### 4.5.2 Resveratrol *in planta*

Der Nachweis von Resveratrol ist mittels chromatographischer Methoden wie HPLC (HAIN et al. 1990, PEZET et al. 1994, JEANDET et al. 1995, JEANDET et al. 1997, HIPSKIND & PAIVA 2000, ROMERO-PÉREZ et al. 2001, DOMÍNGUEZ et al. 2001, MALOVANÁ et al. 2001) oder Gaschromatographie-Massenspektroskopie (LUAN et al. 2000) möglich.

Die HPLC-Analysen von Extrakten der transgenen *vst1*-Pflanzen T/HC 2, T/HC 12, T/HC 50 und T/HC 30.2 ergaben, dass nicht freies, sondern wohl eine Glykosid-Form von Resveratrol in den *Holsteiner Cox* Pflanzen vorliegt. Die reduzierte Retentionszeit des in den transgenen Proben detektierten Peaks, das nahezu identische Absorptionsspektrum im Vergleich zu dem des freien Resveratrols und die Freisetzung von Resveratrol nach saurer Hydrolyse lassen diese Vermutung zu. Eine genauere Charakterisierung des Resveratrol-Glykosids wurde im Rahmen der Arbeit nicht vorgenommen. Das Vorkommen solcher Resveratrol-derivate ist nicht unüblich. Nach der Synthese von Resveratrol kann es zur Konjugation mit Zuckern oder anderen Derivationen wie Methylierung, Prenylierung oder Kondensationsreaktionen mit der Folge der Bildung speziesspezifischer Dimere, Trimere oder Tetramere kommen (SOTHEESWARAN & PASUPATHY 1993). Sowohl in *Vitis* Spezies

(LANGCAKE & PRYCE 1976, WATERHOUSE & LAMUELA-RAVENTÓS 1994, ROMERO-PÉREZ et al. 2001) treten glykosidierte Formen auf, als auch bei transgenen Pflanzen nach dem Transfer einer Stilbensynthase (KOBAYASHI et al. 2000, HIPSKIND & PAIVA 2000).

Über die Wirksamkeit von Resveratrolglykosiden auf fungale Krankheitserreger liegen konträre Ergebnisse vor. HIPSKIND & PAIVA (2000) erzielten durch die konstitutive Akkumulation des Resveratrolglykosids Trans-Resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glycopyranosid (Piceid) in transgenen *Alfalfa* eine erhöhte Resistenz gegen das Pathogen *Phoma medicaginis*. Eine Konzentration um 20  $\mu\text{g/g}$  FW war hier ausreichend, um die Symptomausprägung um nahezu 50% zu reduzieren. Die inhibierende Wirkung des Resveratrolglykosids wurde parallel durch einen *in vitro* Test bestätigt. Im Gegensatz dazu konnten KOBAYASHI et al. (2000) trotz der Detektion von 182  $\mu\text{g}$  Piceid pro g Frischgewicht keine erhöhte Resistenz transgener Kiwi-Pflanzen gegenüber *Botrytis cinerea* beobachten.

Ein interessanter Aspekt ergibt sich aus der Tatsache, dass *Venturia inaequalis* Sporen während ihrer Keimung hydrolytische Enzyme, darunter auch Glykosidasen (WAGNER et al. 1988) produzieren. Hypothetisch betrachtet könnten bei einer Infektion der transgenen Apfel-Pflanzen mit dem Apfelschorferreger diese Glykosidasen zur Freisetzung des wirksamen Aglykons führen.

Erste phytopathologische Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit mit dem Apfelmehltauerreger *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. durchgeführt wurden, hatten die Evaluierung des Resistenzniveaus der *vst1*-transgenen Pflanzen gegenüber diesem Pathogen zum Ziel. *In vitro* Hemmtests mit Resveratrol und diesem Pathogen ließen sich nicht durchführen, da *Podosphaera leucotricha* streng biotroph lebt und daher ausschließlich auf lebendes Gewebe angewiesen ist.

Als Bewertungskriterien der biologischen Tests mit dem Mehltauerreger wurden die Anzahl der Konidien pro Konidienträger (KRIEGHOFF 1995) sowie der prozentuale Befall der Blätter (GOSZYZYNSKI & CIMANOWSKI 1985) zu Grunde gelegt. Auf den betrachteten Ebenen konnten allerdings keine Unterschiede im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollpflanzen ausgemacht werden. Die Gründe hierfür können vielschichtig sein. Bisher fehlende detaillierte Ergebnisse über die tatsächliche Form des Resveratrols und die Konzentration, in der es in den Pflanzen vorliegt, gestalten die Ursachenforschung schwierig. Eine fehlende Induktion des *vst1*-Promotors durch den Mehлтаubefall als Ursache der fehlenden Resistenzerhöhung ist unwahrscheinlich, da die

Elicitorinduzierbarkeit durch Mehltauinfektion nachgewiesen wurde. Möglicherweise erfolgte die mRNA Akkumulation jedoch verzögert oder zu spät. HAIN et al. (1993) zeigten, dass eine transgene Tabaklinie aufgrund einer schnelleren Akkumulation der Stilbensynthese-mRNA resistenter gegenüber *Borytis cinerea* war, als eine andere transgene Tabaklinie, deren mRNA deutlich verzögert akkumulierte.

Die in den Pflanzen eventuell stattfindende Glykosidierung des Resveratrols und eine damit möglicherweise einher gehende Abnahme der antifungalen Wirkung (KOBAYASHI et al. 2000) muss als eine Ursache in Betracht gezogen werden. Da aber auch eine Glykosidierung nicht zwangsläufig die Wirksamkeit einschränkt (HIPSKIND & PAIVA 2000), ist auch eine unzureichende Konzentration bzw. Akkumulation des Resveratrols bzw. dessen Glykosiden als limitierender Faktor denkbar. *In vitro* Tests belegen, dass je nach Erreger unterschiedliche Konzentrationen von Resveratrol benötigt werden, um eine Hemmung der Sporenkeimung hervorzurufen. Während in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass eine Konzentration von 100 µg/ml die Sporenkeimung von *Venturia inaequalis* signifikant hemmt, reichten bei LANGCAKE & PRYCE (1976) noch nicht einmal 200 µg aus, um die Keimung von *Botrytis cinerea* zu inhibieren. In einer Resveratrol-Flüssigkultur führten 160 µg/ml Resveratrol zu einer vollständigen Inhibierung der Keimung von *Botrytis cinerea* (ADRIAN et al. 1997). Diese Ergebnisse lassen weitere biologische Tests, vor allem mit dem Erreger des Apfelschorfes *Venturia inaequalis*, sinnvoll erscheinen, gerade vor dem Hintergrund, dass eine inhibierende Wirkung von Resveratrol *in vitro* bewiesen wurde und hier möglicherweise auch geringere Konzentrationen eine höhere Wirkung erzielen.

Ein anderer Aspekt bei der Nutzenanwendung von resveratrolproduzierenden Pflanzen, unabhängig von der antifungalen Wirkung, ist der positive Effekt auf die menschliche Gesundheit. Eingeschlossen darin auch das Resveratrol-Glucosid Piceid. WATERHOUSE & LAMUELA-RAVENTÓS (1994) verweisen auf Untersuchungen an *Polygonum cuspidatum* Wurzeln, die einen sehr hohen Piceidgehalt besitzen und in Asien zur Behandlung diverser Krankheiten eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang berufen sich auch KOBAYASHI et al. (2000) auf Publikationen, in denen auch ein positiver Effekt von glykosidiertem Resveratrol demonstriert wurde.

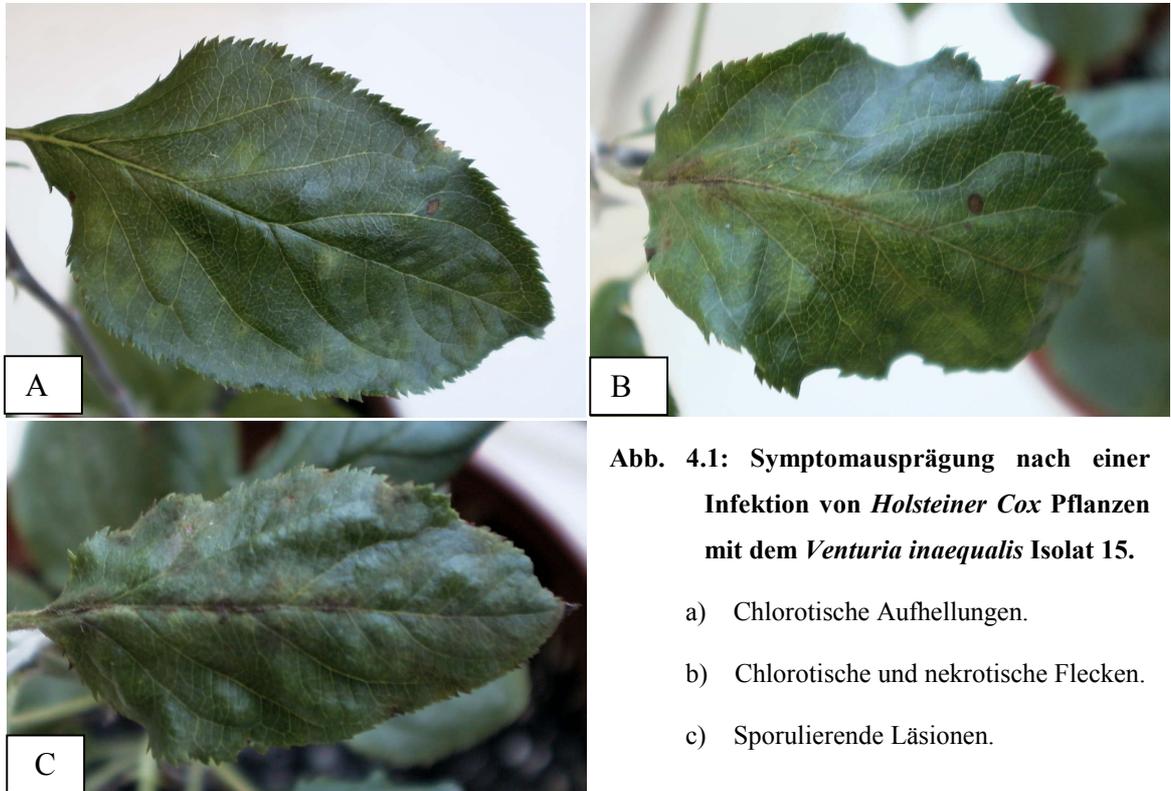
Der Apfel stellt als roh zu verzehrende Frucht, die in hohen Mengen konsumiert werden kann, eine interessante alternative Resveratrol-Quelle dar. Stellt man diese Wirkung jedoch in den Mittelpunkt des Interesses, ist eine konstitutive Expression der Stilbensynthese

sinnvoller als eine induzierte, vorausgesetzt, dass daraus keine für die Pflanzen negativen physiologischen Effekte resultieren.

## 4.6 Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurde das Phytoalexinspektrum der Apfelsorten *Holsteiner Cox* und *Elstar* durch die Biosynthese von Resveratrol bzw. eines Derivates gezielt erweitert. Die transgenen Pflanzen stellen somit interessante Modelle für phytopathologische Untersuchungen zur Resistenztestung dar. Aufgrund der *in vitro* festgestellten keimungsinhibierenden Wirkung von Resveratrol auf Sporen des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*, sollte dieser Pilz vornehmlich in die Untersuchungen einbezogen werden.

Die Virulenz von *Venturia inaequalis* Isolaten gegenüber Apfelsorten kann variieren (KOCH et al. 2000). Mit dem Isolat 15, das von Frau Dipl.-Ing. K. Schulze (Institut für Gemüse- und Obstbau, Abteilung Obstbau der Universität Hannover) isoliert und bereitgestellt wurde und welches auch in den *in vitro* Tests verwendet wurde, steht bereits eine *Venturia inaequalis* Kultur zur Verfügung, die für die Resistenztestung herangezogen werden kann. Die Virulenz dieses aus Läsionen von *Elstar* isolierten (Schulze, persönliche Mitteilung) *Venturia inaequalis* Isolates wurde auch gegenüber *Holsteiner Cox* bestätigt. Nach einer Infektion von *Holsteiner Cox* Pflanzen mit diesem Isolat traten die typischen Krankheitssymptome in Form chlorotischer und/oder nekrotischer Flecken und/oder sporulierender Läsionen auf (Abb. 4.1). Diese Symptome stellen die Grundlage verschiedener Bewertungsschemata dar (KOCH ET AL. 2000, CHEVALIER et al. 1991).



**Abb. 4.1: Symptomausprägung nach einer Infektion von *Holsteiner Cox* Pflanzen mit dem *Venturia inaequalis* Isolat 15.**

- a) Chlorotische Aufhellungen.
- b) Chlorotische und nekrotische Flecken.
- c) Sporulierende Läsionen.

Resistenzmechanismen können auf verschiedenen Ebenen des Infektionsprozesses zum Tragen kommen. Detaillierte Untersuchungen der Pathogenese verschiedener fungaler Krankheitserreger auf Ebene der Stromaentwicklung, Vermehrungsrate der Konidien und Symptomausprägung sind zukünftig von Nöten, um das antifungale Potenzial der übertragenen Gene in den transgenen Apfelpflanzen zu ermessen. Bevor auch die PGIP-transgenen Pflanzen in die Untersuchungen einbezogen werden, sollte die Proteinexpression zweifelsfrei nachgewiesen werden. Hier bieten sich Nachweise über spezifische Antikörper gegen die PGIPs aus Kiwi an. Allerdings muss eine hohe Spezifität des Antikörpers gewährleistet sein, um Kreuzreaktionen mit dem endogenen *Malus* PGIP zu vermeiden.

Parallel sollten Langzeituntersuchungen zur Stabilität der Transgene durchgeführt werden. Dazu wurden die transgenen Pflanzen auf die Unterlage M7 gepfropft, um möglichst schnell die adulte Phase zu erreichen. Die Stabilität der Expression der Transgene, die

Blütenbildung, der Fruchtansatz und die Fruchtqualität sollten eingehend untersucht werden, um mögliche negative Effekte zu detektieren und zu beurteilen.

Desweiteren eröffnet die Etablierung der stabilen Regenerations- und Transformationssysteme für die wichtigsten Apfelsorten des Alten Landes die Möglichkeit, weitere, agronomisch bedeutende Gene in die Sorten einzubringen. Aufgrund der in einigen transgenen Linien nachgewiesenen Rückgratsequenzen der Transformationsvektoren sollte jedoch zukünftig auf Vektoren fokussiert werden, die unter Berücksichtigung sicherheitsrelevanter Aspekte optimiert wurden. Die Gruppe um HELLENS et al. (2000) stellt zum Beispiel Vektoren aus der pGreen-Serie (HELLENS & MULLINEAUX 2000) vor. Die Größe dieser Vektoren ist auf ein Minimum reduziert und ohne ein Helferplasmid ist die Replikation und die Mobilisierung zwischen Bakterien nicht möglich. In der limitierten Anzahl Pflanzen, die nach der Transformation mit pGreen Vektoren untersucht wurden, sind keine Vektorsequenzen, die ausserhalb der T-DNA lagen, nachgewiesen worden.

## 5 Literatur

- Abu-Goukh A.A., Strans L.L., Labavitch J.M. (1983) Development-related changes in decay susceptibility and polygalacturonase inhibitor content of „Bartlett“ pear fruit. *Physiol Plant Pathol* **23**: 101-109.
- Adrian M., Jeandet P., Veneau J., Weston L.A. and Bessis R. (1997) Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J Chem Ecol* **23** (7): 1689-1702.
- Ai-Ping D., Hong-Fan W. and Yu-Fen C. (1995) Plant regeneration from cotyledon and cell suspension protoplasts of apple (*Malus x domestica* cv. Starkrimson). *Plant Cell Tiss Org Cult* **40**: 145-149.
- Arachi H., Kimura Y., Okuda H., Baba K., Kozawa M. and Arachi S. (1982) Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. n lipid metabolism. *Chem Pharm Bull* **30**: 1766-1770.
- Barbieri C. and Morini S. (1987) *In vitro* regeneration from somatic tissues and seed explants of apple. *Adv Hort Sci* **1**: 8-10.
- Becker, D., E. Kemper, J. Schell, and R. Masterson (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* **20** (6):1195-1197.
- Belaizi M., Paul H., Sangwan R.S. and Sangwan-Norreel B.S. (1991) Direct organogenesis from internodal segments of *in vitro* grown shoots apple cv. Golden delicious. *Plant Cell Rep* **9**: 471-474.
- Bénaouf G. and Parisi L. (2000) Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology* **90** (3): 236-242.
- Berger D.K., Oelofse D., Arendse M.S., Du Plessis E. and Dubery I.A. (2000) Bean polygalacturonase inhibitor protein-1 (PGIP-1) inhibits polygalacturonases from *Stenocarpella maydis*. *Physiol Mol Plant Pathol* **57**: 5-14.
- Bergmann C.W., Ito Y., Singer D., Albersheim P. and Darvill A.G. (1994) Polygalacturonase-inhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors and fungal infection. *Plant J* **5** (5): 625-634.
- Bertelli A.A., Giovannini L., Giannessi D., Migliori M., Bernini W., Fregoni M., Bertelli A. (1995) Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* **17**: 1.

- Berthomieu P. and Meyer C. (1991) Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Mol Biol* **17**: 555-557.
- Block R. und Lankes C. (1996) Maßnahmen gegen die Verbräunung bei der *in-vitro*-Etablierung der Apfelunterlage M9. *Gartenbauwissenschaft* **61** (1): 11-17.
- Bolar J.P., Brown S.K., Norelli J.L. and Aldwinckle H. (1999) Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **55**: 31-38.
- Bolar J.P., Norelli J.L. and Aldwinckle H.S. (1998) An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. *Hort Sci* **33** (7): 1251-1252.
- Bolar J.P., Norelli J.L., Wong K-W., Hayes K., Harman G.E. and Aldwickle H. (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *The American Phytopathological Society* **90** (1): 72-77.
- Bömeke H. (1978) Der Apfelmehltau: der Pilz und seine Bekämpfungszeit. Mitt. DVR, Jork 33: 190-198.
- Büttner R., Geibel M. & Fischer C. (1999) Das genetische Potential an Schorf- und Mehlauresistenz in *Malus*-Wildarten. *Erwerbsobstbau* **41**: 102-105.
- Caboni E. and Tonelli M.G. (1999) Effect of 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple. *Plant Cell Rep* **18**: 985-988.
- Caboni E., Lauri P. and D'Angeli S. (2000) *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Rep* **19**: 755-760.
- Cantos E., Espín J.C. and Tomás-Barberán F.A. (2001) Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new „functional“ fruit? *J Agric Food Chem* **49**: 5052-5058.
- Cao X., Liu Q., Rowland L.J. and Hammerschlag F.A. (1998) GUS expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. *Plant Cell Rep* **18**: 266-270.
- Cervone F., De Lorenzo G., Pressey R., Darvill A.G. and Albersheim P. (1990) Can Phaseolus PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochemistry* **29** (2): 447-449.
- Chareonpornwattana S., Thara K.V., Wang L., Datta S.K., Panbangred W. and Muthukrishnan (1999) Inheritance, expression, and silencing of a chitinase transgene in rice. *Theor Appl Genet* **98**: 371-378.

- Chevalier M., Lespinasse Y. and 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 Pathol* **40**: 249-256.
- Christiansen J. and Fønnesbech M. (1975) Prevention by polyvinylpyrrolidone of growth inhibition of Hamamelis shoot tips grown *in vitro* and of browning of the agar medium. *Acta Hort* **54**: 101-104.
- Cluster P.D., O'Dell M., Metzloff M. and Flavell R.B. (1996) Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Mol Biol* **32**: 1197-1203.
- Coutos-Thévenot P., Poinssot B., Bonomelli A., Yean H., Breda C., Buffard D., Esnault R., Hain R. and Boulay M. (2001) *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J Exp Bot* **52** (358): 901-910.
- Daigny G., Paul H., Sangwan R.S. and Sangwan-Norreel B.S. (1996) Factors influencing secondary embryogenesis in *Malus x domestica* Borkh. (cv. 'Gloster 69'). *Plant Cell Rep* **16**: 153-157.
- Dandekar A.M., Uratsu S.L. and Matsuta N. (1990) Factors influencing virulence in *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Acta Hort* **280**: 483-494.
- Dangl J.L. & Jones J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gosselé V., Movva N.R., Thompson C., Van Montagu M. and Leemans J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* **6** (9): 2513-2518.
- De Bondt A., Eggermont K., Druart P., De Vil M., Goderis I., Vanderleyden J. and Broekaert W.F. (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep* **13**: 587-593.
- De Bondt A., Eggermont K., Penninckx I., Goderis I. and Broekaert W.F. (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* **15**: 549-554.
- De Buck S., De Wilde C., van Montagu M. and Depicker A. (2000) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants

- obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* **6**: 459-468.
- De Klerk G.-J., Keppel M., Ter Brugge J. and Meekes H. (1995) Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *J Exp Bot* **46** (289): 965-972.
- De Klerk G.-J., Ter Brugge J. and Marinova S. (1997) Effectiveness of indolacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Cell Tiss Org Cult* **49**: 39-44.
- De Lorenzo G., D'Ovidio R. and Cervone F. (2001) The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against fungi. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 313-335.
- De Neve M., De Buck S., De Wilde C., van Houdt H., Strobbe I., Jacobs A., van Montagu M. and Depicker A. (1999) Gene silencing results in instability of antibody production in transgenic plants. *Mol Gen Genet* **260**: 582-592.
- De Wilde C., Podevin N., Windels P. and Depicker A. (2001) Silencing of antibody genes in plants with single copy transgene inserts as a result of gene dosage effects. *Mol Gen Genet* **265**: 647-653.
- De Wilde C., van Houdt H., De Buck S., Angenon G., De Jaeger G and Depicker A. (2000) Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Mol Biol* **43**: 347-359.
- Dercks W. and Creasy L.L. (1989) The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol Mol Plant Pathol* **34**: 189-202.
- Desiderio A., Aracri B., Leckie F. Mattei B., Salvi G., Tigelaar H., Van Roekel J.S.C., Baulcombe D.C., Melchers L.S., De Lorenzo G. and Cervone F. (1997) Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microb Interact* **10** (7): 852-860.
- Devoto A., Clark A.J., Nuss L., Cervone F. and De Lorenzo G. (1997) Developmental and pathogen-induced accumulation of transcripts of polygalacturonase-inhibiting protein in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **202**: 284-292.
- Devoto A., Leckie F., Lupotto E., Cervone F. and De Lorenzo G. (1998) The promotor of a gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein of *Phaseolus vulgaris* L. is activated by wounding but not by elicitors or pathogen infection. *Planta* **205**: 165-174.
- Diéguez M.J., Vaucheret H., Paszkowski J. and Mittelsten Scheid O. (1998) Cytosine methylation at CG and CNG sites is not a prerequisite for the initiation of

- transkriptional gene silencing in plants, but it is required for its maintenance. *Mol Gen Genet* **259**: 207-215.
- Dixon R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- Domínguez C., Guillén D.A. and Barroso C.G. (2001) Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *J Chromatogr A* **918**: 303-310.
- Doyle J.J. and J.L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12** (1): 13-15.
- Dufour M. (1990) Improving yield of adventitious shoots in apple. *Acta Hort* **280**: 51-60.
- Elstner E.F., Oßwald W., Schneider I. (1996) Phytopathologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Espín J.C., Morales M., Varón R., Tudela J. and García-Cánovas (1995) Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Verdedoncella apple. *J Agric Food Chem* **43**: 2807-2812.
- Famiani F., Ferradini N., Staffolani P. and Standardi A. (1994) Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M.26 apple rootstock. *J Hort Sci* **69** (4): 679-685.
- Favaron F., D'Ovidio R., Porceddu E., Alghisi P. (1994) Purification and molecular characterization of a soybean Polygalacturonase-inhibiting protein. *Planta* **195**: 80-87.
- Ferradini N., Famiani F., Proietti P. and Stanica F. (1996) Influence of growth regulators and light on the *in vitro* shoot regeneration in M.26 apple rootstock. *J Hort Sci* **71** (6): 859-865.
- Fischer C. (1999) Ergebnisse der Apfelzüchtung in Dresden-Pillnitz (1999) *Erwerbsobstbau* **41**: 65-74.
- Fischer M. and Fischer C. (1999) Evaluation of *Malus* species and cultivars at the fruit genebank Dresden-Pillnitz and its use for apple resistance breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**: 235-241.
- Friedrich G (Hrsg.) (1996) Pflanzenschutz im integrierten Anbau. 3.Auflage, Ulmer, Stuttgart.
- Gamborg O. L. and Phillips G. C. (Eds.) 1995. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Verlag Berlin, Heidelberg.

- Gercheva P., Zimmerman R.H., Owens L.D., Berry C. and Hammerschlag F.A. (1994) Particle bombardment of apple leaf explants influences adventitious shoot formation. *Hort Sci* **29** (12): 1536-1538.
- Ghorbel R., La-Malfa S., López M., Petit A., Navarro L. and Peña L. (2001) Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiol Mol Plant Pathol* **58**: 103-110.
- Gianfranceschi L., Koller B., Seglias N., Kellerhals M. and Gessler C. (1996) Molecular selection in apple for resistance to scab caused by *Venturia inaequalis*. *Theor Appl Genet* **93**: 199-204.
- Goetz G., Fkyerat A., Métais N., Kunz M., Tabacchi R., Pezet R. and Pont V. (1999) Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**: 759-767.
- Goszczyński W. and Cimanowski J. (1985) Evaluation of inoculation techniques of apple leaves with conidia of the fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. under laboratory conditions. *Fruit Science Reports* **12** (3): 103-107.
- Grafe C. and Wricke G. (1998) Increase of *in vitro* regeneration in *Malus domestica* by the application of phosphatase inhibitors. *Plant Breeding* **117**: 563-566.
- Hain R., Bieseler B., Kindl H., Schröder G. and Stöcker R. (1990) Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol Biol* **15**: 325-335.
- Hain R., Reif H.-J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stöcker R.H. and Stenzel K. (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**: 153-156.
- Hammerschlag F.A., Zimmermann R.H., Yadava U.L., Hunsucker S. and Gercheva P. (1997) Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explants and on shoot regeneration. *J Amer Soc Hort Sci* **122** (6): 758-763.
- Hanke V. und Fischer M. (1994) Biotechnologie - eine Chance für die Obstzüchtung? *Erwerbsobstbau* **32** (2).
- Hanke V., Rohde A. and Grafe C. (1991) Untersuchungen zur Regeneration an somatischem Gewebe *in vitro* I. Zur Adventivsproßbildung an Blatexplantaten bei Apfel (*Malus domestica* Borkh.) *Gartenbauwissenschaft* **56** (5): 214-220.
- Heldt H.W. (1996) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford.

- Hellens R. and Mullineaux P. (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Sci* **5** (10); 446-451.
- Hellens R.P., Edwards E.A., Leyland N.R., Bean S. and Mullineaux P.M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**: 819-832.
- Hipskind J.D. and Paiva N.L. (2000) Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol Plant Microb Interact* **13** (5): 551-562.
- Hobbs S.L.A., Warkentin T.D. and De Long C.M.O. (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol Biol* **21**: 17-26.
- Hock B., Fedtke C., Schmidt R.R. (1995) *Herbizide*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York. 1. Auflage.
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., and Schilperoort R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180.
- Holefors A., Xue Z.-T. and Welander M. (1998) Transformation of apple rootstock M26 with the *rolA* gene and its influence on growth. *Plant Sci* **136**: 69-78.
- Holefors A., Xue Z.-T., Zhu L.-H. and Welander M. (2000) The *Arabidopsis* phytochrome B gene influences growth of the apple rootstock M26. *Plant Cell Rep* **19**: 1049-1056.
- Hood E.E., Gelvin S.B., Melchers L.S. and Hoekema A. (1993) New *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Transgenic Res* **2**: 208-218.
- Hooykaas P.J.J. and Schilperoort R.A. (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* **19**: 15-38.
- Hrazdina G., Borejsza-Wysocki W. and Lester C. (1997) Phytoalexin production in an apple cultivar resistant to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **87** (3): 868-876.
- Huancaruna Perales E. and Schieder O. (1993) Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. *Plant Cell Tiss Org Cult* **34**: 71-76.
- Huang L.C., Kohashi C., Vangundy R. and Murashige T. (1995) Effects of common components on hardness of culture media prepared with gelrite. *In Vitro Cell Dev Biol* **31**: 84-89.

- Humara J.M., López M. and Ordás R.J. (1999) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Rep* **19**: 51-58.
- Hutchinson M.J., Murr D.P., Krishnaraj S. (1997) Does ethylene play a role in thidiazuron-regulated somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x Hortorum* Bailey) hypocotyl cultures? *In vitro cell dev biol Plant* **33** (2): 136-141.
- Hyung N.I., Lee C.H. and Kim S.B. (1995) Foreign gene transfer using electroporation and transient expression in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Acta Hort* **392**: 179-185.
- Ingham J. L. (1976) 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnut (*Arachis hypogae*). *Phytochemistry* **15**: 1791-1793.
- Ingham J. L. (1978) Isoflavonoid and stilbene phytoalexins of the genus *Trifolium*. *Biochem Syst Ecol* **6**: 217-223.
- James D.J., Passay A.J. and Baker S.A. (1995) Transgenic apples display stable gene expression in the fruit and Mendelian segregation of the transgenes in the R1 progeny. *Euphytica* **85**: 109-112.
- James D.J., Passay A.J., Baker S.A. and Wilson F.M. (1996) Transgenes display stable patterns of expression in apple fruit and mendelian segregation in the progeny. *Bio/Technology* **14**: 56-60.
- James D.J., Passey A.J. and Rugini E. (1988) Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. *J Plant Physiol* **132**: 148-154.
- James D.J., Passey A.J., Barbara D.J. and Bevan M (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep* **7**: 658-661.
- James D.J., Passey A.J., Webster A.D., Barbara D.J., Dandekar A.M. and Uratsu S.L. (1993b) Transgenic apples and strawberries: advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. *Acta Hort* **336**: 179-184.
- James D.J., Uratsu S., Cheng J., Negri P., Viss P. and Dandekar A.M. (1993a) Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Rep* **12**: 559-563.
- James J.D., Passey A.J. and Barbara D.J. (1990) Regeneration and transformation of apple and strawberry using disarmed Ti-binary vectors. In: Lycett G.W. and Grierson D. (eds.) *Genetic engineering of crop plants*, 239-248.

- James J.T. and Dubery I.A. (2001) Inhibition of polygalacturonase from *Verticillium dahliae* by a polygalacturonase inhibiting protein from cotton. *Phytochemistry* **57**: 149-156.
- Janick J., Cummins J.N., Brown S.K. and Hemmat M. (1996) Apples. In: J. Janick and J.M. Moore (eds.) *Fruit Breed, Vol. I: Tree and Tropical Fruits*.
- Jeandet P., Bessis R., Sbaghi M. and Meunier P. (1995) Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis cinerea* attack under natural conditions. *J Phytopathology* **143**: 135-139.
- Jeandet P., Breuil A.C., Adrian M., Weston L.A., Debord S., Meunier P., Maume G. and Bessis R. (1997) HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal Chem* **69**: 5172-5177.
- Jeandet P., Sbaghi M., Bessis R. (1993) The significance of stilbene-type phytoalexin degradation by culture filtrates of *Botrytis cinerea* in the vine-Botrytis interaction. In: B. Fritig and M. Legrand (eds.), *Mechanisms of Plant Defenses Responses*, 84.
- Johnston D .J., Ramanathan V. and Williamson B. (1993) A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other microorganisms. *J Exp Bot* **44**: 971-976.
- Johnston D.J. and Williamson B. (1992) Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Myc Res* **96** (5): 343-349.
- Johnston D.J., Williamson B. and McMillan G.P. (1994) The interaction *in planta* of polygalacturonases from *Botrytis cinerea* with a cell wall-bound polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in raspberry fruits. *J Exp Bot* **45** (281): 1837-1843.
- Karhu S.T. (1997) Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. *J Amer Soc Hort Sci* **122** (4): 476-480.
- Kataeva N.V., Alexandrova I.G., Butenko R.G. and Dragavtceva E.V. (1991) Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **27**: 149-154.
- Kellerhals M. and Furrer B. (1994) Approaches for breeding apples with durable disease resistance. *Euphytica* **77**: 31-35.
- Keulemans J. and De Witte K. (1994) Plant regeneration from cotyledons and embryonic axes in apple: Sites of reaction and effect of pre-culture in the light. *Euphytica* **77**: 135-139.

- Kiesecker H. (1999) Entwicklung eines *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfersystems für Kichererbsen (*Cicer arietinum* L.) Dissertation vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
- Kobayashi S., Ding C.K., Nakamura Y., Nakajima I. and Matsumoto R. (2000) Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Rep* **19**: 904-910.
- Koch T., Kellerhals M. and Gessler C. (2000) Virulence patterns of *Venturia inaequalis* field isolates and corresponding differential resistance in *Malus x domestica*. *J Phytopathology* **148**: 357-364.
- Kohli A., Gahakwa D., Vain P., Laurie D.A. and Christou P. (1999) Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* **208**: 88-97.
- Kollar A. (1997) Aktuelle Forschung an dem bedeutendsten Erreger im Apfelanbau, dem Apfelschorfpilz *Venturia inaequalis*. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* **49** (5): 131-136.
- Koller B., Gianfranceschi L., Seglias N., McDermott J. and Gessler C. (1994) DNA-markers linked to the *Malus floribunda* 821 scab resistance. *Plant Mol Biol* **26**: 597-602.
- Komjanc M., Festi S., Rizzotti L., Cattivelli L., Cervone F. and De Lorenzo G. (1999) A leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRPKm1) gene is induced in *Malus x domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment. *Plant Mol Biol* **40**: 945-957.
- Kononov M.E., Bassuer B. and Gelvin S.B. (1997) Integration of t-DNA vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant J* **11** (5): 945-957.
- Korban S. S. and Chen H. (1992) Apple. In: *Biotechnology in Agriculture*. Wallingford, Oxford, UK: **8**: 203-227.
- Korban S. S. and Skirvin R. M. (1984) Nomenclature of the cultivated apple. *Hort Sci* **19**: 177-180.
- Krieghoff O. (1995) Entwicklung einer *In-vitro*-Selektionsmethode auf Resistent von *Malus*-Genotypen gegenüber *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. und *In-vitro*-Differenzierung von Virulenzunterschieden des Erregers. Dissertation der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin.

- Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., Hanzer V., Kalthoff B., Weiß H., Mattanovich D., Regner F. and Katinger H. (1991) A new, efficient method using 8-hydroxy-quinolinol-sulfate for the initiation and establishment of tissue cultures of apple from adult material. *Plant Cell Tiss Org Cult* **27**: 155-160.
- Lambert C. and Tepfer D. (1992) Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theor Appl Genet* **85**: 105-109.
- Langcake P. and Pryce R.J. (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* **9**: 77-86.
- Leckband G. and Lörz H. (1998) Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor Appl Genet* **96**: 1001-1012.
- Leckie F., Mattei B., Capodicasa C., Hemmings A., Nuss L., Aracri B., De Lorenzo G. and Cervone F. (1999) The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed  $\beta$ -strand/ $\beta$ -turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *EMBO J* **18** (9): 2352-2363.
- Li Z., Traore A., Maximova S. and Gultinan M.J. (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of Cacao (*Theobroma Cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **34**: 293-299.
- Liang H., Zheng J., Duan X., Sheng B., Jia S., Wang D., Ouyang J., Li J., Tian W., Hain R. and Jia X. (2000) A transgenic wheat with a stilbene synthase gene resistant to powdery mildew obtained by biolistic method. *Chinese Science Bulletin* **45** (7): 634-638.
- Lin C.H., Wang R.J. and Jauh G.Y. (1989) Enhancement of callus formation on grape single bud cuttings by TDZ. *Acta Hort* **239**: 129-132.
- Ling H.-Q., Kriseleit D. and Ganai M.W. (1998) Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Rep* **17**: 843-847.
- Liswidowati, Melchior F., Hohmann F., Schwer B. and Kindl H. (1991) Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta* **183**: 307-314.

- Liu Q., Ingersoll J., Owens L., Salih S., Meng R. and Hammerschlag F. (2001) Response of transgenic Royal Gala apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots carrying a modified cecropin *MB39* gene, to *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Rep* **20**: 306-312.
- Liu Q., Salih S. and Hammerschlag F. (1998) Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced  $\beta$ -glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Rep* **18**: 32-36.
- Luan T., Li G., Zhang Z. (2000) Gas-phase postderivatization following solid-phase microextraction for rapid determination of *trans*-resveratrol in wine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **424**: 19-25.
- Lübke A. (2000) Optimierung der Transformationseffizienz bei *Malus domestica* (Borkh.) Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Ma J.-H., Yao J.-L., Cohen D. and Morris B. (1998) Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Rep* **17**: 211-214.
- Maheswaran G., Welander M., Hutchinson J.F., Graham M.W. and Richards D. (1992) Transformation of apple rootstock M26 with *Agrobacterium tumefaciens*. *J Plant Physiol* **139**: 560-568.
- Malavasi F.F.F. and Predieri S. (1990) Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. *Acta Hort* **280**: 61-68.
- Malovaná S., Montelongo F.J.G., Pérez J.P. and Rodríguez-Delgado M.A. (2001) Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* **428**: 245-253.
- Manna S.K., Mukhopadhyay A. and Aggarwal B.B. (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- $\kappa$ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *The Journal of Immunology* **164**: 6509-6519.
- Mantinger H. (1999) Apfelsortenprüfung und Sortenzüchtung am Versuchszentrum Laimburg (Südtirol). *Erwerbsobstbau* **41**: 106-110.
- Martineau B., Voelker T.A. and Sandres R.A. (1994) On defining T-DNA. (Letter to the editor.) *Plant Cell* **6**: 1032-1033.
- Matzke M.A., Primig M., Trnovsky J. and Matzke A.J.M. (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J* **8**: 643-649.

- Maximova S.N., Dandekar A.M. and Guiltinan M.J. (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.
- Mayr U., Michalek S., Treutter D. and Feucht W. (1997) Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *J Phytopathology* **145**: 69-75.
- Modgil M., Sharma D.R. and Bhardwaj S.V. (1999) Micropropagation of apple cv. Tydemans' Early Worcester. *Scientia Hort* **81**: 179-188.
- Mok M.C., Mok D.W.S., Armstrong D.J. (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea (thidiazuron). *Phytochemistry* **21**: 1509-1511.
- Mooney P.A. and Goodwin P.B. (1989) Presumptive transformation of apples by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hort* **240**: 59-61.
- Müller K.O., Börger H. (1940) Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel. Arb. Biol. Reichenstadt. Land- und Forstwirtsch., Berlin **23**: 189-231.
- Müller M. and Gessler C. (1993) A protein from apple leaves inhibits pectolytic activity of *Venturia inaequalis* *in vitro*. In: B. Fritig and M. Legrand (eds.), *Mechanisms of Plant Defenses Responses*, 68-71.
- Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Murthy B.N.S., Murch S.J. and Saxena P.K. (1995) Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol Plant* **94**: 268-276.
- Murthy B.N.S., Murch S.J. and Saxena P.K. (1998) Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **34**: 267-275.
- Nakagawa H., Kiyozuka Y., Uemura Y., Senzaki H., Shikata N., Hioki K and Tsubura A. (2001) Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**: 258-264.
- Nomura K., Matsumoto S., Masuda K. and Inoue M. (1998) Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple root stock M26. *Plant Cell Rep* **17**: 597-600.
- Norelli J., Mills J.A. and Aldwinckle H. (1996) Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Hort Sci* **31** (6): 1026-1027.

- Norelli J.L. and Aldwinckle H.S. (1993) The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase-transgenic apple tissue. *J Amer Soc Hort Sci* **118** (2): 311-316.
- Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Destéfano-Beltrán L. and Jaynes J.M. (1994) Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* **77**: 123-128.
- Nuss L. Mahé A., Clark A.J., Grisvard J., Dron M., Cervone F. and De Lorenzo G. (1996) Differential accumulation of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) mRNA in two near isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemthianum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**: 83-89.
- Nuss L., Mahé A., Clark A.J., Grisvard J., Dron M., Cervone F. and De Lorenzo G. (1996) Differential accumulation of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**: 83-89.
- Ochatt S.J. and Patat-Ochatt E.M. (1995) Protoplast technology for the breeding of top-fruit trees (*Prunus*, *Pyrus*, *Malus*, *Rubus*) and woody ornamentals. *Euphytica* **85**: 287-294.
- Parisi L., Lespinasse Y., Guillaumes J. and Krüger J. (1993) A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* **83** (5): 533-537.
- Park Y.-D., Papp I., Moscone E.A., Iglesias V.A., Vaucheret H., Matzke A.J.M. and Matzke M.A. (1996) Gene silencing mediated by promotor homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J* **9** (2): 183-194.
- Parker D.M., Hilber U.W., Bodmer M., Smith F.D., Yao C. and Köller W. (1995) Production and transformation of conidia of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **85** (1): 87-91.
- Patat-Ochatt E.M. and Power J.B. (1990) Advances in plant regeneration from apple protoplasts. *Acta Hort* **280**: 285-288.
- Patat-Ochatt E.M., Boccon-Gibod J., Duron M. and Ochatt S.J. (1993) Organogenesis of stem and leaf protoplasts of a haploid Golden Delicious apple clone (*Malus x domestica* Borkh.) *Plant Cell Rep* **12**: 118-120.
- Paul V. (1981) Zur Biologie von *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, dem Erreger des Apfelschorfes. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **34** (1): 60-74.

- Pawlicki N. and Welander M. (1994) Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock Jork 9. *J Hort Sci* **69** (4); 687-696.
- Paxton J.D. (1981) Phytoalexins-a working redefinition. *Phytopath.Z.* **101**: 106-109.
- Perales E. H. and Schieder O. (1993) Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. *Plant Cell Tiss Org Cult* **34**: 71-76.
- Perrin D.R.& Bottomley W. (1961) Pisatin, an antifungal substance from *Pisum sativum*. *Nature* **191**: 76-77.
- Pezet R., Pont V. and Cuenat P. (1994) Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection. *J Chromatogr A* **663**: 191-197.
- Phan C.T. (1991) Vitreous state *in vitro* culture: ethylene versus cytokinin. *Plant Cell Rep* **9**: 517-519.
- Picinelli A., Dapena E. and Mangas J.J. (1995) Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. A preliminary study. *J Agric Food Chem* **43**: 2273-2278.
- Powell A.L.T., van Kan J., ten Have A., Visser J., Greve L.C., Bennett A.B. and Labavitch J.M. (2000) Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol Plant-Microb Interact* **13** (9): 942-950.
- Puite K.J. and Shaart J.G. (1996) Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci* **119**: 125-133.
- Ramanathan V. and Veluthambi K. (1995) Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T<sub>L</sub>-DNA. *Plant Mol Biol* **28**: 1149-1154.
- Ramanathan V., Simpson C.G., Thow G., Iannetta P.P.M., McNicol R.J. and Williamson B. (1997) cDNA cloning and expression of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) from red raspberry (*Rubus idaeus*). *J Exp Bot* **48** (311): 1185-1193.
- Roggero J.-P. (2000) Study of the ultraviolet irradiation of resveratrol and wine. *Journal of Food Composition and Analysis* **13**: 93-97.
- Romero-Pérez A., Lamuela-Raventós R.M., Andrés-Lacueva C. and de la Torre-Boronat M.C. (2001) Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *J Agric Food Chem* **49**: 210-215.

- Rugini E. and Mugano M. (1998) A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple [*Malus x domestica* Borkh.] cv. Golden Delicious. *Plant Cell Rep* **17**: 581-585.
- Saito A. and Suzuki M. (1999) Plant regeneration from meristem-derived callus protoplasts of apple (*Malus x domestica* cv. 'Fuji'). *Plant Cell Rep* **18**: 549-553.
- Sarwar M. and Skirvin R.M. (1997) Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus x domestica* Borkh.) *in vitro*. *Scientia Hort* **68**: 95-100.
- Schiemann J., Weber A., Commandeur U., Knoblauch M., van Bel A., Fischer R., Prüfer D., Hausmann L., Töpfer R., Hehl R., Luehrs R., Reichmann : and Tacke E. (2000) Minimizing transgenic DNA while maximizing function. <http://www.ag.usask.ca/isbr/Symposium/Proceedings/Section8/htm> [02.08.2001].
- Schmidt H., Krüger J., Dunemann F., Markussen T., Hansen H., Radies M., Stielau E., Gasché B., Köpcke K., Burghardt M. und Henning J. (1999) Resistenzzüchtung beim Apfel in Ahrensburg. *Erwerbsobstbau* **41**: 81-85.
- Schnabel G. and Parisi L. (1997) Sensitivity of *Venturia inaequalis* to five DMI fungicides, including the new triazole fluquinconazole, and to pyrimethanil. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **104** (1): 36-46.
- Schöppner A. and Kindl H. (1979) Stilbene synthase (Pinosylvine synthase) and its induction by ultraviolet light. *FEBS Lett* **108** (2): 349-352.
- Schöppner A. and Kindl H. (1984) Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *Journal Biol Chem* **259** (11): 6806-6811.
- Schulze K. (2000) Entwicklung eines *in vitro* Testverfahrens zur Überprüfung der Wirkungsmechanismen von Phytoalexinen und anderer Pflanzenabwehrstoffe sowie Mikroorganismen oder deren Metaboliten auf Sporenkeimung, Appressorienbildung und Ausbildung von Penetrationshyphen von *Venturia inaequalis*. Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Sedira M., Holfors A. and Welander M. (2001) Protocol for transformation of the apple rootstock Jork 9 with the *rolB* gene and its influence on rooting. *Plant Cell Rep* **20**: 517-524.
- Seifert G.J., Kanzler P., Da Câmara Machado A., Katinger H. and Da Câmara Machado M.L. (1994) Hormonal optimization and morphological characterization of the 'M9 Jork' stem and disc system. Towards its biochemical characterization. *Adv Hort Sci* **8**: 61-66.

- Seingre D., O'Rourke J., Gavillet S. and Moncousin C. (1991) Influence of gelling agent and carbon source on the *in vitro* proliferation rate of apple rootstock EM IX. *Acta Hort* **289**: 151-155.
- Shaart J.G., Puite K.J., Kolova L. and Pogrebnyak (1995) Some methodological aspects of apple transformation by *Agrobacterium*. *Euphytica* **85**: 131-134.
- Simpson C.G., MacRae E., Gardner R.C. (1995) Cloning of a polygalacturonase-inhibiting protein from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Plant Gene Register (PGR95-037). *Plant Physiol* **108**: 1748.
- Smalla K., Borin S., Heuer H., Gebhard H., van Elsas J.D., Nielsen K. (2000) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria. Are there new data to fuel the debate? <http://www.ag.usask.ca/isbr/Symposium/Proceedings/Section8/htm> [02.08.2001].
- Sotheeswaran S. and Pasupathy (1993) Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry* **32** (5): 1083-1092.
- Sriskandarajah S. and Goodwin P. (1998) Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* **53**: 1-11.
- Sriskandarajah S., Goodwin P.B. and Speirs J. (1994) Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **36**: 317-329.
- Sriskandarajah S., Mullins M.G. and Nair Y. (1982) Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Sci Lett* **24**: 1-9.
- Sriskandarajah S., Skirvin R.M., Abu-Qaoud H., Korban S.S. (1990) Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro*. *J Hort Sci* **65** (2): 113-121.
- Stachel S.E., Messens E., Van Montagu M. and Zambryski P. (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**: 624-629.
- Stam M., De Bruin R., Kenter S., van der Hoorn R.A.L., van Blokland R., Mol J.N.M and Kooter J.M. (1997a) Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J* **12** (1): 63-82.
- Stam M., Mol J.N.M. and Kooter J.M (1997b) The silence of genes in transgenic plants. *Ann Bot* **79**: 3-12,

- Stark-Lorenzen P., Nelke B., Hänßler G., Mühlbach H.P. and Thomzik J.E. (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Cell Rep* **16**: 668-673.
- Steinbiß H.-H. (1995) *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Transgene Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 103-121.
- Stotz H.U., Bishop J.G., Bergmann C.W., Koch M., Albersheim P., Darvill A.G. and Labavitch J.M. (2000) Identification of target amino acids that affect interactions of fungal polygalacturonases and their plant inhibitors. *Physiol Mol Plant Pathol* **56**: 117-130.
- Stotz H.U., Contos J.J.A., Powell A.L.T., Bennett A.B. and Labavitch J.M. (1994) Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Mol Biol* **25**: 607-617.
- Subbaramaiah K., Chung W.J., Michaluart P., Telang N., Tanabe T., Inoue H., Jang M., Pezzuto J.M. and Dannenberg A. (1998) Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **273** (34) 21875-21882.
- Theiler-Hedtrich C. and Theiler-Hedtrich R. (1990) Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. *Acta Hort* **280**: 195-199.
- Thomma B.P.H.J., Nelissen I., Eggermont K. and Broekaert W.F. (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant J* **19** (2): 163-171.
- Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R., Cramer R., Davies J.E., Lauwereys M., and Botterman J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* **6** (9): 2519-2523.
- Thomzik J.E. (1993) Transformation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) In: Bajaj Y.P.S (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 23: 171-182. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Tiemann K., Filmer B., Inzé D., van Montagu M., Barz W. (1993) Phytoalexin Biosynthesis in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). cDNA cloning and Regulation of NADPH: Isoflavone Oxireductase (IFR) B. Fritig and M. Legrand (eds.), *Mechanisms of Plant Defenses Responses*, 320-323.
- Toubart P., Desiderio A., Salvi G., Cervone F., Daroda L. and De Lorenzo G. (1992) Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *The Plant J* **2** (3): 367-373.

- Trick H.N. and Finer J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Res* **6**: 329-336.
- Valsangiacomo C. and Gessler C. (1992) Purification and characterization of an exopolygalacturonase produced by *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *Physiol Mol Plant Pathol* **40**: 63-77.
- Van der Graaff E., den Dulk-Ras A., Hooykaas P.J.J. (1996) Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol Biol* **31**: 677-681.
- Van der Krieken W.M., Breteler H., Visser M.H.M. and Mavridou D. (1993) The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system. *Plant Cell Rep* **12**: 203-206.
- Van Telgen H.-J., Elagöz V., Van Mil A., Paffen A. and de Klerk G.-J. (1992) Role of plant hormones in lateral bud growth of rose and apple *in vitro*. *Acta Hort* **319**: 137-142.
- Vaucheret H., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.-B., Mourrain P., Palauqui J.-C. and Vernhettes S. (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant J* **16** (6): 651-659.
- Vinatzer B.A., Patocchi A., Gianfranceschi L., Tartarini S., Zhang H.-B., Gessler C. and 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-Micr Interact* **14** (4): 508-515.
- Wagner K., Hitz-Germann L., Seng J.M. and Gessler C. (1988) Cellulolytic ability of the scab fungus, *Venturia inaequalis*. *J Phytopathology* **123**: 217-221.
- Wang Q., Tang H., Quan Y. and Zhou G. (1994) Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured *in vitro*. *J Hort Sci* **69** (5): 833-839.
- Wang S.Y. and Faust M. (1987) Changes of fatty acids and sterols in apple buds during bud break induced by a plant bioregulator, thidiazuron. *Physiol Plant* **72**: 115-120.
- Wang S.Y., Steffens G.L. and Faust M. (1986) Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator, thidiazuron. *Phytochemistry* **25** (2): 311-317.
- Waterhouse A.L. and Lamuela-Raventós R. M. (1994) The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* **37** (2): 571-573.
- Waterhouse P.M., Wang M.-B. and Lough T. (2001) Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* **411**: 834-842.

- Way R.D., Aldwinckle H.S., Lamb R.C., Rejman A., Sansavini S., Shen T., Watkins R., Westwood M.M. and Yoshiba Y. (1990) Apples (*Malus*). P. 1-62. In: J.N. Moore and J.R. Ballington Jr. (eds.). Genetic resources of temperate fruit and nut. Int. Soc. Hort. Sci. , Wageningen (*Acta Hort* **290**).
- Welander M., Pawlicki N., Holefors A. and Wilson F. (1998) Genetic transformation of the apple rootstock M26 with the *RoIB* gene and its influence on rooting. *J Plant Physiol* **153**: 371-380.
- Wenck A., Czako M., Kanevski I. and Márton L. (1997) Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol Biol* **34**: 913-922.
- Williams R.R. and Taji A.M. (1991) Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (J.M. Black) *in vitro* shoot cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* **26**: 1-6.
- Williamson B., Johnston D.J., Ramanathan V. and McNicol R.J. (1993) A polygalacturonase inhibitor from immature raspberry fruits: a possible new approach to grey mould control. *Acta Hort* **352**: 601-605.
- Wolters A-M. A., Trindade L.M., Jacobsen E. and Visser G.F. (1998) Fluorescence in situ hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyse complex T-DNA loci in potato. *The Plant J* **13** (6): 837-847.
- Wong K.-W., Harman G.E., Norelli J.L., Gustafson H.L. and Aldwinckle H.S. (1999) Chitinase-transgenic lines of 'Royal Gala' apple showing enhanced resistance to apple scab. *Acta Hort* **494**: 595-599.
- Yao C., Conway W.S. and Sams C.E. (1995a) Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit. *Phytopathology* **85** (11): 1373-1377.
- Yao C., Conway W.S., Ren R., Smith D., Ross G.S. and Sams C.E. (1999) Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Mol Biol* **39**: 1231-1241.
- Yao J.-L., Cohen D., Atkinson R., Richardson K. and Morris B. (1995b) Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Rep* **14**: 407-412.
- Yepes L.M. and Aldwickle H.S. (1994a) Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* **37**: 257-269.

- Yepes L.M. and Aldwickle H.S. (1994b) Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Reg* **15**: 55-67.
- Zimmer J. (1999) Prüfung von schorfresistenten Apfelsorten an der SLVA Ahrweiler. *Erwerbsobstbau* **41**: 185-191.
- Zimmerman R.H., Bhardwaj S.V. and Fordham I.M. (1995) Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops. *Plant Cell Tiss Org Cult* **43**: 207-213.
- ZKBS (1999) Stellungnahme der ZKBS zur Biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen. <http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/ALLGSTELL/99/ANTIBIOTIKA.HTM>  
[14.01.2002]

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hannover, im März 2002

(Iris Szankowski)

## Danksagung

Diese Seite möchte ich nutzen, um meinen Dank all denjenigen auszusprechen, die direkt und indirekt das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. H.-J. Jacobsen für die Überlassung des Themas, sein Vertrauen bei der Bearbeitung der Arbeit und seine stete Gesprächs- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Herrn Prof. J. Schönherr bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates sowie für seine Unterstützung und ständige Gesprächsbereitschaft im Rahmen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Karin Lein. Durch ihre hervorragende Pflege der Kulturen, ihr Engagement während der gesamten Arbeitsphase und vor allem durch ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und seelische Unterstützung konnte diese Arbeit in erst in diesem Ausmaß zustande kommen.

Anette Urbanietz hat durch die Bereitstellung der Elstar *in vitro* Kulturen und durch ihre Ratschläge zur Inkulturnahme die Arbeit „in Gang gebracht“. Dafür und ebenso für die Ermöglichung der Durchführung der Mehltauinfektionen danke ich ihr herzlich.

Bei Katja Schulze möchte für die Bereitstellung der Apfelschorfkulturen, für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, für die Pflege der Pflanzen und auch für ihre stete Hilfsbereitschaft in vielen anderen Lebenslagen bedanken.

Holger Zorn danke ich für sein Engagement bei den HPLC-Versuchen.

Herrn Priv. Doz. Karlis Briviba von der Bundesanstalt für Ernährung in Karlsruhe danke herzlich für die Durchführung der HPLC-Analysen.

Heiko Kiesecker sei gedankt für die Bereitstellung des Plasmides pHKvst, für seine stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft sowie für die Anregungen. Ebenso gilt mein Dank Andrea Richter für die Durchführung der Diplomarbeit im Rahmen dieses Projektes, sowie für die Tips und Tricks bei den molekularbiologischen Versuchen.

Peter Grimm-Wetzel hat mich nicht nur in die Geheimnisse der Statistik eingeweiht, sondern hat vor allem durch die Organisation der Pflanzenschutzmaßnahmen die Pflanzen vor der Vernichtung durch unangenehme Zeitgenossen bewahrt. Auch die Veredelungen der Pflanzen wären ohne ihn nicht möglich gewesen. Dafür danke ich ihm sehr herzlich und ebenso seinen Mitarbeitern, die die Pflanzenschutzmaßnahmen in die Tat umgesetzt haben. Herrn Huhn danke ich für die Hilfe bei der Veredlung der Pflanzen. Allen anderen

Mitarbeitern des Institutes für Obstbau sei ebenfalls für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft gedankt.

Bei Computerproblemen waren Thomas Reinard und Michael Hust erste Ansprechpartner und hatten immer ein paar gute Tips parat. Thomas R. hatte auch in anderen Angelegenheiten stets ein offenes Ohr und...durfte dafür auch immer gern der „erste Beifahrer ohne Streit“ sein!

Die Gespräche mit Thomas Brinks, beruflicher sowie privater Natur, waren mir stets eine große Hilfe!

Jasmin Doll danke ich herzlich für die Arbeiten, die sie im Rahmen ihres Hiwi-Jobs durchgeführt hat.

Achim Gau sei gedankt, dass er mir bzw. meinen Pflanzen vorübergehend Asyl im Gewächshaus der Botanik gewährt hat. Den Gärtnerinnen der Botanik Yvonne Leye, Monika Klunker und Christiane Hausmann danke ich, dass sie die Pflanzen während dieser Zeit hervorragend gepflegt haben.

Frau Prof. Laimer da Câmara Machado und ihren Mitarbeitern danke ich herzlich für die freundliche Betreuung während meines Aufenthaltes in Wien. Karin Schlangen sei dafür gedankt, dass ich während dieser Zeit bei ihr wohnen durfte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank **all** meinen Kollegen vom LG Molekulargenetik für die angenehme Arbeitsatmosphäre, für die Hilfsbereitschaft und für die Unterstützung, die mir zu Teil wurde.

Viktor danke ich, dass er mich stets motiviert hat diesen Weg zu gehen.